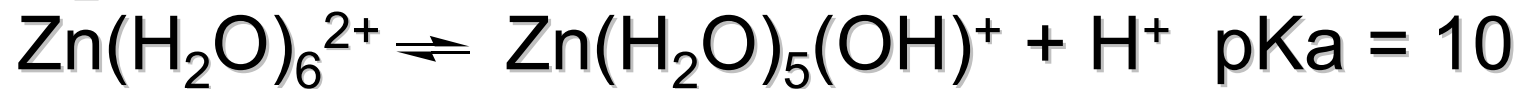


Catalyse acide-base: Enzymes à Zinc

- I. Introduction
- II. Enzymes hydrolytiques monoZinc:
Carboxypeptidase
- III. Lyase: Anhydrase carbonique
- IV. Enzyme hydrolytique diZinc
- V. Conclusion

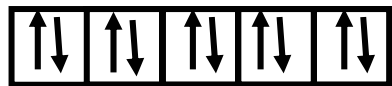
I. Introduction

- Couche d pleine
- En milieu biologique: Etat d'oxydation +II uniquement ($E^{\circ}_{\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}} \ll 0\text{V}$)
 - Pas de chimie rédox
- Fort acide de Lewis
 - Catalyse acide-base



Caractérisation

- Couche d pleine (à priori pas un métal d)



- Pas de transitions électroniques possibles
 - Diamagnétique → Complexes incolores
- Caractérisation par diffraction des RX
essentiellement (RMN, IR aussi)

Propriétés de complexation

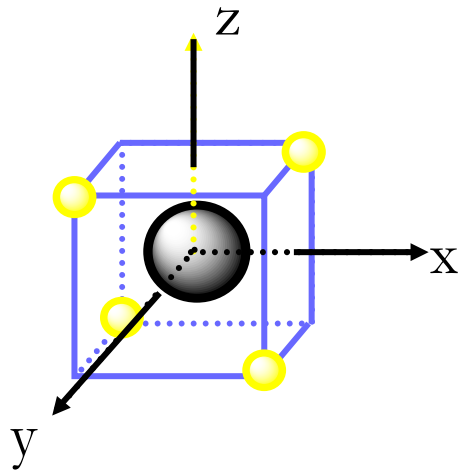
- Sphère de coordination: 4 à 5 atomes
- Théorie HSAB:

<i>Hard Acids</i>	<i>Borderline Acids</i>	<i>Soft Acids</i>
H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ BF ₃ , BCl ₃ , B(OR) ₃ Al ³⁺ , Al(CH ₃) ₃ , AlCl ₃ , AlH ₃ Cr ³⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Co ³⁺	B(CH ₃) ₃ Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ Rh ³⁺ , Ir ³⁺ , Ru ³⁺ , Os ²⁺	BH ₃ , Tl ⁺ , Tl(CH ₃) ₃ Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Cd ²⁺ , Hg ₂ ²⁺ , Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , [Co(CN) ₅] ³⁻ , Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Pt ⁴⁺ , Br ₂ , I ₂ Metals with zero oxidation state π acceptors: e.g., trinitrobenzene, quinones, tetracyanoethylene
Ions with oxidation states of 4 or higher HX (hydrogen-bonding molecules)		

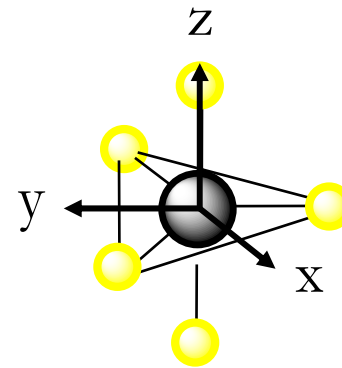
→ Tous les acides aminés et groupements prosthétiques sont des ligands potentiels

