



VISUALIZING MICHAELIS-MENTEN DYNAMICS

A Master's Research Project submitted in conformity with the requirements for the degree of Master of Science in Biomedical Communications (MScBMC)

Offered through the Institute of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Toronto in collaboration with Biomedical Communications, Department of Biology, University of Toronto Mississauga

Copyright 2017 Ursula Florjanczyk

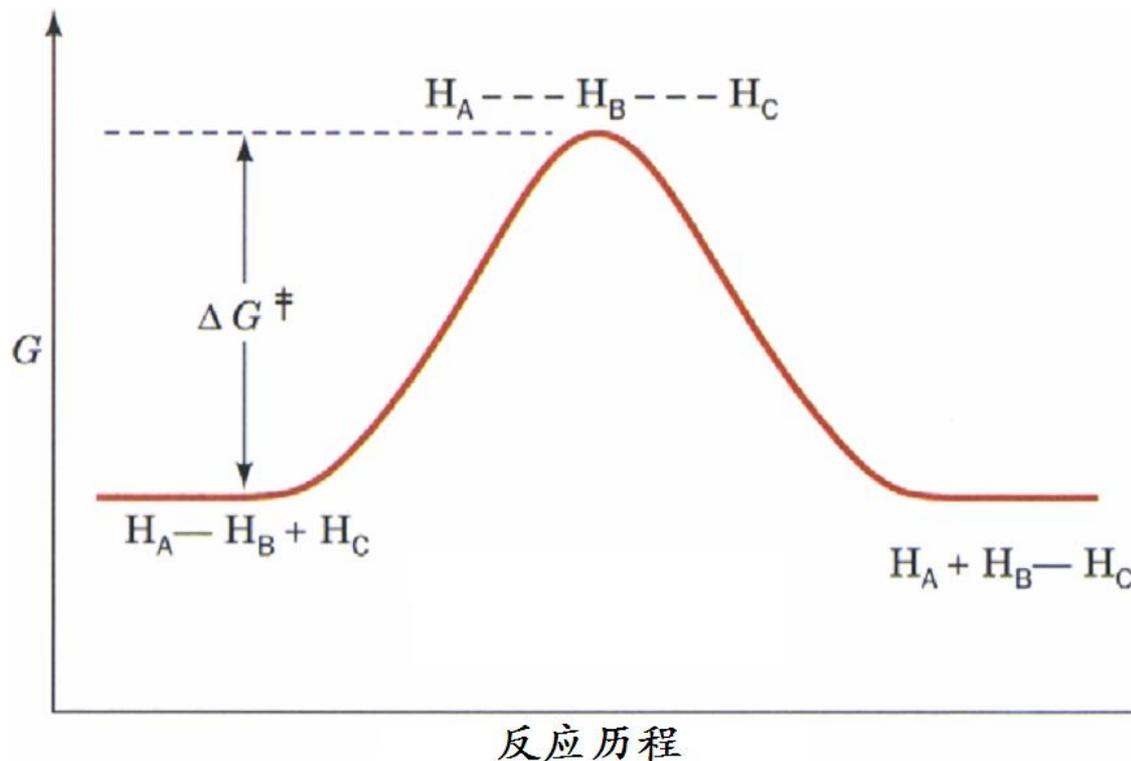
- 酶的概述
- 酶促反应动力学
- 酶的催化机制**
- 酶活性的调节

- 一、酶催化机理研究的主要方法
- 二、过渡态稳定学说
- 三、过渡态稳定的化学机制
- 四、几种常见酶的结构与功能

➤ 酶催化机理研究的主要方法

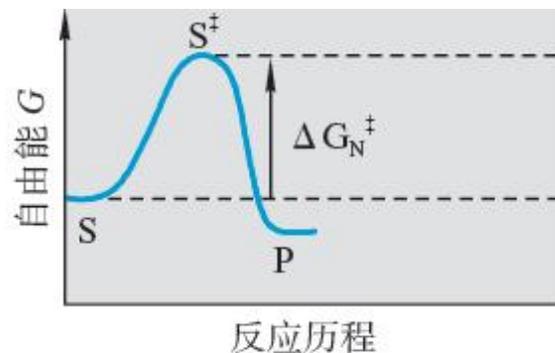
- ① 找出保守性的氨基酸残基
- ② 三维结构的研究
- ③ 定点突变
- ④ 动力学分析
- ⑤ 化学修饰
- ⑥ 计算机模拟

过渡态稳定学说

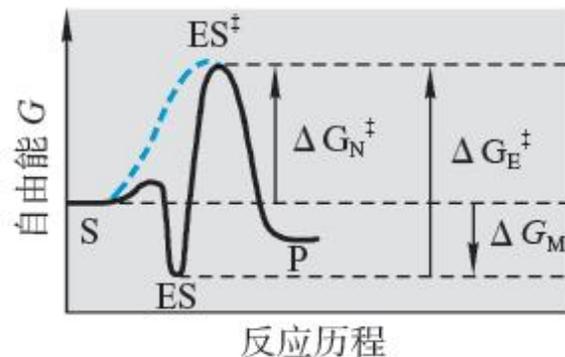
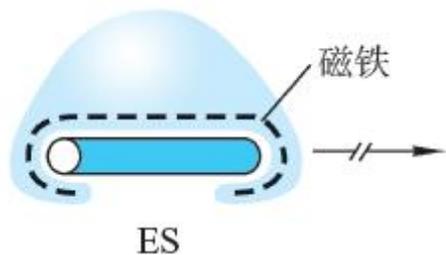


化学反应的过渡态及其前后的自由能变化

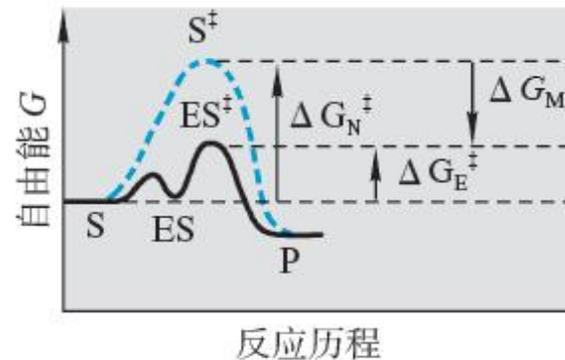
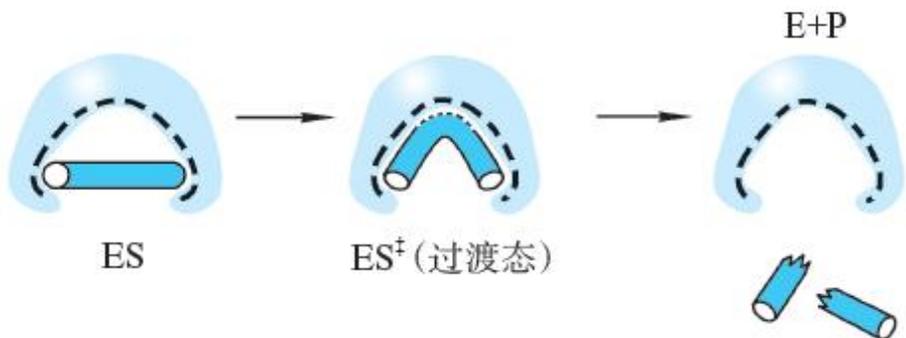
酶的催化机制



(2) 酶与底物互补



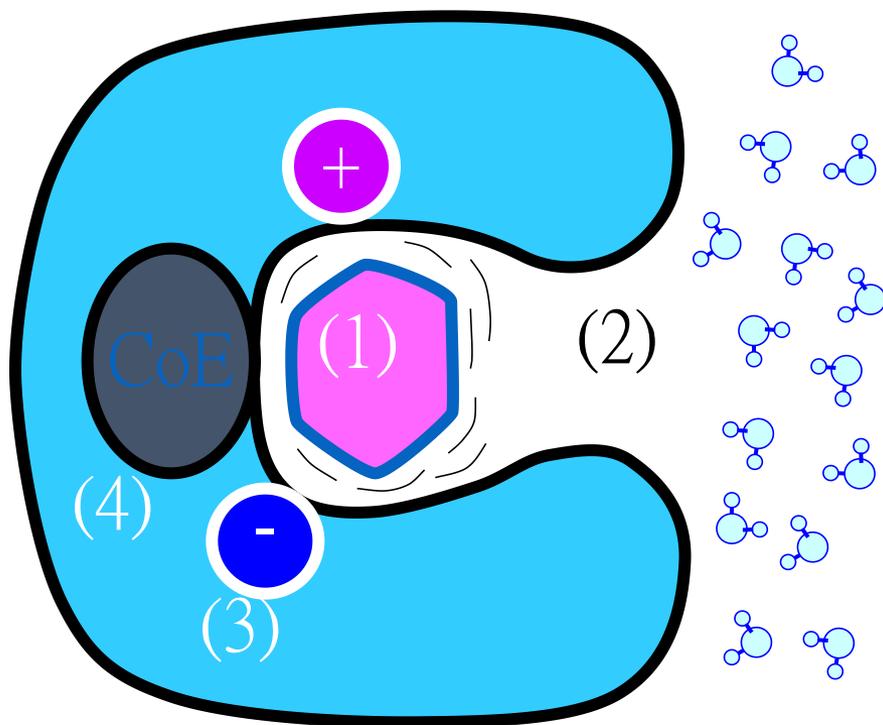
(3) 酶与过渡态互补



“铁丝酶”催化反应的过渡态稳定机制

为什么到达酶过渡态的活化能较低呢？

酶的神奇口袋



(1) 稳定过渡态

(2) 驱赶水分子

(3) 活性基团作用

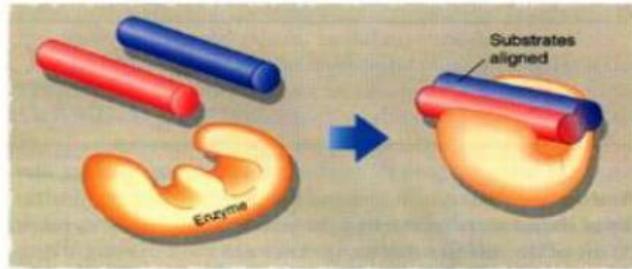
(4) 辅酶帮忙

➤ 过渡态稳定的化学机制

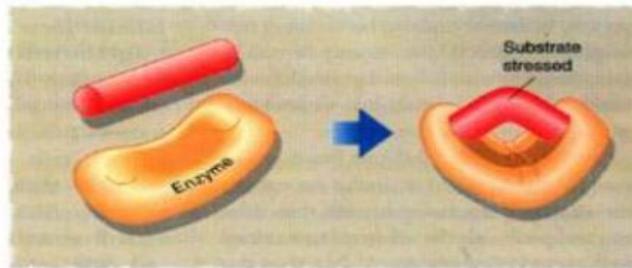
- ① 邻近定向效应
- ② 广义的酸碱催化
- ③ 静电催化
- ④ 金属催化
- ⑤ 共价催化
- ⑥ 底物形变

(1) 邻近定向效应

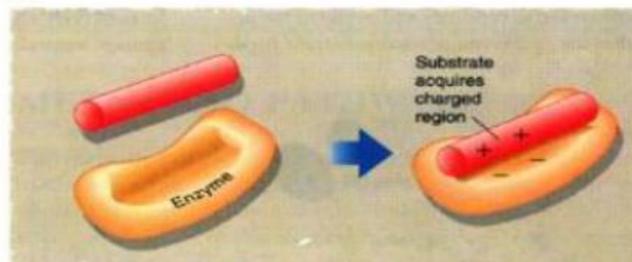
☆ 邻近定向效应是指两种或两种以上的底物（特别是双底物）同时结合在酶活性中心上，相互靠近（**邻近**），并采取正确的空间取向（**定向**），提高底物的有效浓度，使分子间反应近似分子内反应从而加快了反应速度。



(a)



(b)



