

Kapitel 9

9.1 Proteaser

Generelt:

Proteaser fremskynder en reaktion

Protease → kløver proteiner via hydrolysis (vand) = peptidbinding brydes

Enzymet producerer et nukleofilt angreb på en ureaktion carbonyl(COO⁻) gruppe.

Chymotrypsin:

- Kløver på carboxyl siden af store hydrofobe aminosyrer
- Hydrofobe aminosyrer: Tryptofan(W), Phenylalanin(F), Methonin(M) og Tyrosin(Y)
- Covalent catalysis → enzymets aktive site indeholder en reaktion gruppe, der binder substrat.
- Aktiv site indeholder en reaktion serin gruppe → kan derfor binde substrat.
- Enzymet er inaktivt ved behandling med DIPF, som kun kan reagere med serin(Figur 9.2)
- Se også kapitel 10.4, s. 289-290

Kinetik af enzymet:

- Bruge en analog til substratet. Kan være N-acetyl-L-phenylalanin p-nitrophenyl ester
- Stop-Flow metoden bruges.
- I Burst fasen: Enzymernes aktive sites er fyldte
- Steady-State: Frigivelse af produktet(p-nitrophenolat)
- Det viser, at hydrolysis sker i to step.
- Figur 9.5

Opbygning af chymotrypsin:

- Indeholder 3 polypeptidkæder, som er sat sammen af disulfid bindinger
- Syntetiseret som et polypeptid = chymotrypsinogen
- Chymotrypsinogen kløves → skaber de 3 polykæder → gør enzymet aktivt
- Aktive site indeholder en serin gruppe, som ligger på overfladen af enzym
- Serin danner hydrogenbindinger med en histidin , som danner hydrogenbindinger med aspartat = DEN KATALYSTISKE TRIADE(s. 246)

Den katalytiske triade:

- Histidin polariserer serins hydroxyl gruppe(OH), så den ikke deprotoneres.
- Når substratet binder, modtager det protonen fra hydroxyl gruppen fra serin → der dannes en alkoxid ion, som er en bedre nukleofil.
- Aspartat orienterer histidin og gør den til en bedre proton acceptor via hydrogenbindinger og elektrostatiske effekter.
- Reaktionen, når substratet binder → Se figur 9.8

Chymotrypsin indeholder en hydrofobisk lomme, som kaldes S1.

Det er i S1, at de store hydrofobe sidekæder kan passe.

I bunden af specificitetslommen ses en Serin

Specificiteten af chymptropsin afhænger af, hvilken aminosyrer der binder.

Kapitel 10

Allosteriske enzymer:

- Viser kooperativitet → aktivitet af et site, påvirker andre sites til at binde f.eks. en ligand bedre.

Isozymer:

- Er homologe, som katalyserer den samme reaktion, men har forskellig struktur.
- S. 283

Allosteriske enzymer:

- Er bestemt ved deres ændring i forhold til substratkoncentrationen.
- Sigmoid kurver → fremkommer ved kooperativitet mellem subunits.
- Binding af et substrat til et aktivt site, vil øge affiniteten for substratet i et andet aktiv site.

10.1 ATCase

Aspartat transcarbamolyase(ATCase):

- Første skridt i dannelsen af pyrimidiner(s. 710, 25.1 – nucleotide biosyntese)
- Inhiberes af CTP → det sidste produkt ATCase(figur 10.2) → feedback inhibering
- CTP minder ikke strukturelt om substratet → bindet sig til allosteriske/regulatoriske sites på enzymet.

Strukturen af ATCase:

- ATCase kan blive separeret i regulatoriske og katalytiske sites via p-hydroxymercuribenzoat(figur 10.4) →
- Ultracentrifugering → opdeler subunits i to. De kan derefter deles i ionbytningskromatografi.
- Store subunits= katalytiske site.
 - Responderer ikke på CTP og udviser ikke sigmoid kinetik.
 - Består af tre kæder(34 kd hver)
- Lille subunits = regulatoriske sites.
 - Binder CTP, men har ingen katalytisk aktivitet
 - Består af 2 kæder (17kd hver)
- I alt består det native enzym af to katalytiske trimere og 3 regulatoriske dimere.
- Hver r-kæde i regulatorisk dimer interagerer med en c-kæde fra katalytisk trimer
 - C-kæden binder med et struktur domæne i r-kæden, som er stabiliseret af med zink ionen, som er bundet til 4 cystein rester.
 - p-hydroxymercuribenzoat binder til cystein og erstatter zink ionen → destabilisering af r-subunit domæne.