Géométries les plus courantes

Tétraèdre



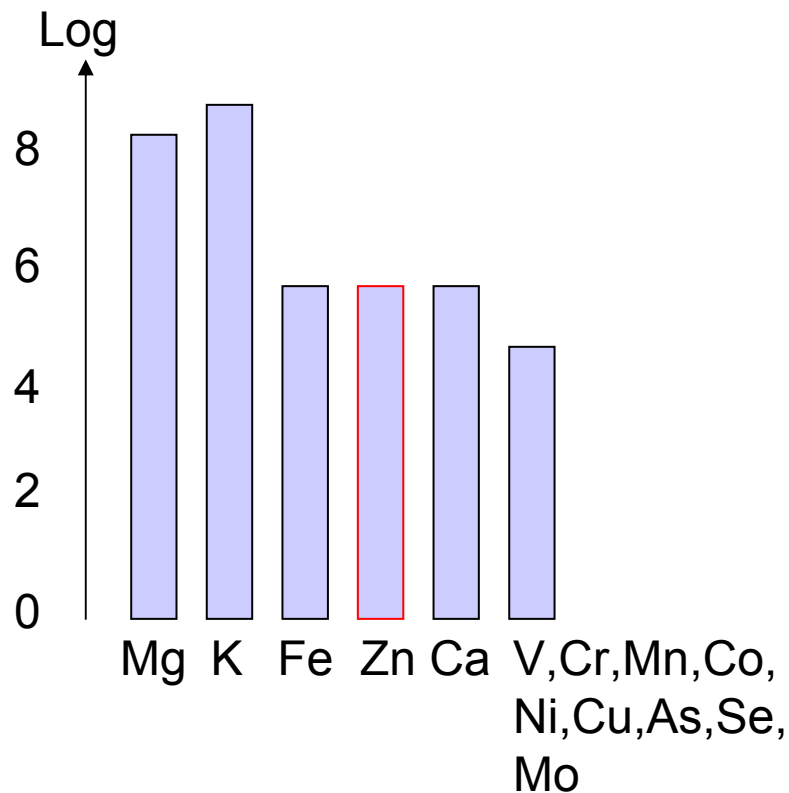
Bipyramide trigonale



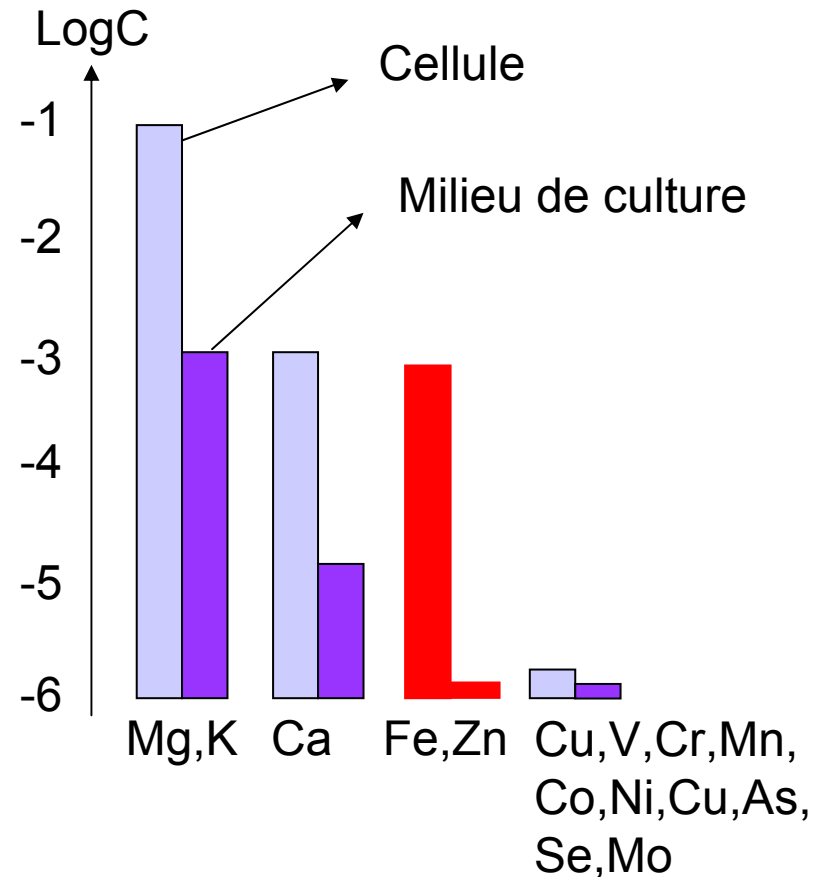
Octaèdre plus rare

Concentration en métaux au niveau cellulaire

● Nb atome / Cellule
(*E. Coli*)