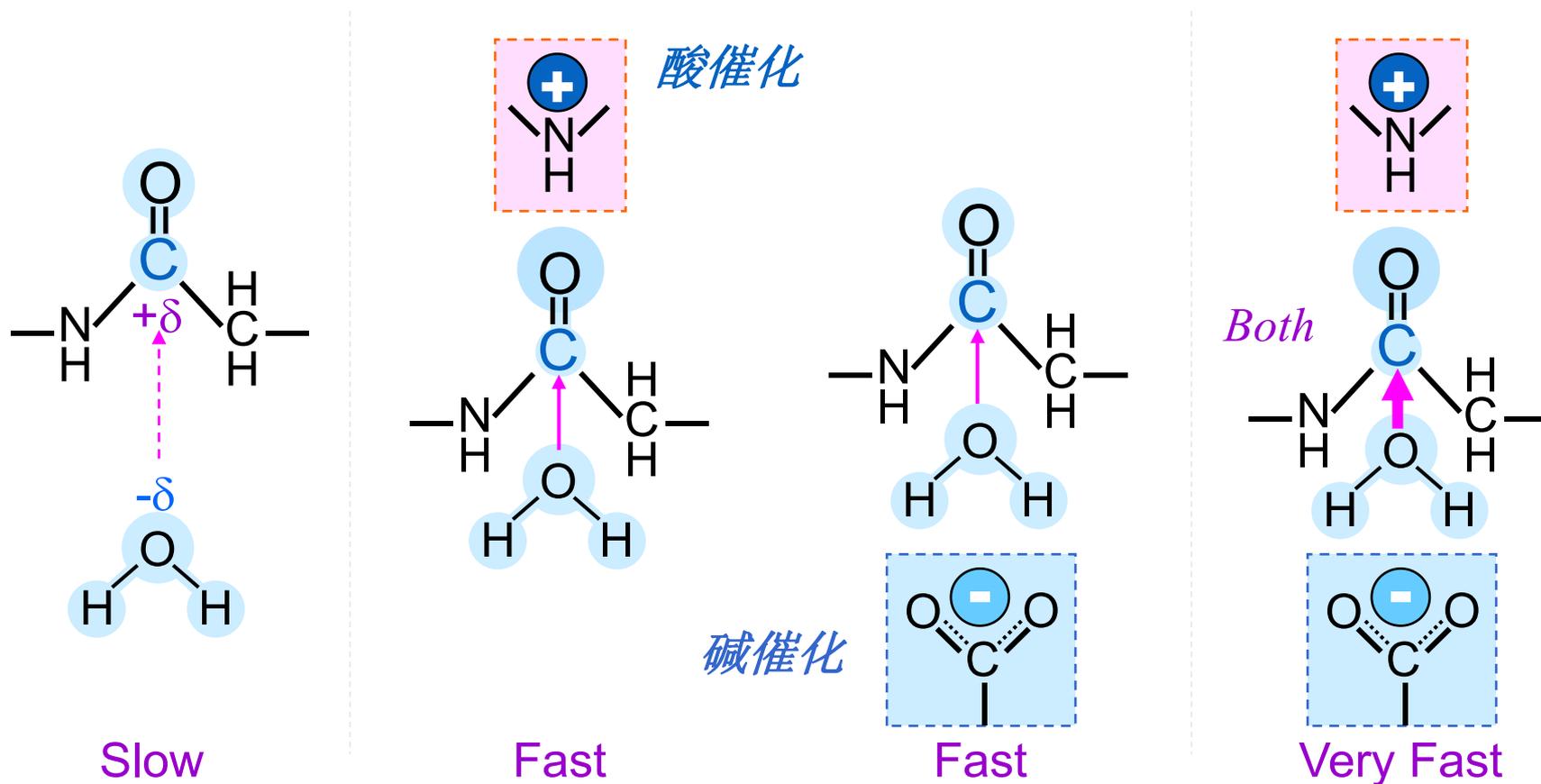
- 使底物靠拢

- 使底物分子产生应力

- 使底物分子电荷变化

(2) 广义的酸碱催化

★ 广义的酸碱催化是指水分子以外的分子作为质子供体或受体参与催化。



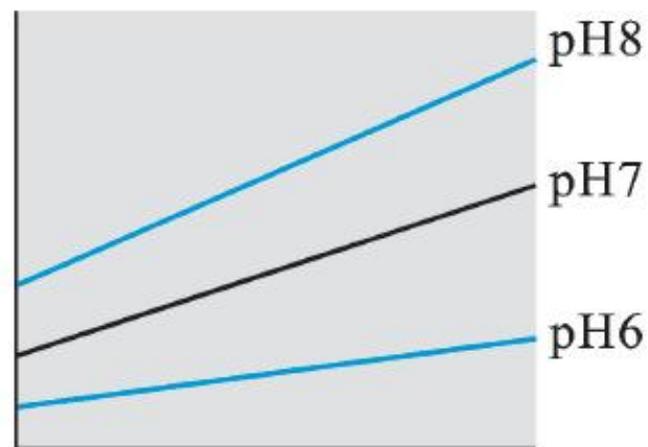
(2) 广义的酸碱催化

(1) 特定的酸碱催化



缓冲溶液浓度

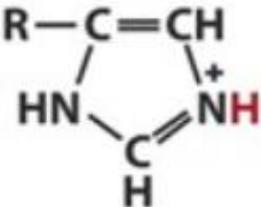
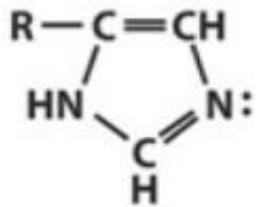
(2) 广义的酸碱催化



缓冲溶液浓度

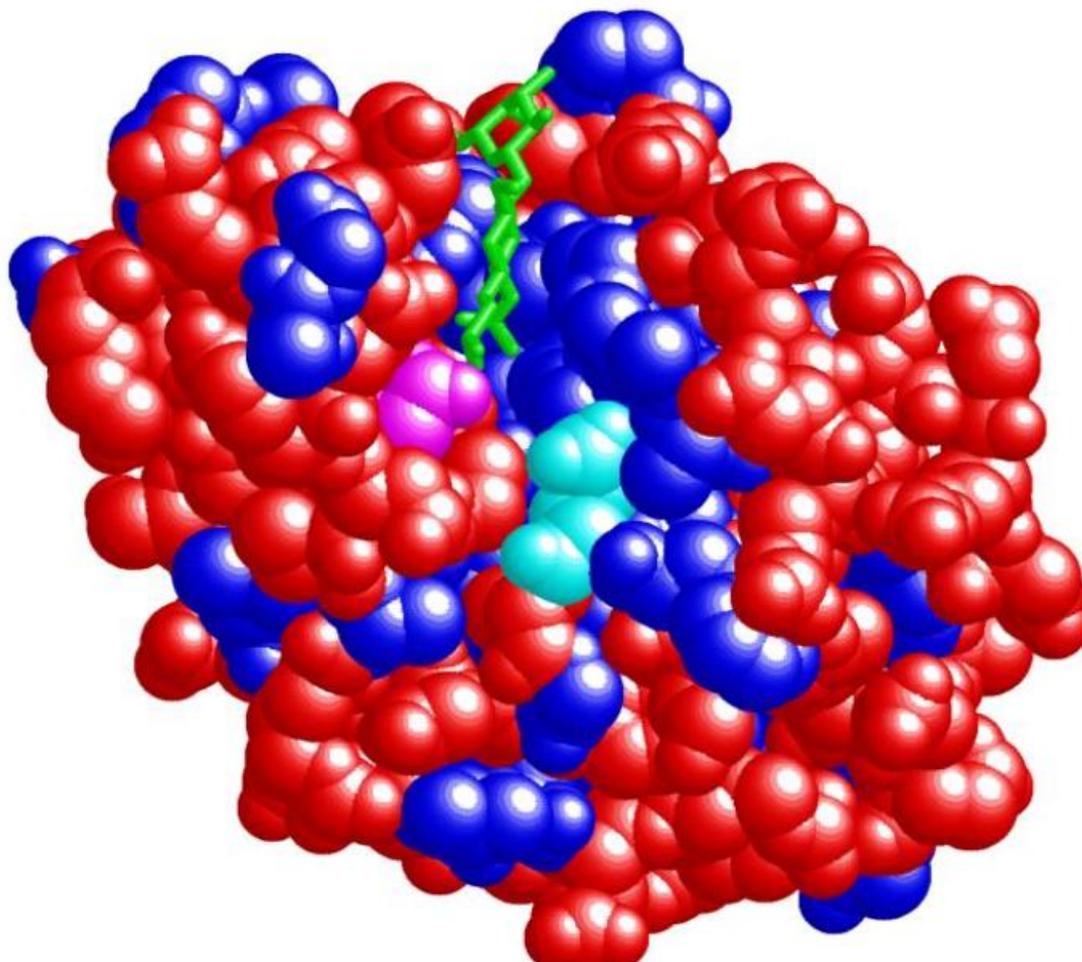
pH 和缓冲溶液浓度对特定酸碱催化和广义酸碱催化的影响

(2) 广义的酸碱催化

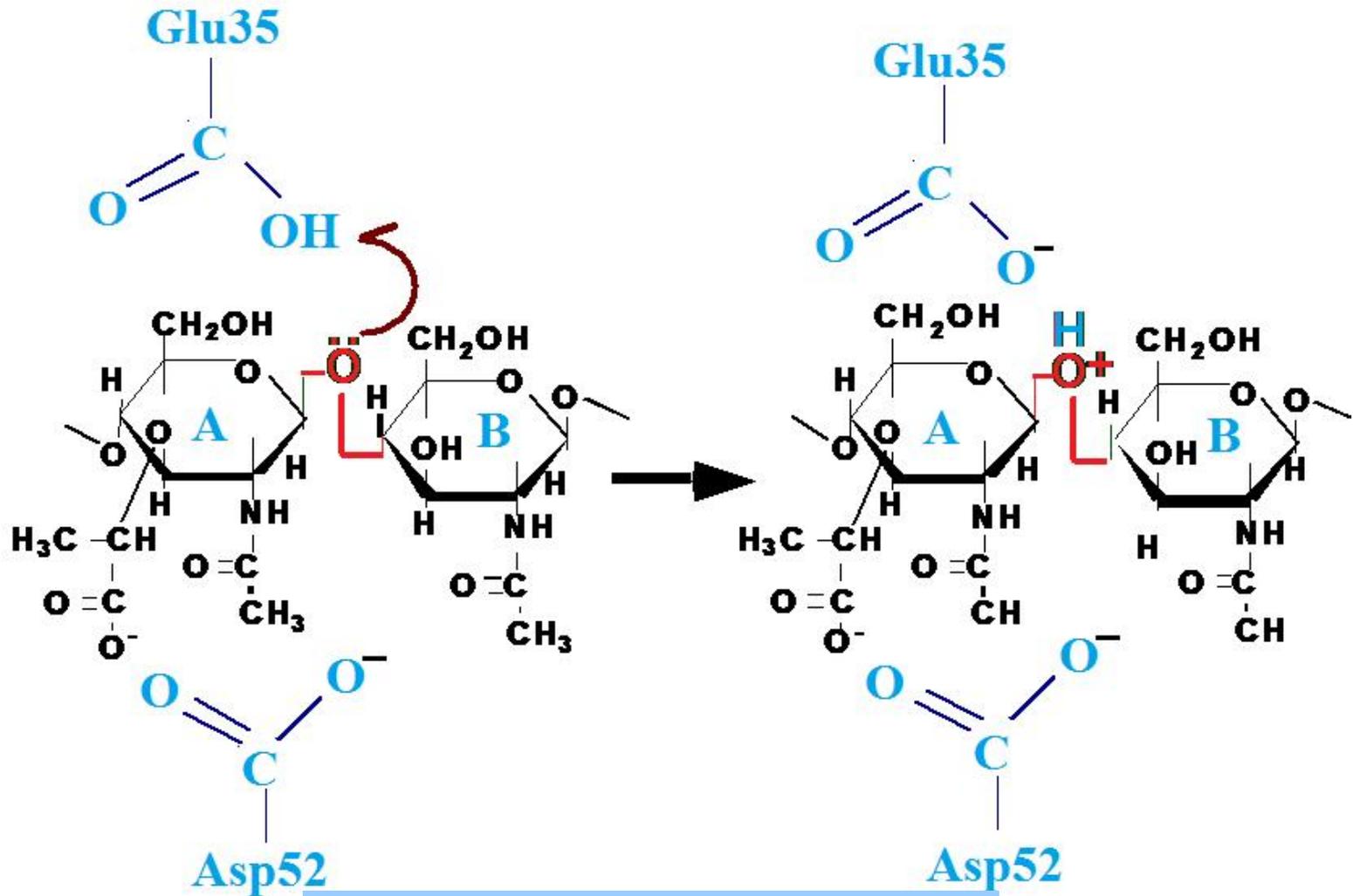
| Amino acid residues | General acid form (proton donor) | General base form (proton acceptor) |
|---------------------|--|---|
| Glu, Asp | $R-COOH$ | $R-COO^-$ |
| Lys, Arg | $R-\overset{+}{N}H_2$ | $R-\ddot{N}H_2$ |
| Cys | $R-SH$ | $R-S^-$ |
| His |  |  |
| Ser | $R-OH$ | $R-O^-$ |
| Tyr |  |  |