Aktiv site på ATCase:

- Findes via PALA
 - PALA er et bisubstrat analog (ligner et intermediat i katalysen.) (analog ligner substrat men hæmmer)
 - Kompetitiv inhibitor → bindet til aktive site.
 - PALA binder i sites, som ligger mellem c-kæder i en katalytisk trimer.

Kaskade(s.294):

- Et signal starter en serie af steps, hvor hvert step er katalyseret af et enzym.
- Ved hver step bliver signalet forstærket
- Størkning af blod kommer ved en kaskade af zymogen aktiveringer(figur 10.26)
- Thrombin er det vigtigste enzym i blodstørkning.
- Thrombin producerer mere thrombin ved at aktiverer enzymer og faktorer, der danner det = positiv feedback.

Blodstørkning:

- Det sidste trin er fibrinogen, der omdannes til fibrin af thrombin.
- Fibrinogen:
 - Består af 3 globulære units, som forbindes via to rods(figur 10.27)
 - Thrombin kløver 4 Arg-Gly peptidbindinger i den centrale del af fibrinogen(s. 293, nederst, s. 294 øverst)

Prothrombin:

- Syntetiserer thrombin
- Består af 4 domæner(figur 10.30, s.295)
 - Første domæne= Gla domæne
 - Anden og tredje = kringles domæner

De tre domæner sørger for, at prothrombin er i inaktiv form og for at det kommer til rigtige sites, hvor det aktiveres af X_a (serin protease) og faktor V_a (et protein).

- Aktivering sker ved proteolytisk kløvning mellem Arg274 og Thr275 → de første 3 domæner frigives.
- Kløvning mellem Arg323 og Ile324 = thrombin.

Sygdom i vitamin K = ødelagt blodkoagulering

Hvis platformen består af glycerol kaldes phosphorlipiden, phosphorglycerid. Til glycerolen er der vedhæftet to fedtsyrer og en phosphoryleret alkohol

- Hydroxylgrupperne på C-1 og C-2 i phosphorglycerid er esterificeret til carboxylgruppen fra de to fedtsyrer. Hydroxylgrupperne på C-3 (fra glycerol) er esterificeret til phosphorsyre. Hvis der ikke sker yderligere "modificering" er dette den mest simple phosphorglycerid, phosphatidat (se syntese i afsnit 26.1 s. 733)
- Viderebygning ud fra phosphatidat sker ved dannelse af esterbinding mellem phosphatgruppen på phosphatidat og hydroxylgrupper på en eller flere alkoholer (se s. 330)

Hvis platformen består af sphingosin (aminoalkohol der indeholder en lang umættet hydrocarbonkæde) er fedtsyrerne bundet til aminogruppen heri.

- Den primære OH-gruppe er esterificeret til phosphorylcholin

Membranlipider kan inkludere kulhydratfragmenter (s 331)

Lipider der indeholder kulhydrat kaldes glycolipider

- Glycolipider er afledt af sphingosin, hvor aminogruppen i backbone er acyleret af en fedtsyre ligesom i sphingomyelin
- Glycolipider adskiller sig fra sphingomyelin idet at der er bundet en eller flere sukre til den primære hydroxylgruppe i stedet for phosphorylcholin (se struktur s. 331)
- Mere komplekse glycolipider kan have mange forgreninger
- Alle glycolipider er orienteret assymetrisk med sukkerresten på den extracellulære side af membranen

Cholesterol (s.331)

- Et steroid der er opbygget af fire sammenbundne hydrocarbon ringe
- I den ene ende af steroidet er det bundet en hydrocarbonhale og i den anden ende en hydroxylgruppe
- I membraner vil hydroxylgruppen interagere med phosphorlipidernes
- Findes ikke i prokaryoter

Membranen i archaea

- De upolære kæder er sat sammen med glycerolbackbone med ether og ikke ester bindinger
- Alkylkæderne er forgrenede og ikke lineære

12.3 Phosphorlipider og Glycolipider danner bimolekylære sheets i vandig opl.

Generelt (s. 333-335)

- Det polære/hydrofile hoved favoriserer vand og vender udad, og de upolære/hydrofobe hale interagerer med hinanden og vender sig ind af i det bimolekylære sheet for at undgå vand.
- De danner en micelle ved et enkelt lag lipider
- De danner bimolekylære sheet ved to lag lipider – denne favoriseres frem for micelle