● Concentration



L'ion Zn(II) en biologie

- $[Zn^{2+}] = 0.5 \text{ mM}$ en moyenne dans les cellules (jusqu'à 4 mM dans les cellules β pancréatiques)
- Organes humains: 20-30 mg/g, os 60-180 mg/g
- Propriétés fondamentales de l'ion Zn(II) exploitées par les métalloenzymes:
 - Acidité de Brønsted et de Lewis
 - Rôle structural, positionnement de substrat.
- Historique:
 - 1939: Découverte de l'anhydrase carbonique, première protéine à Zinc décrite.
 - 2008: Près de 80 métalloprotéines à Zn^{2+} (nucléases, peptidases...)

Le Zn^{2+} se retrouve impliqué dans:

- Enzymes hydrolytiques:
 - Carboxypeptidase (monozinc)
 - Phosphatase (dizinc)
- Lyase:
 - Anhydrase carbonique

Rôle catalytique

- Oxydo-réductase:
 - Alcool déshydrogénase
- Fixation à l'ADN:
 - Protéines à « doigt de zinc »

Rôle structural



Le Zn^{2+} se retrouve impliqué dans:

- Enzymes hydrolytiques:
 - Carboxypeptidase (monozinc)
 - Phosphatase (dizinc)
- Lyase:
 - Anhydrase carbonique

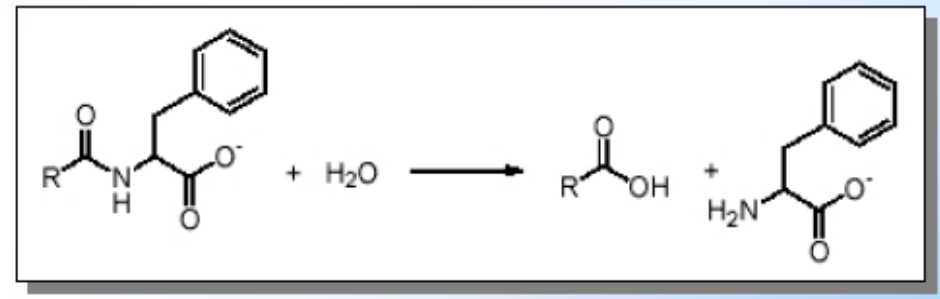
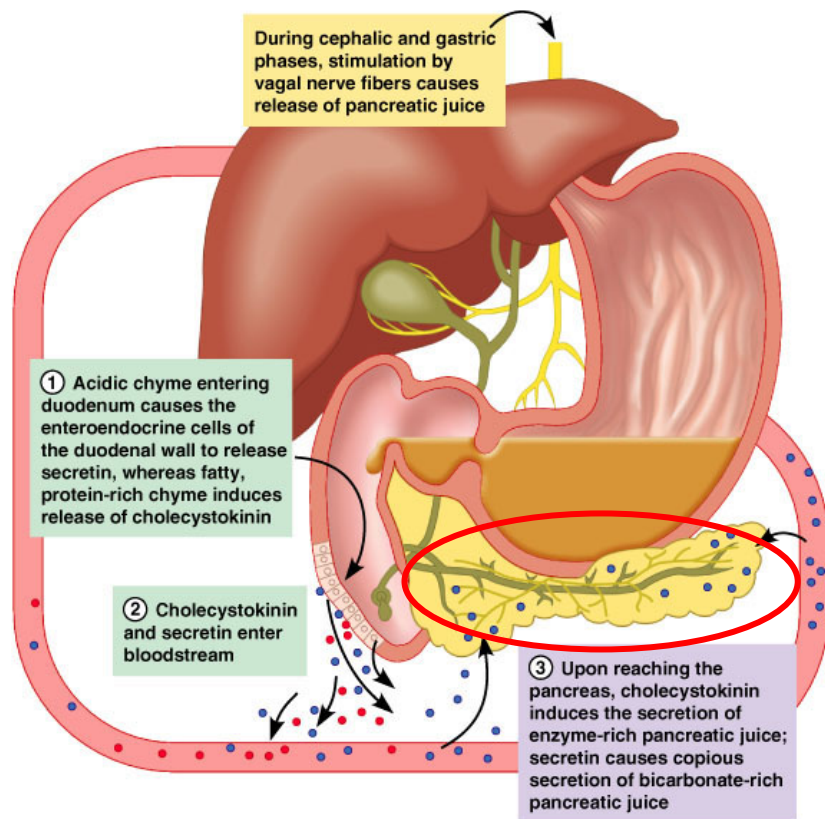
Rôle catalytique