(2) 广义的酸碱催化

溶菌酶的Glu 35被疏水氨基酸残基所环绕

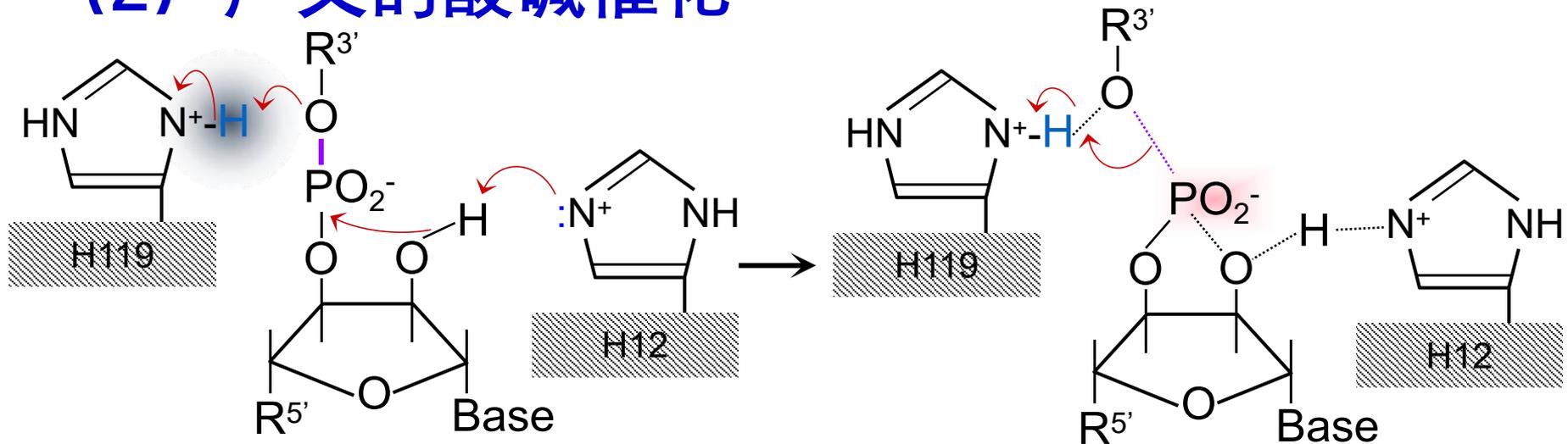


(2) 广义的酸碱催化

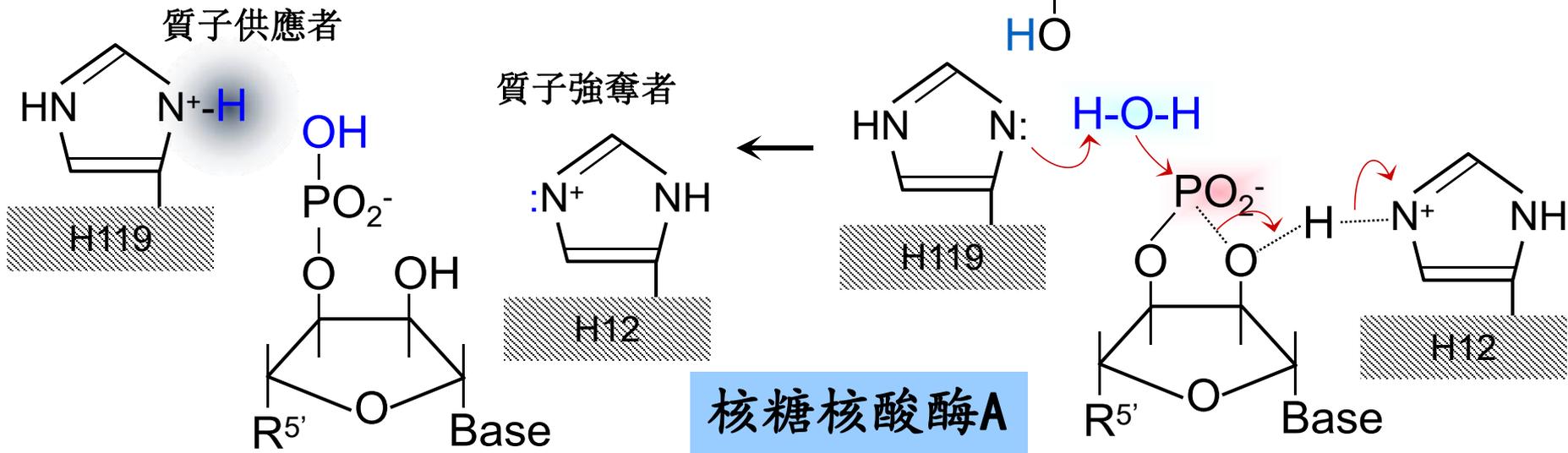


溶菌酶Glu35的广义酸催化

(2) 广义的酸碱催化



Histidine proton shuffle

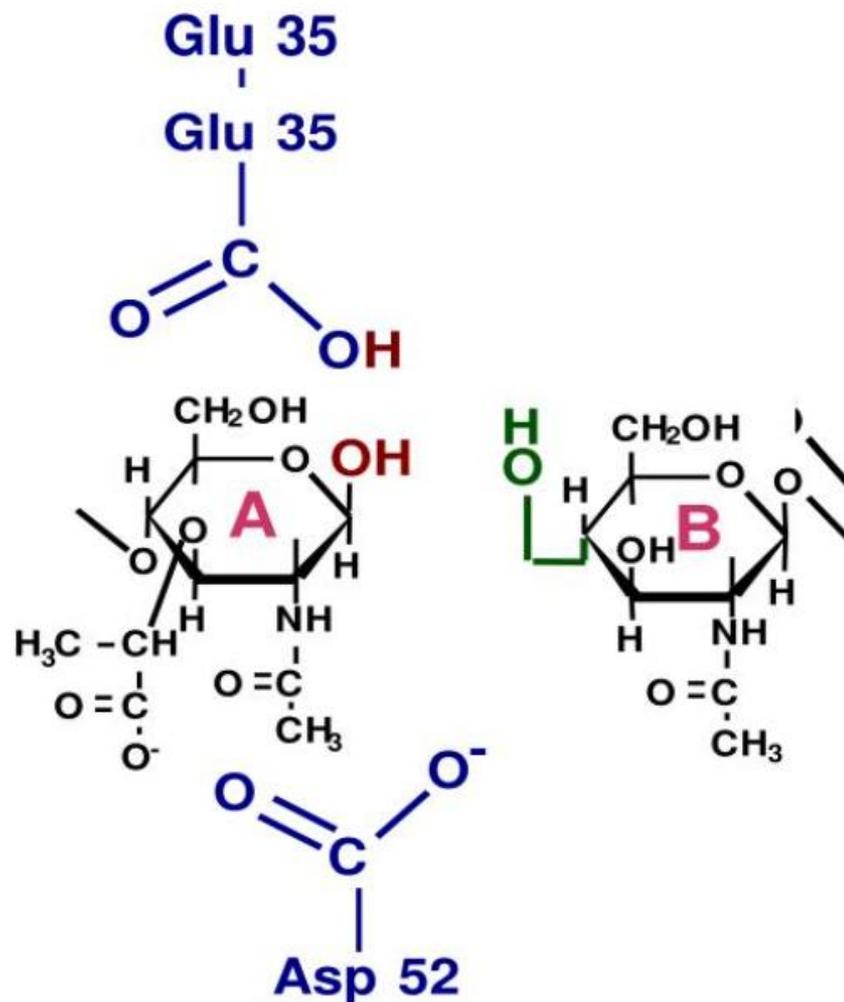


(3) 静电催化

- ★ 活性中心电荷的分布可用来稳定酶促反应的过渡态，酶使用自身带电基团去中和一个反应过渡态形成时产生的相反电荷而进行的催化称为静电催化。
- ★ 有时，酶通过与底物的静电作用将底物引入到活性中心。

(3) 静电催化

- 溶菌酶Glu35将质子交给糖苷键上的O原子以后，O因此带上正电荷，随后糖苷键断裂，左边的糖基1号位的C原子带上正电荷，邻近的Asp52的羧基本来处于解离状态，带负电荷，起着中和正电荷稳定过渡态的作用。

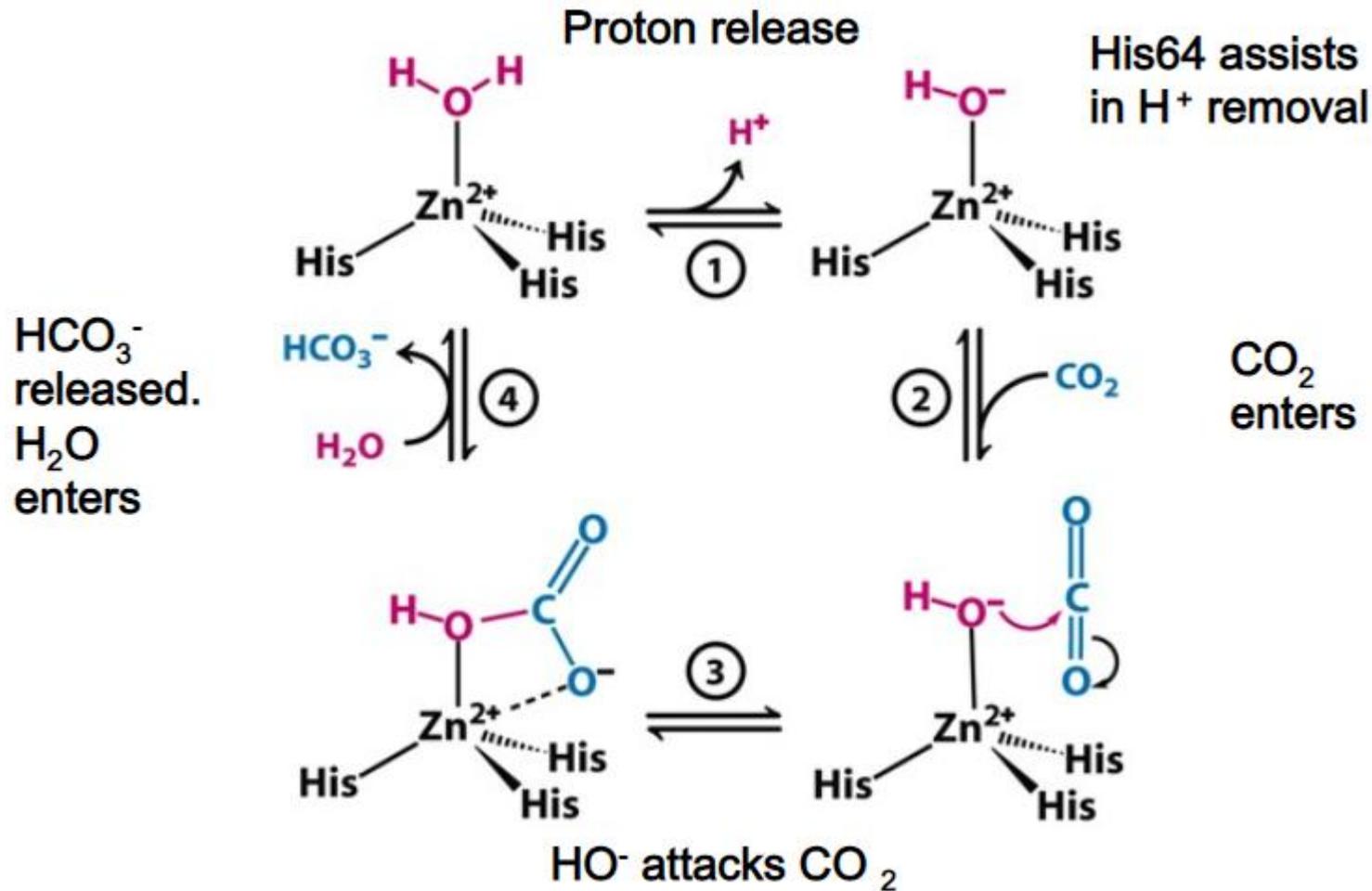


溶菌酶Asp52的静电催化

(4) 金属催化

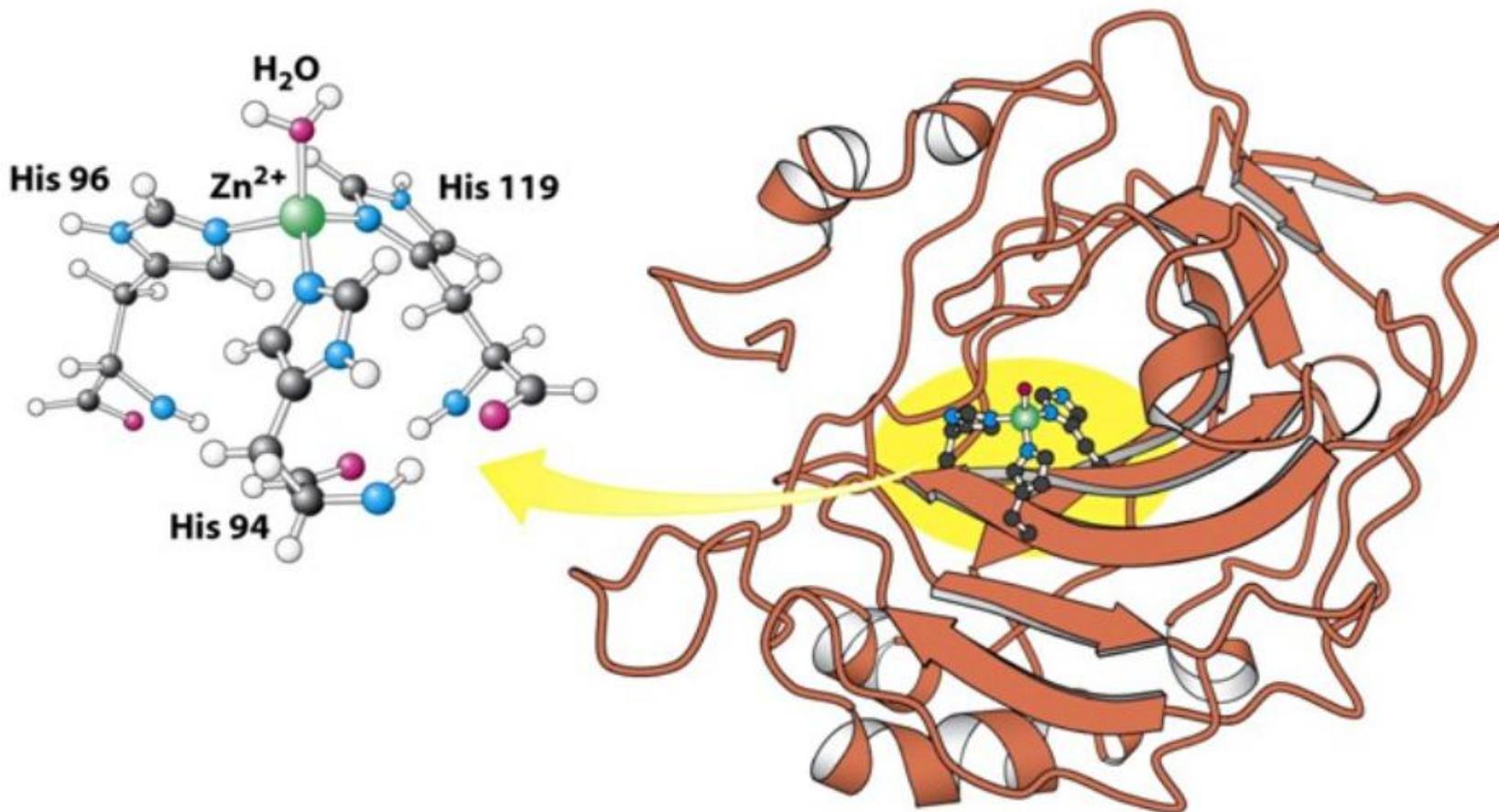
- ★ 近三分之一酶的活性需要金属离子的存在，这些酶分为两类，一类为金属酶，另一类为金属激活酶。前者含有紧密结合的金属离子，多数为过渡金属，如 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Co^{3+} ，后者与溶液中的金属离子松散地结合，通常是碱金属或碱土金属，例如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 。
- ★ 金属离子以5种方式参与催化：
 - ① 作为Lewis酸起作用
 - ② 与底物结合，促进底物在反应中正确定向
 - ③ 作为亲电催化剂，稳定过渡态中间物上的电荷
 - ④ 通过价态的可逆变化，作为电子受体或电子供体参与氧化还原反应
 - ⑤ 酶结构的一部分

(4) 金属催化



碳酸酐酶的金属催化机制

(4) 金属催化



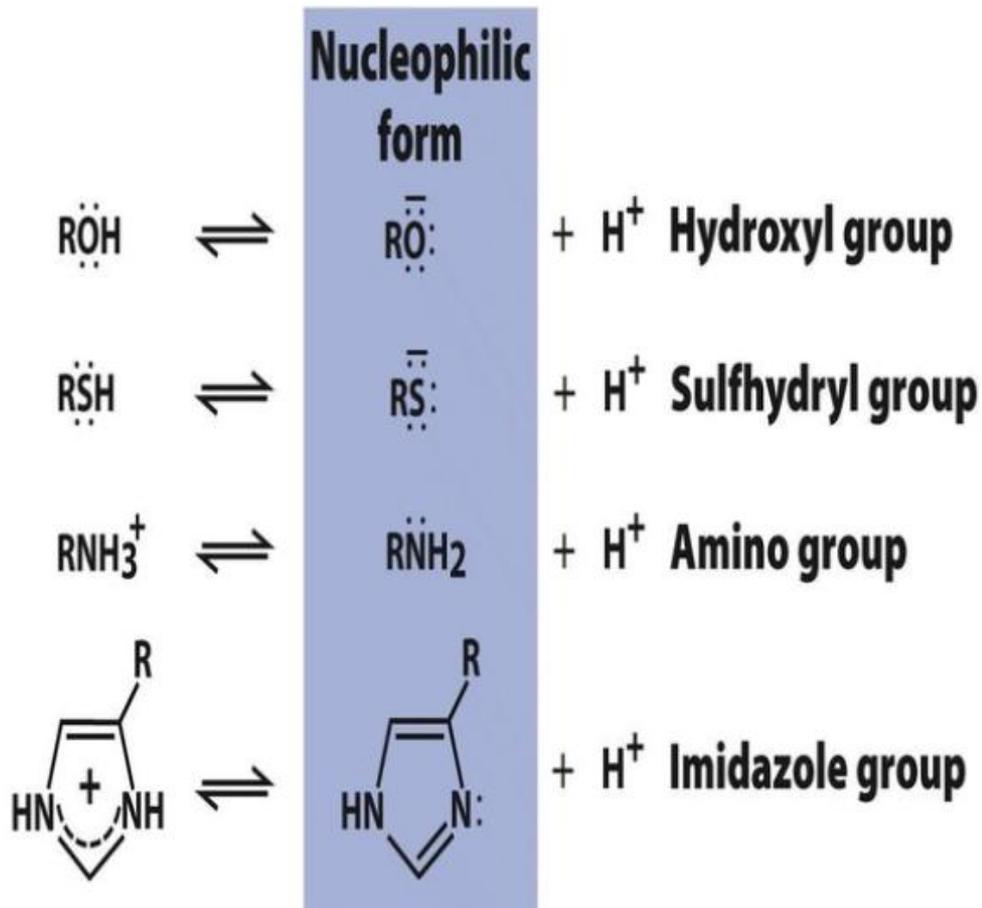
碳酸酐酶的结构

(5) 共价催化

★ 共价催化是指酶在催化过程中必须与底物上的某些基团暂时形成不稳定的共价中间物的一种催化方式。许多氨基酸残基的侧链可作为共价催化剂，例如Lys、His、Cys、Asp、Glu、Ser或Thr，此外，一些辅酶或辅基也可以作为共价催化剂，例如硫胺素焦磷酸（TPP）和磷酸吡哆醛。

(5) 共价催化

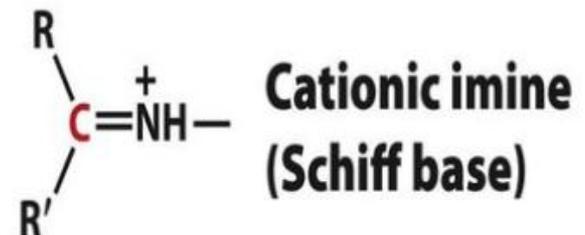
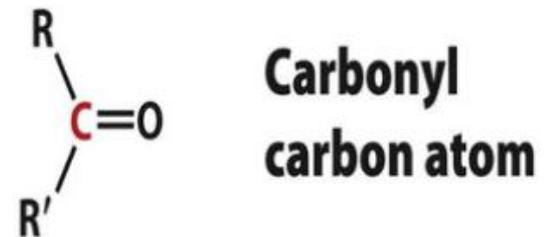
Nucleophiles 亲核基团



Electrophiles 亲电基团

H^+ Protons

M^{n+} Metal ions

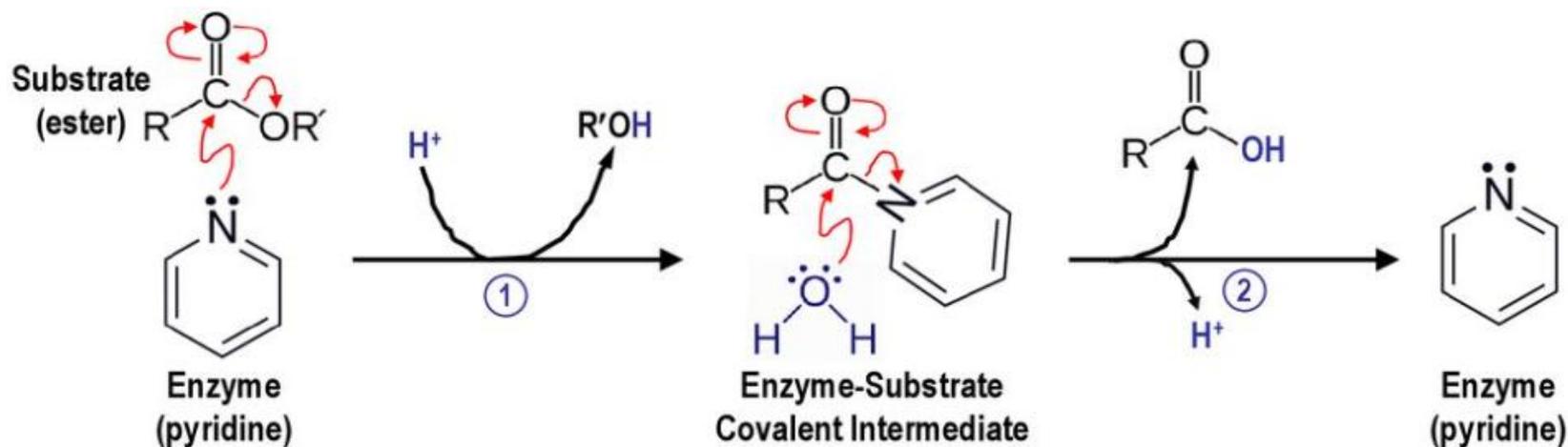


(5) 共价催化

| 亲核基团 | 实例 | 共价中间物 |
|--------------------------|--|-------|
| Ser (-OH) | 丝氨酸蛋白酶 | 脂酰化酶 |
| Cys (-SH) | 半胱氨酸蛋白酶 | 脂酰化酶 |
| Asp (-COO-) | Na ⁺ /K ⁺ -ATP 酶 | 磷酸化酶 |
| Lys (ε-NH ₂) | 乙酰乙酸脱羧酶和第一类醛缩酶 | 希夫碱 |
| His (咪唑基) | 甘油酸磷酸变位酶 | 磷酸化酶 |
| Tyr (-OH) | 谷氨酰胺合成酶 | 腺苷酸化酶 |
| TPP | 丙酮酸脱羧酶和转酮酶 | 羟乙基化酶 |