- Oxydo-réductase:
 - Alcool déshydrogénase
- Fixation à l'ADN:
 - Protéines à « doigt de zinc »

Rôle structural

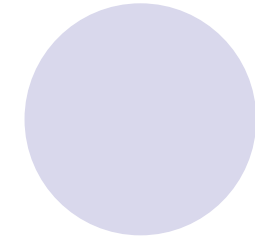
II. Enzymes hydrolytiques: Carboxypeptidase

- Enzyme pancréatique impliquée dans la digestion des protéines



Autres peptidases pancréatiques:
Trypsine, chymotrypsine, elastase.

Coupure spécifique des liens peptidiques



Endopeptidases:
Coupure spécifique de liens peptidiques à l'intérieur d'une chaîne

Exopeptidases:
Coupure d'un acide aminé N- ou C-terminal d'une chaîne peptidique

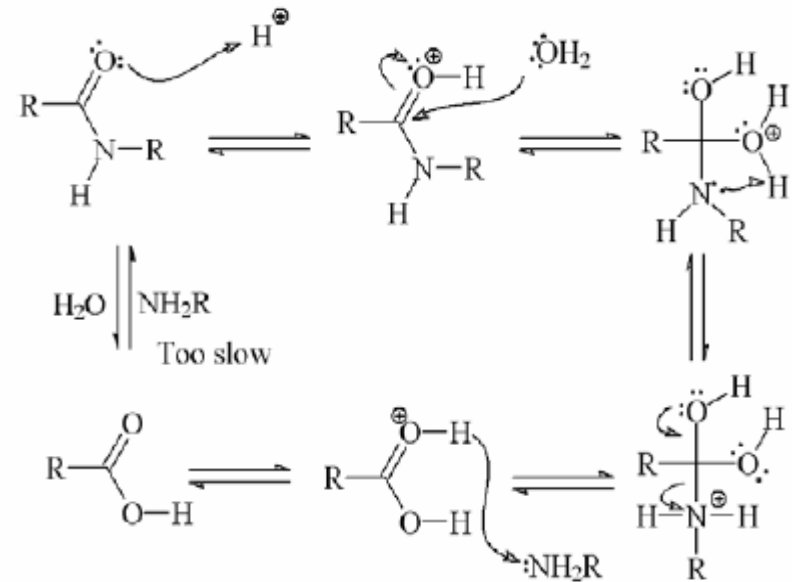
Enzyme	Specificity
<i>Endopeptidases</i>	
Trypsin	$R_{n-1} = \text{Arg, Lys}$ $R_n \neq \text{Pro}$
Pepsin	$R_n = \text{Leu, Phe, Trp, Tyr, Val}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Chymotrypsin	$R_{n-1} = \text{Phe, Trp, Tyr}$ $R_n \neq \text{Pro}$
Endopeptidase GluC	$R_{n-1} = \text{Glu}$
<i>Exopeptidases</i>	
Leucine aminopeptidase	$R_1 \neq \text{Pro}$
Aminopeptidase M	all N-terminal residues
Carboxypeptidase A	$R_n \neq \text{Arg, Lys, Pro}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase B	$R_n = \text{Arg, Lys}$ $R_{n-1} \neq \text{Pro}$
Carboxypeptidase C	all C-terminal residues

- Hydrolyse de la liaison peptidique côté C-terminal (dans protéines, oligopeptides ...)
- Plusieurs formes distinctes: A,B,C qui diffèrent par leur préférence pour résidus terminaux.