几种酶的共价催化

(5) 共价催化

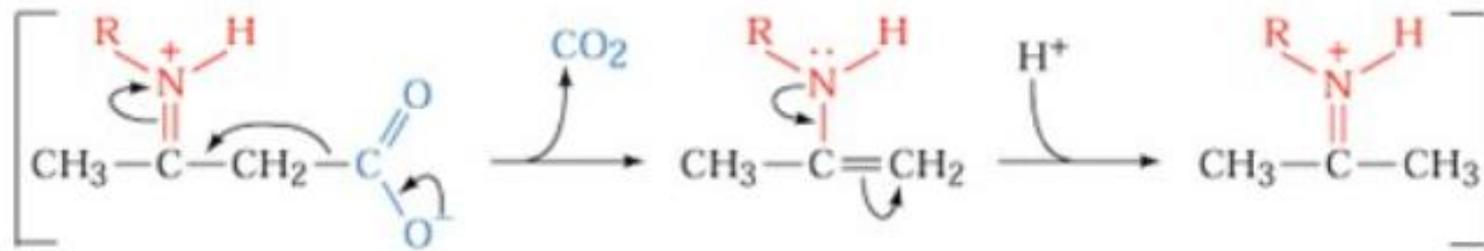
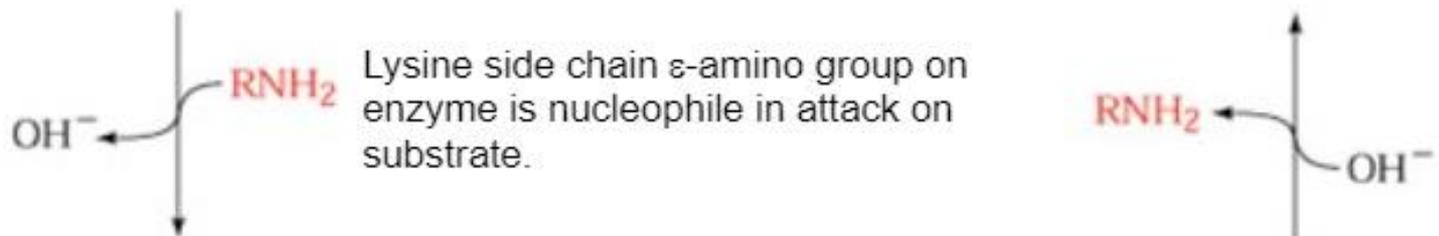
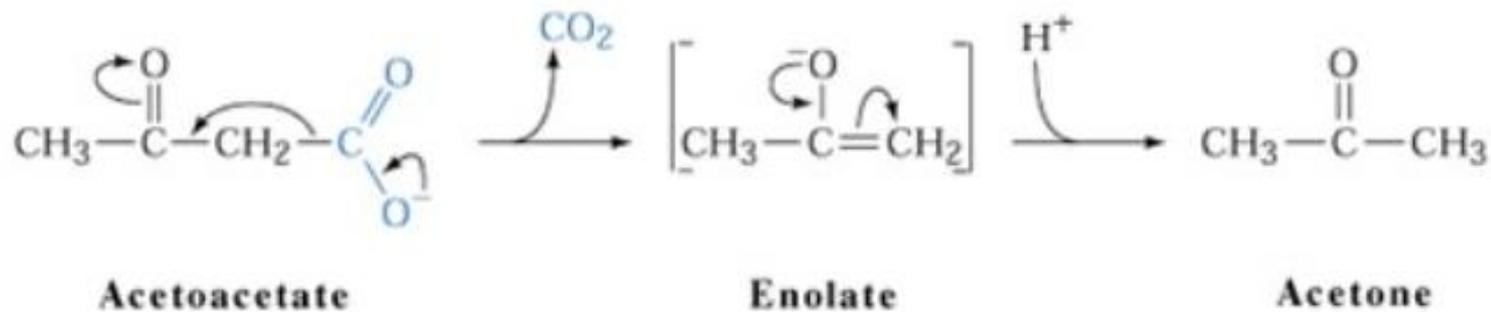


亲核催化

酶的催化机制



(5) 共价催化

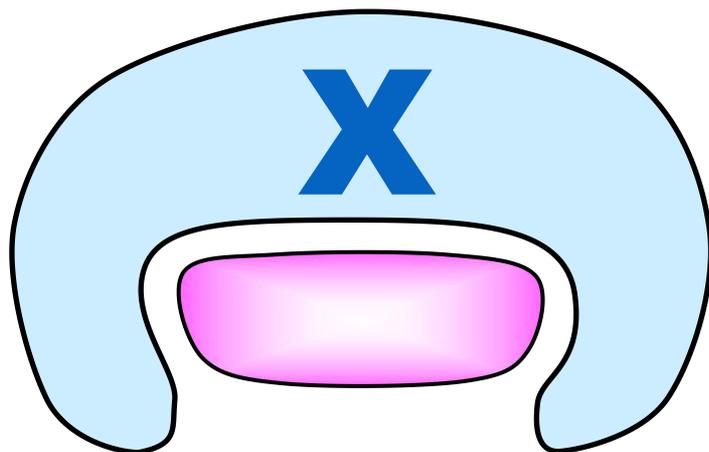


Schiff base (imine) Electrophilic "electron sink"

乙酰乙酸脱羧酶的亲核催化

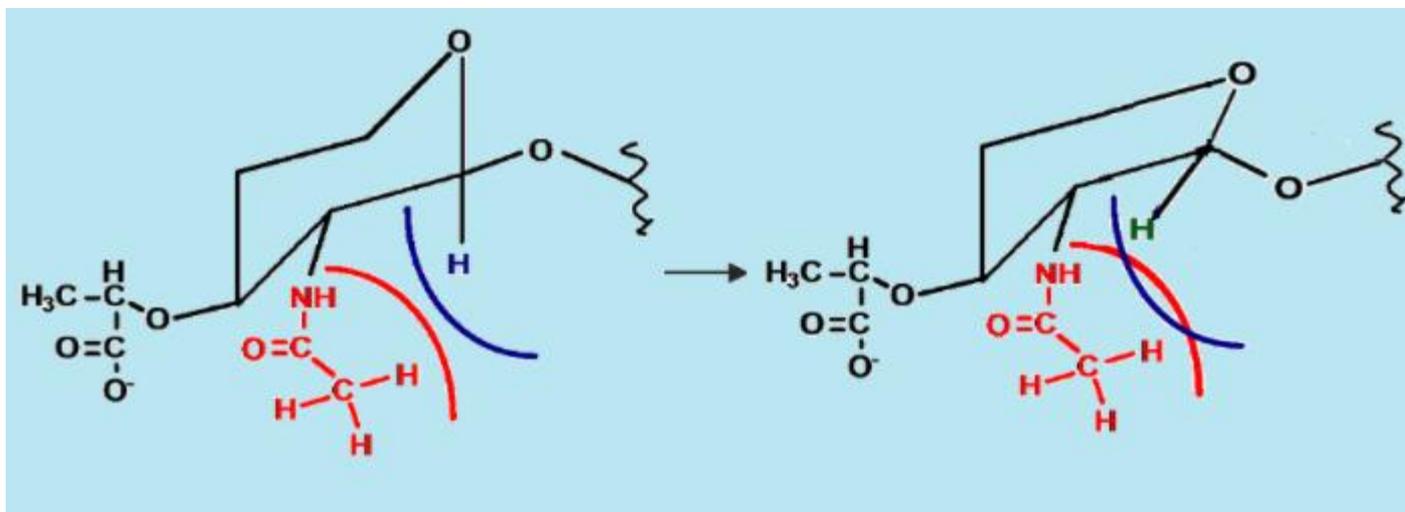
(6) 底物形变

★底物形变是指当酶与底物相遇时，酶分子诱导底物分子内敏感键更加敏感，产生“电子张力”发生形变，比较接近它的过渡态。



(6) 底物形变

- ★ 溶菌酶也利用这种方式进行催化：与溶菌酶活性中心结合的6碳糖在溶菌酶的诱导下，从椅式构象变成半椅式构象而发生形变，周围的糖苷键更容易发生断裂。



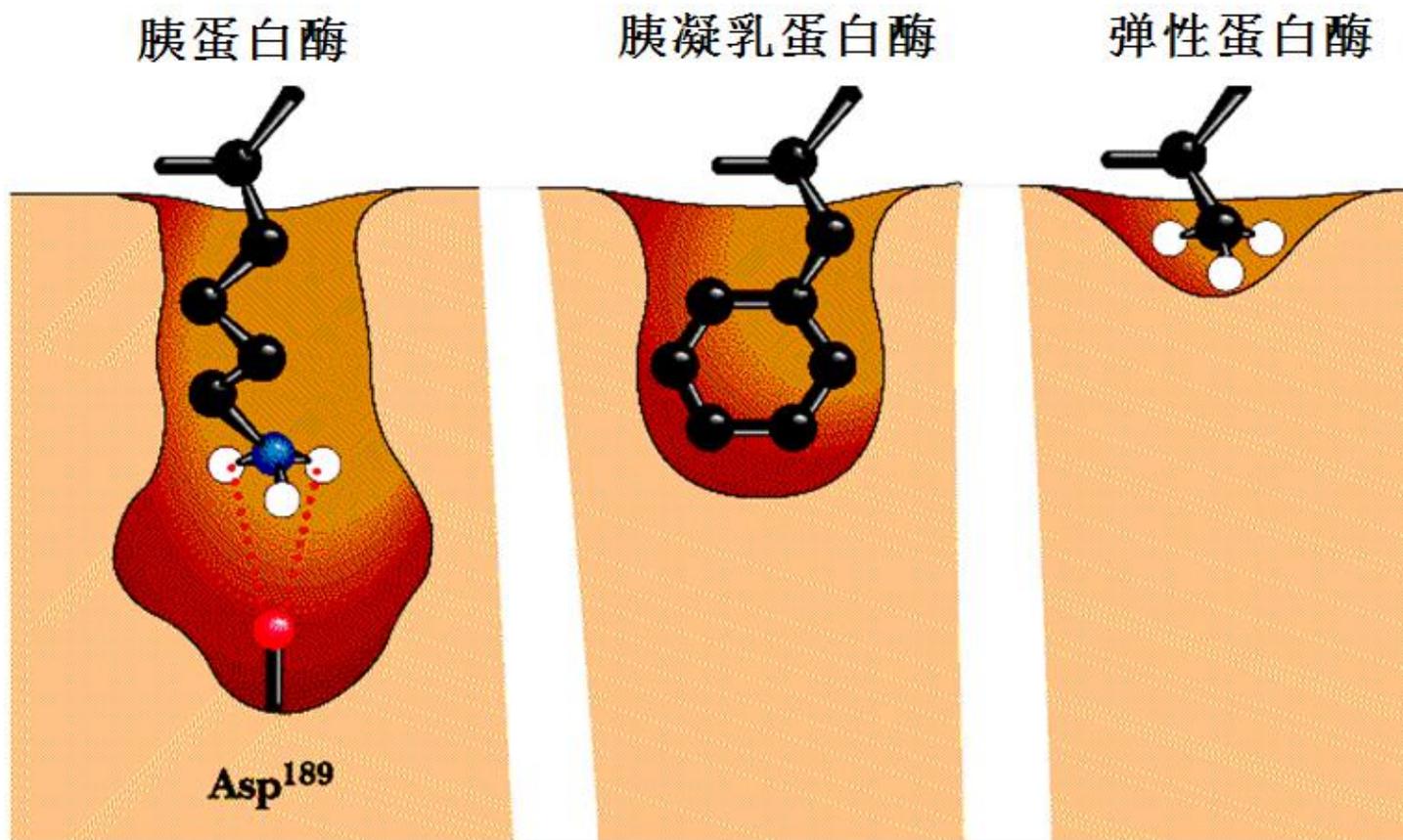
➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

1. 蛋白酶

- 蛋白酶是催化肽键水解的一类酶的总称。
 - 根据**活性中心催化基团**的性质，蛋白酶可以分为四类：
 - 丝氨酸蛋白酶
 - 巯基蛋白酶
 - 金属蛋白酶
 - 天冬氨酸蛋白酶
- } 涉及共价催化，两次亲核进攻
- 所有蛋白酶在催化过程中都经历四面体的过渡态，原因是什么？

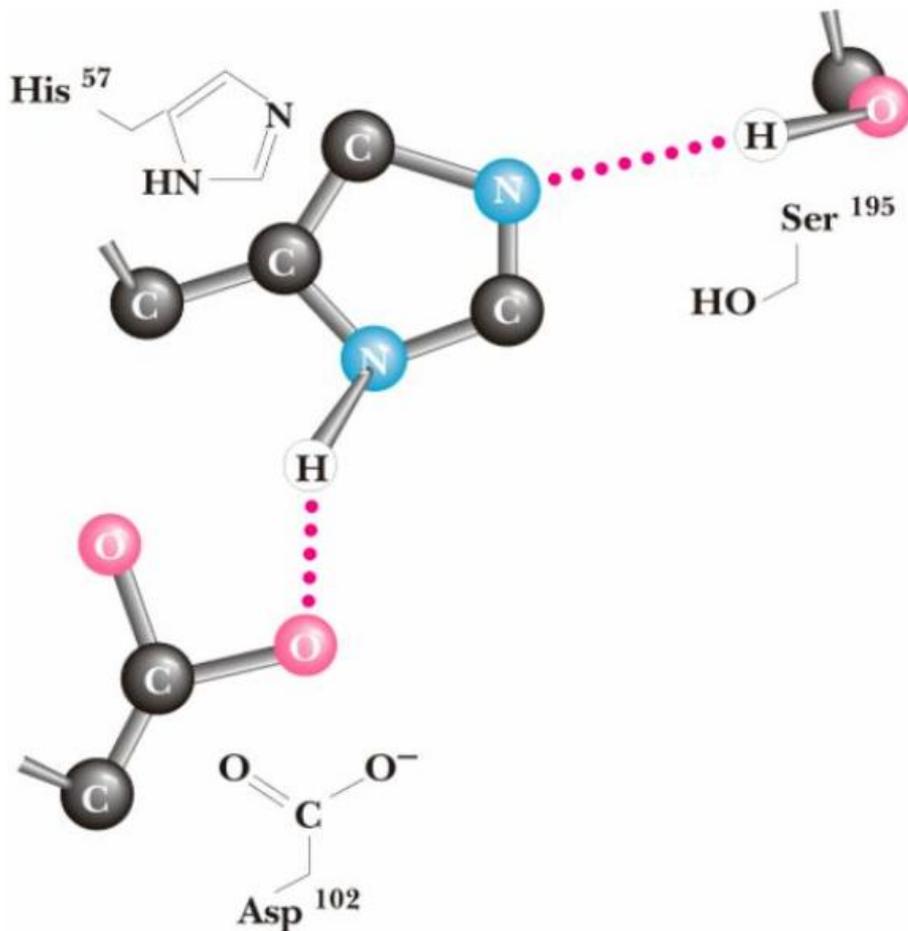
➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(1) 丝氨酸蛋白酶



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(1) 丝氨酸蛋白酶

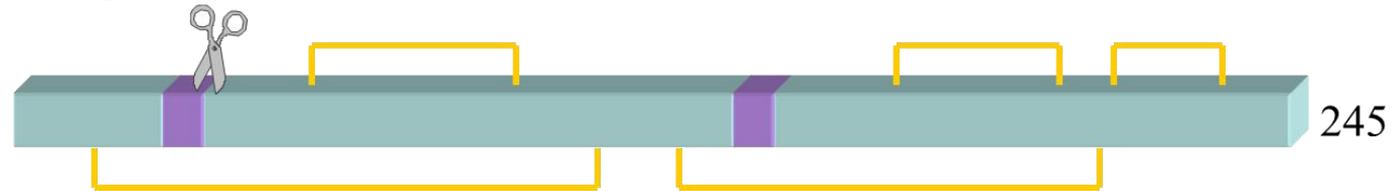


丝氨酸蛋白酶的催化三元体

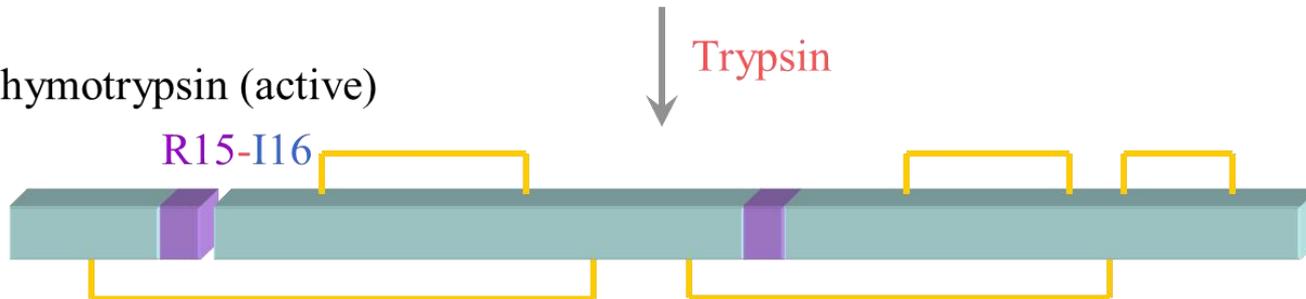
几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶

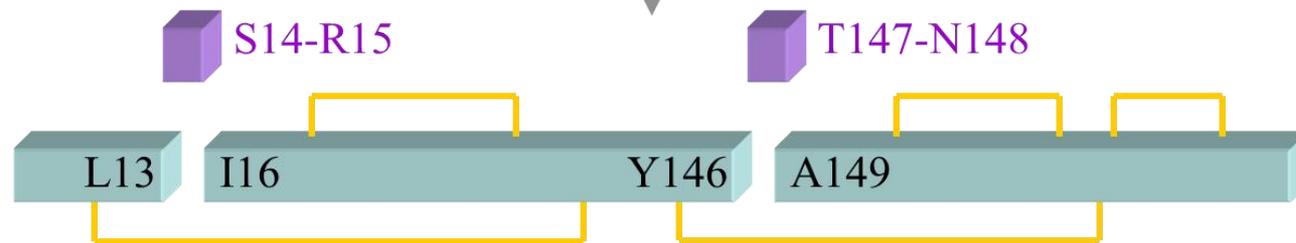
Chymotrypsinogen (inactive)



p-Chymotrypsin (active)



p-Chymotrypsin

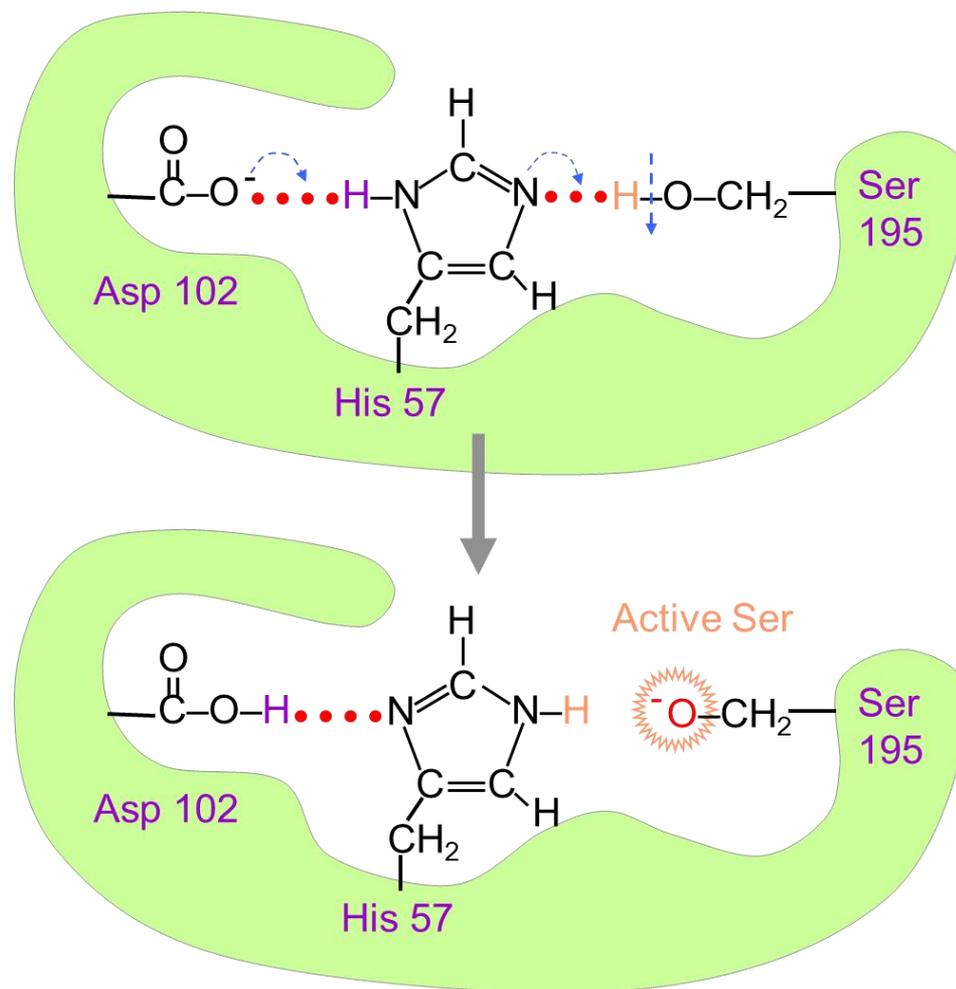


a-Chymotrypsinogen (active)

Disulfide bonds

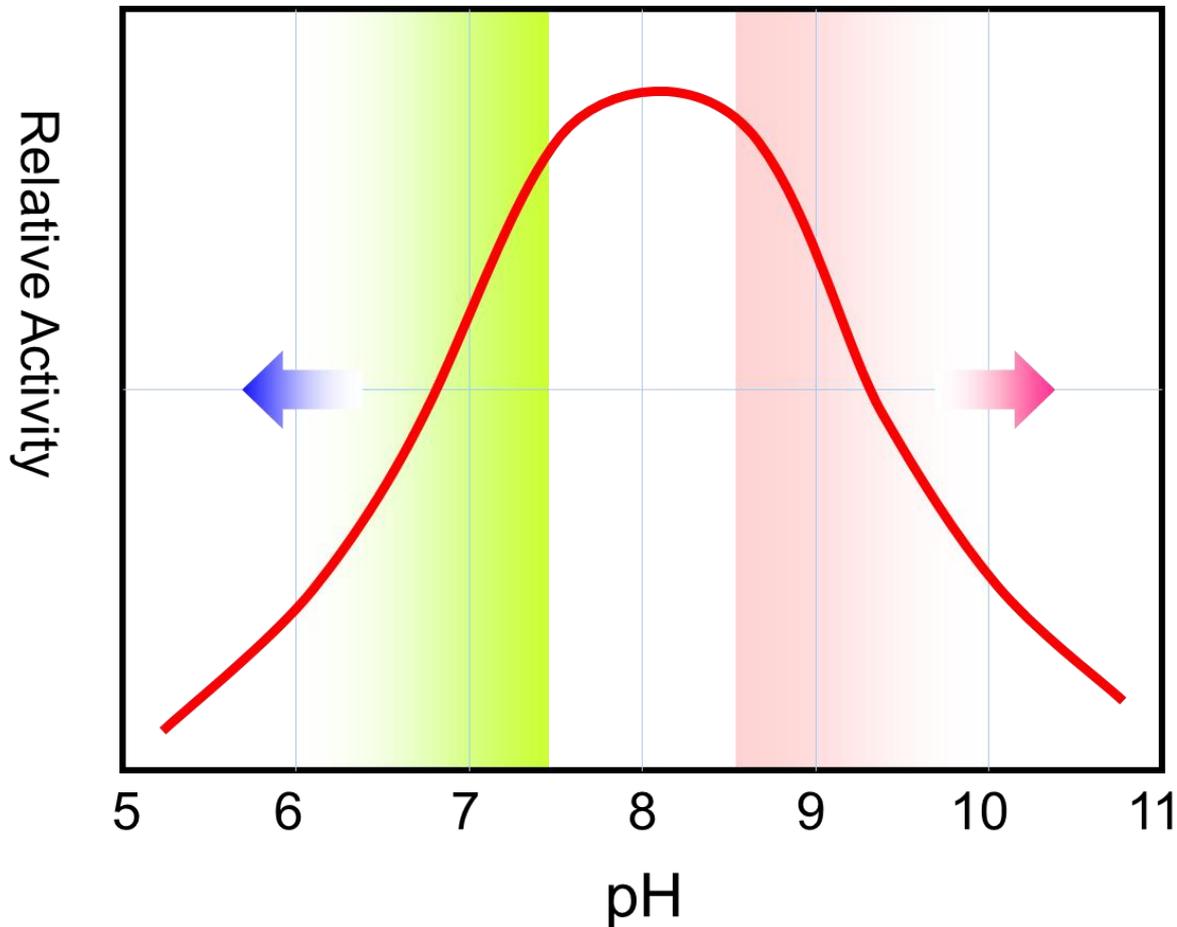
几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

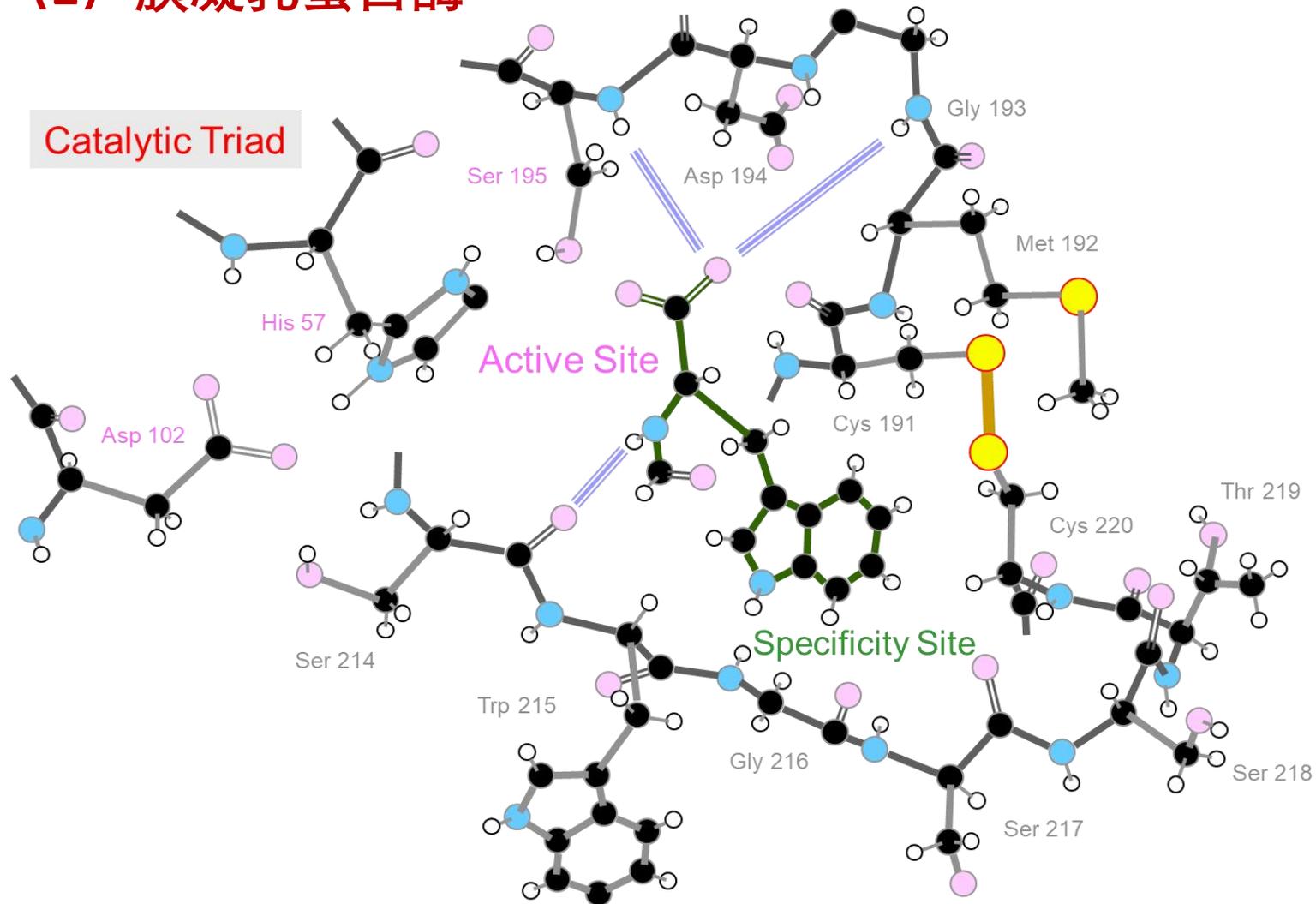
(2) 胰凝乳蛋白酶



为什么胰凝乳蛋白酶的活性随pH降低下降很快？

➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

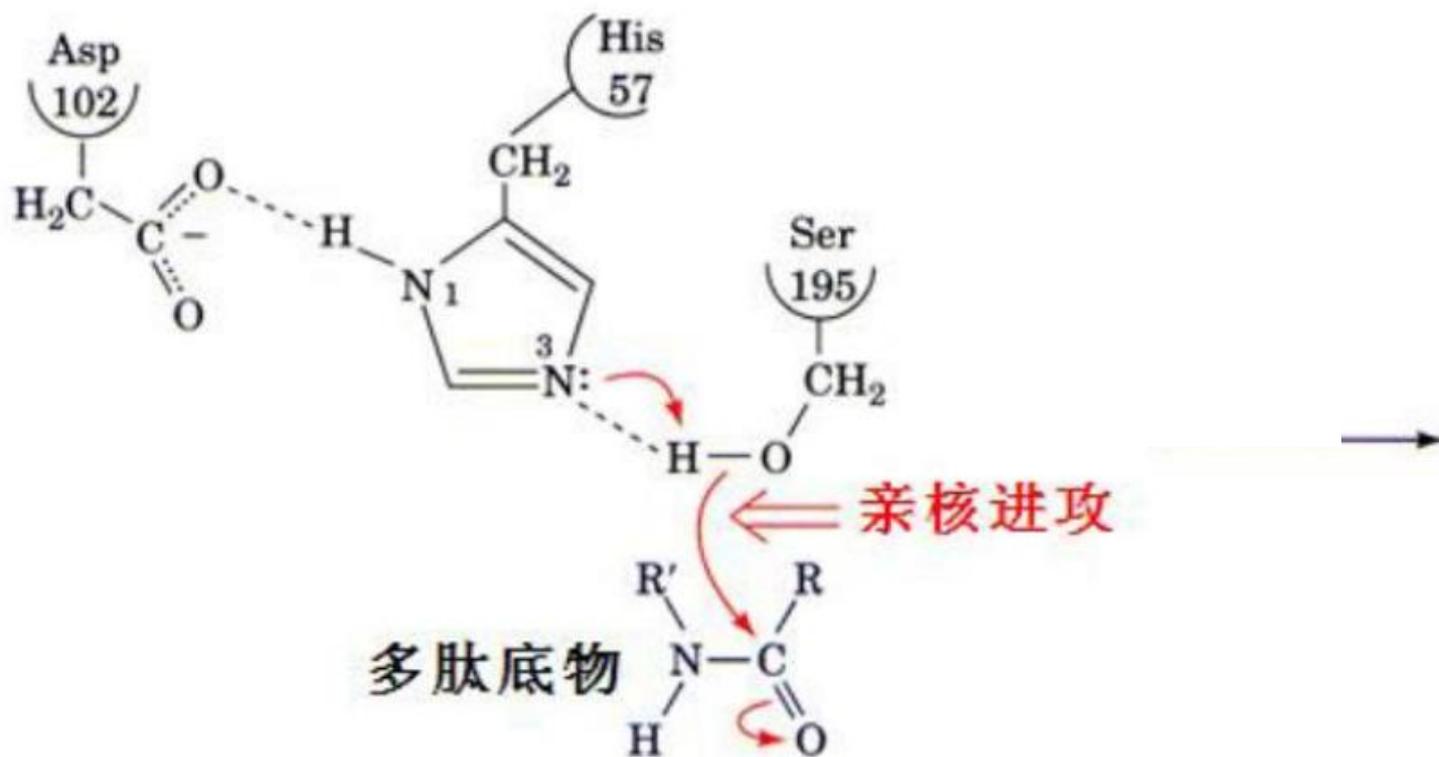
(2) 胰凝乳蛋白酶



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶 催化第一步

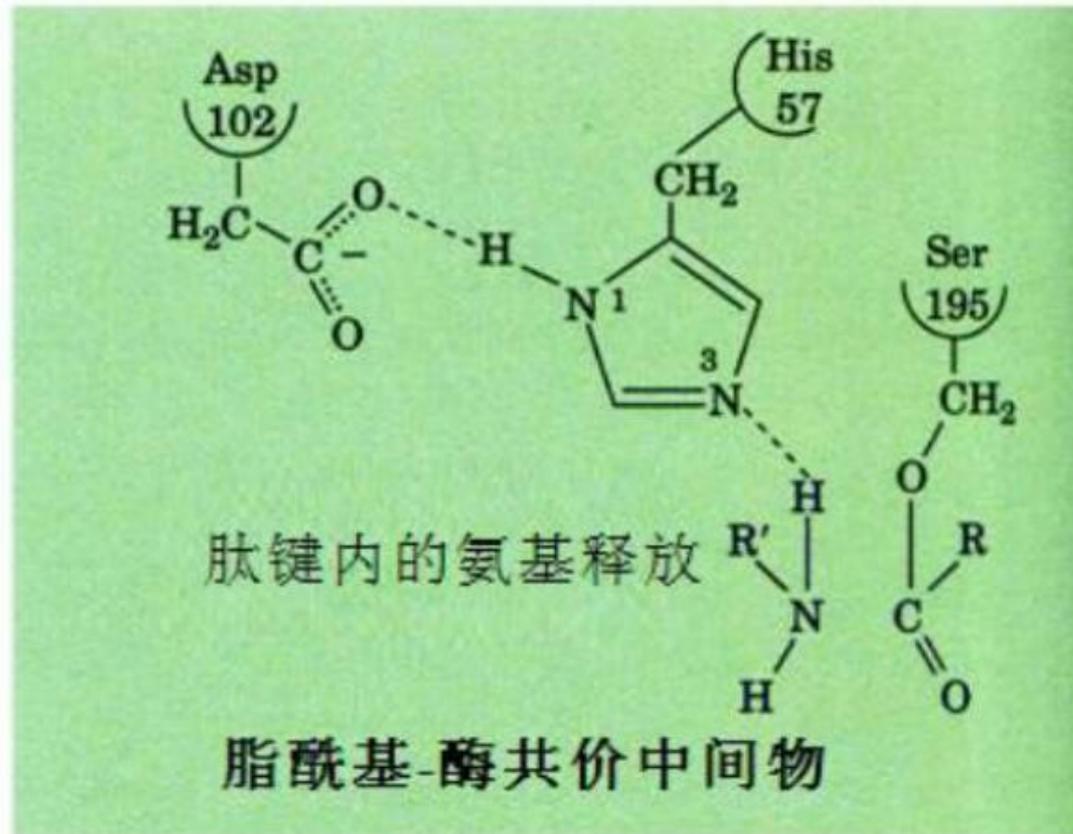
底物与活性中心的Ser195和Gly193残基通过氢键形成ES复合物，疏水口袋正好容纳芳香环；



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶 催化第三步

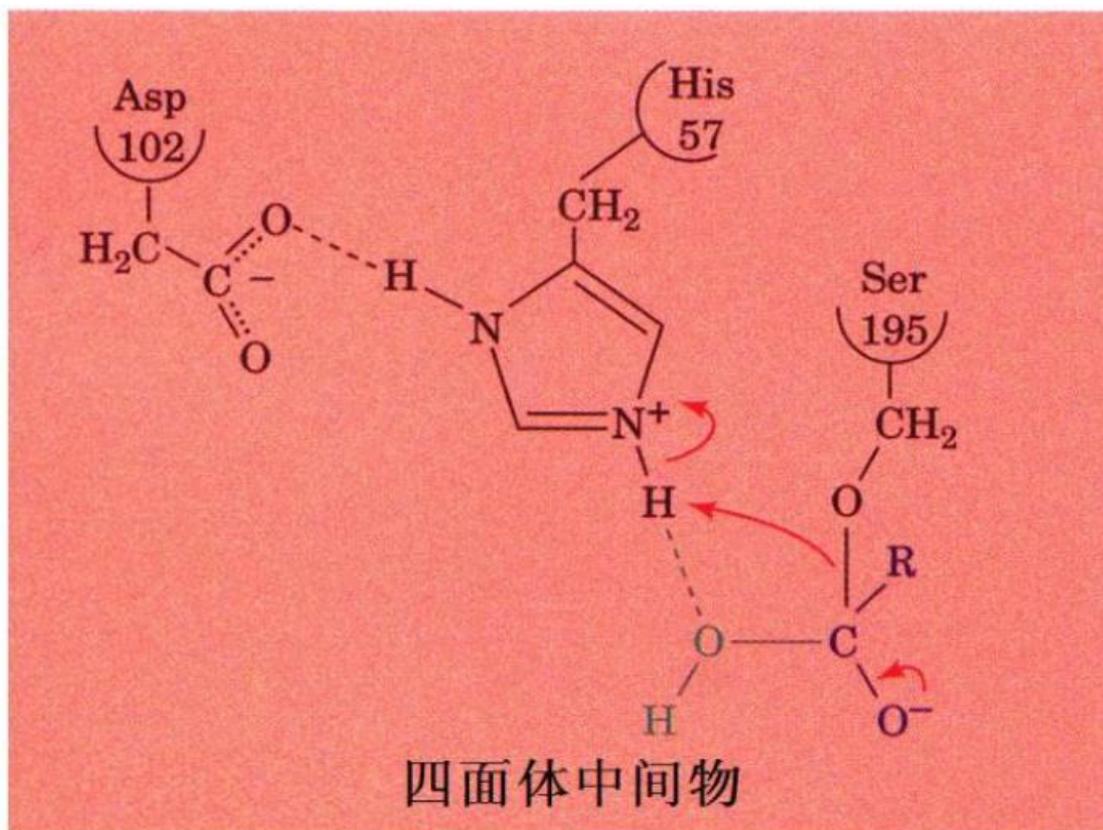
肽键断裂，离开基团（原来肽键的氨基一侧作为第一产物）从His57咪唑环上得到一个质子。原来肽键的羧基一侧通过氢键以及与Ser195形成的共价键仍然与酶结合。



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶 催化第四步

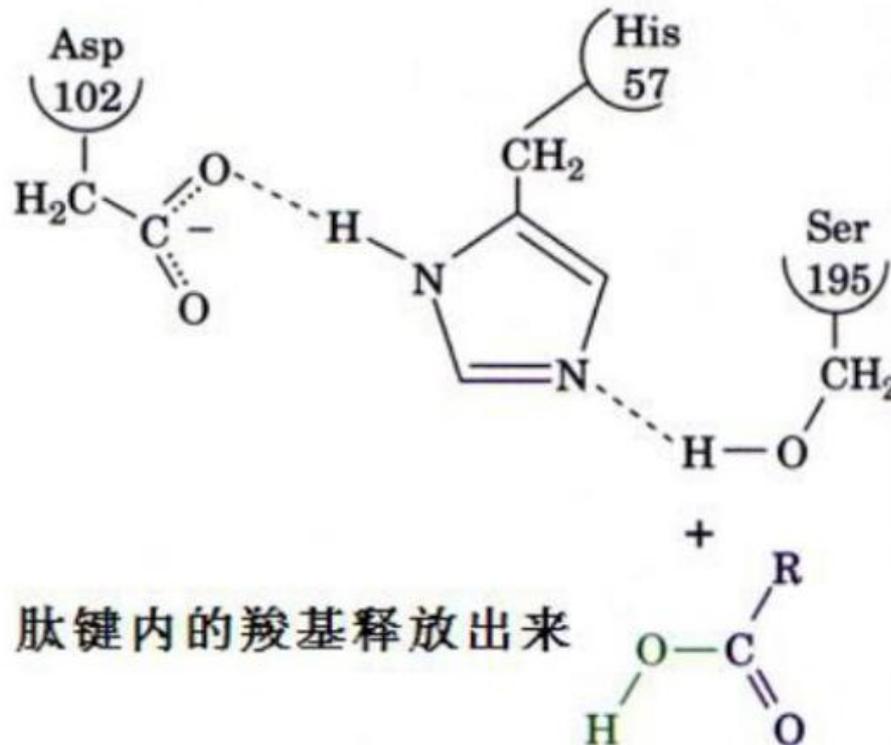
水进入活性中心，质子化His57使之成为酸。而释放出来的OH⁻亲核进攻留下来的多肽羰基碳，于是第二个四面体形的过渡态中间物形成了。



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶 催化第五步

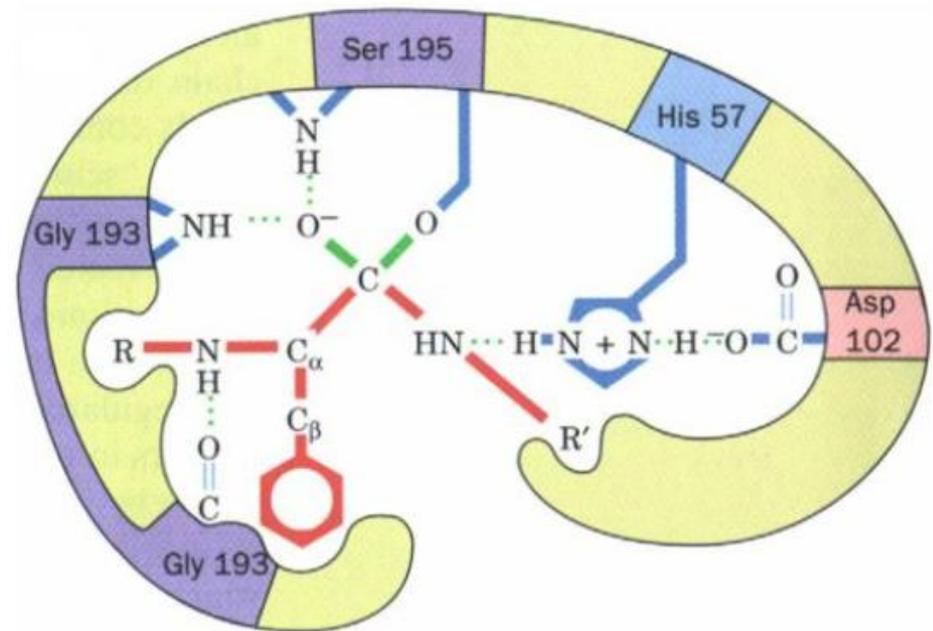
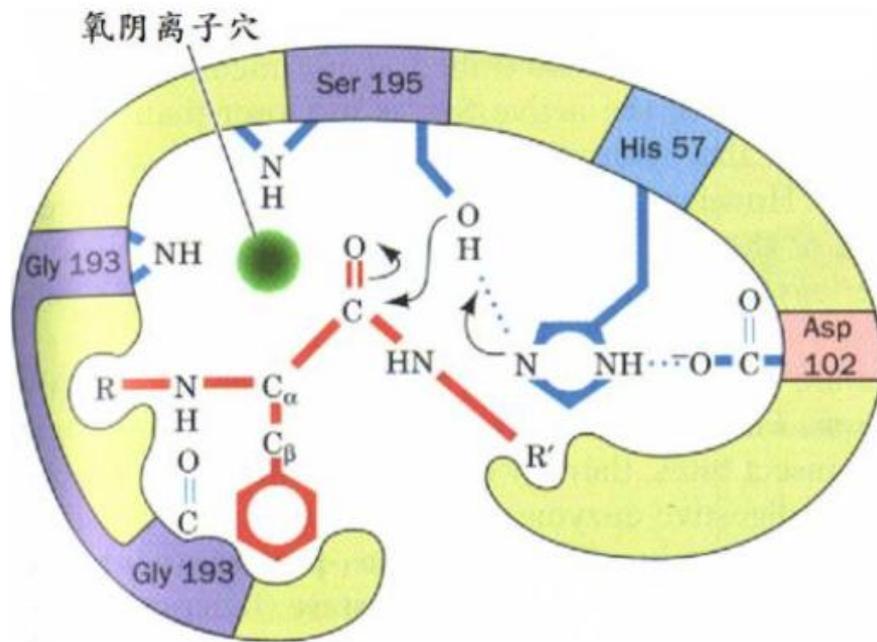
Ser195从His57重新得到质子，His57仍然与它通过氢键相连，过渡态中间物瓦解，脂酰化酶中间物被水解，残留的多肽部分（第二产物）被释放。



酶恢复到原来的状态

➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

(2) 胰凝乳蛋白酶催化的四面体中间物的形成及其稳定



➤ 几种常见的酶的结构和催化机制

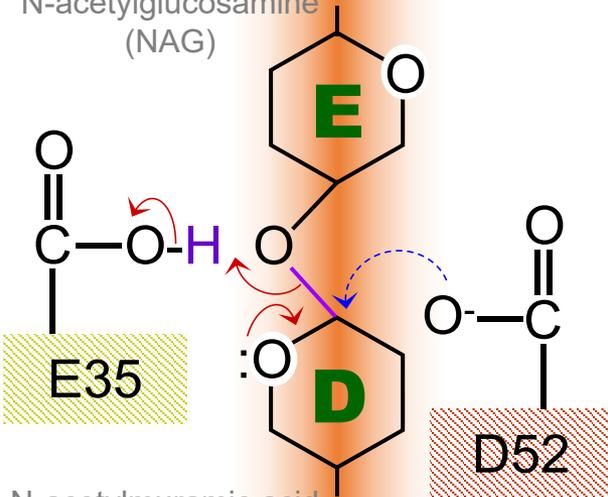
2. 溶菌酶 (lysozyme)

- 溶菌酶是由129个氨基酸残基组成的单一肽链蛋白质；
- 是第一个使用X射线得到的三维结构的酶；
- 水解细菌细胞壁上的肽聚糖的糖苷键。

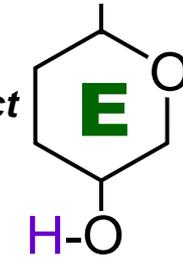
酶的催化机制



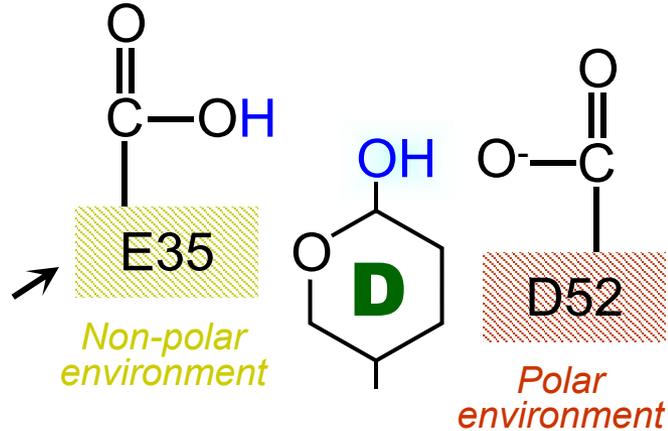
N-acetylglucosamine (NAG)



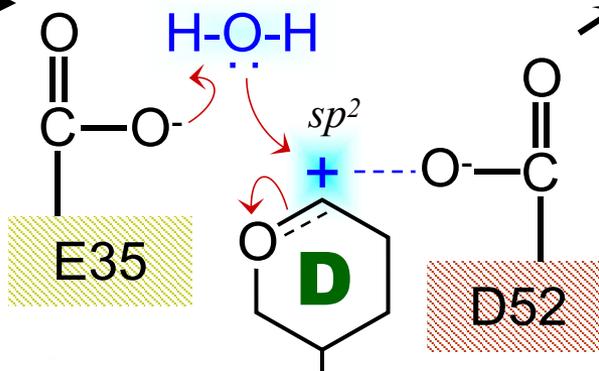
First product



兩個酸基在 pH 5 下有不同形式



N-acetylmuramic acid (NAM)



Electrostatic catalysis

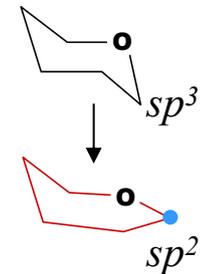
Chair → Half-chair

NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-NAM-

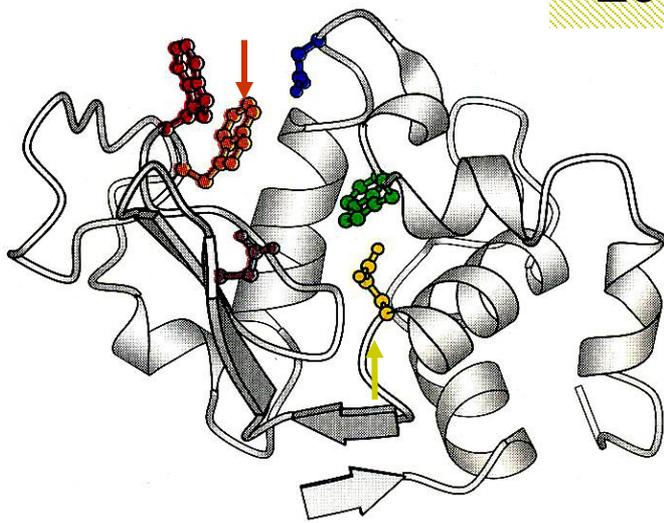


H-bonds

Substrate binding site



(A)



(B) N 1 35 52 62,63 101 108 129 C

溶菌酶的催化