Généralités: Hydrolyse de liens amides

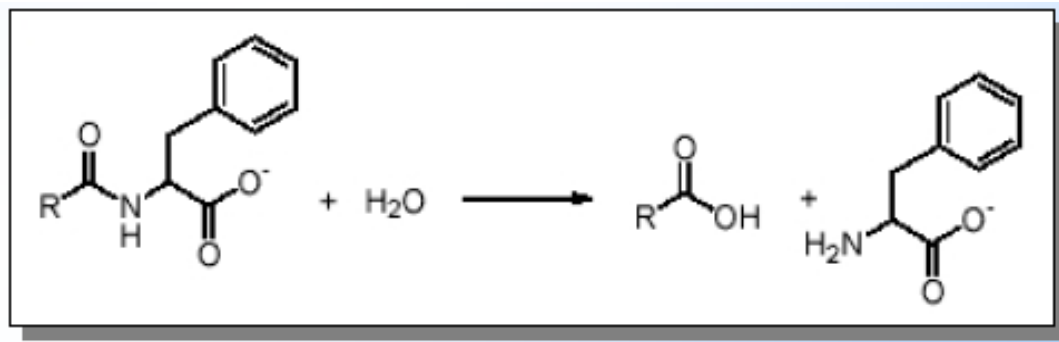
- Réaction très lente
- Catalyse acide ou basique l'accélère mais il faut chauffer et attendre
- Non spécifique

$k = 0.01 \text{ s}^{-1}$ sans enzyme,
 1000000 s^{-1} avec enzyme

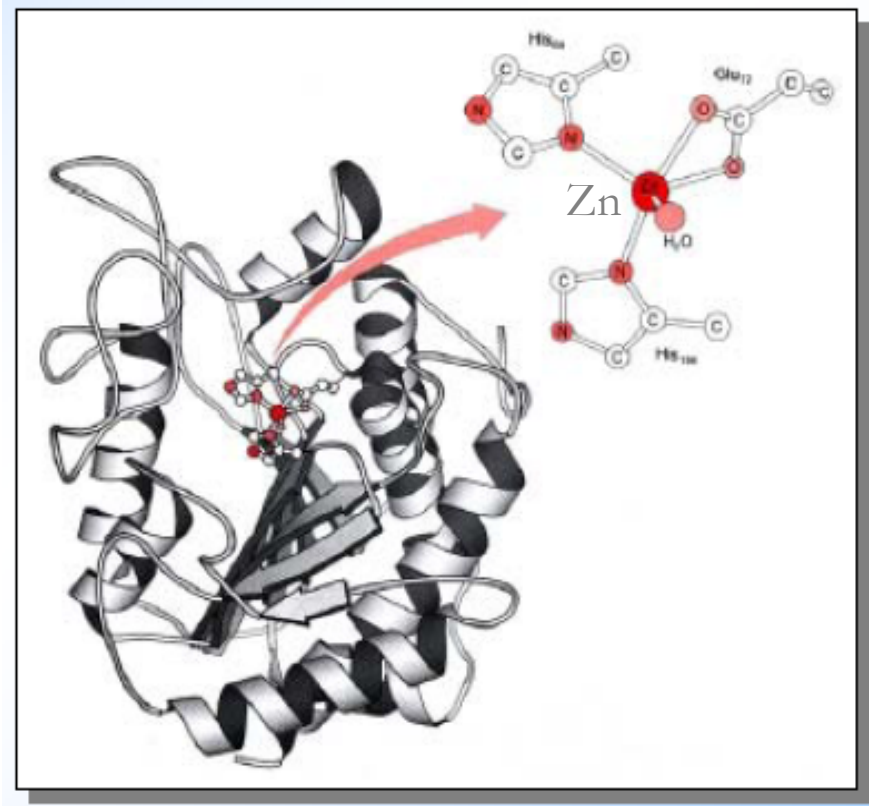


Carboxypeptidase

- Protéine globulaire monomérique constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 307 acides aminés (37% d'hélice α & 1% de feuillet β),
- Contient un seul atome de zinc



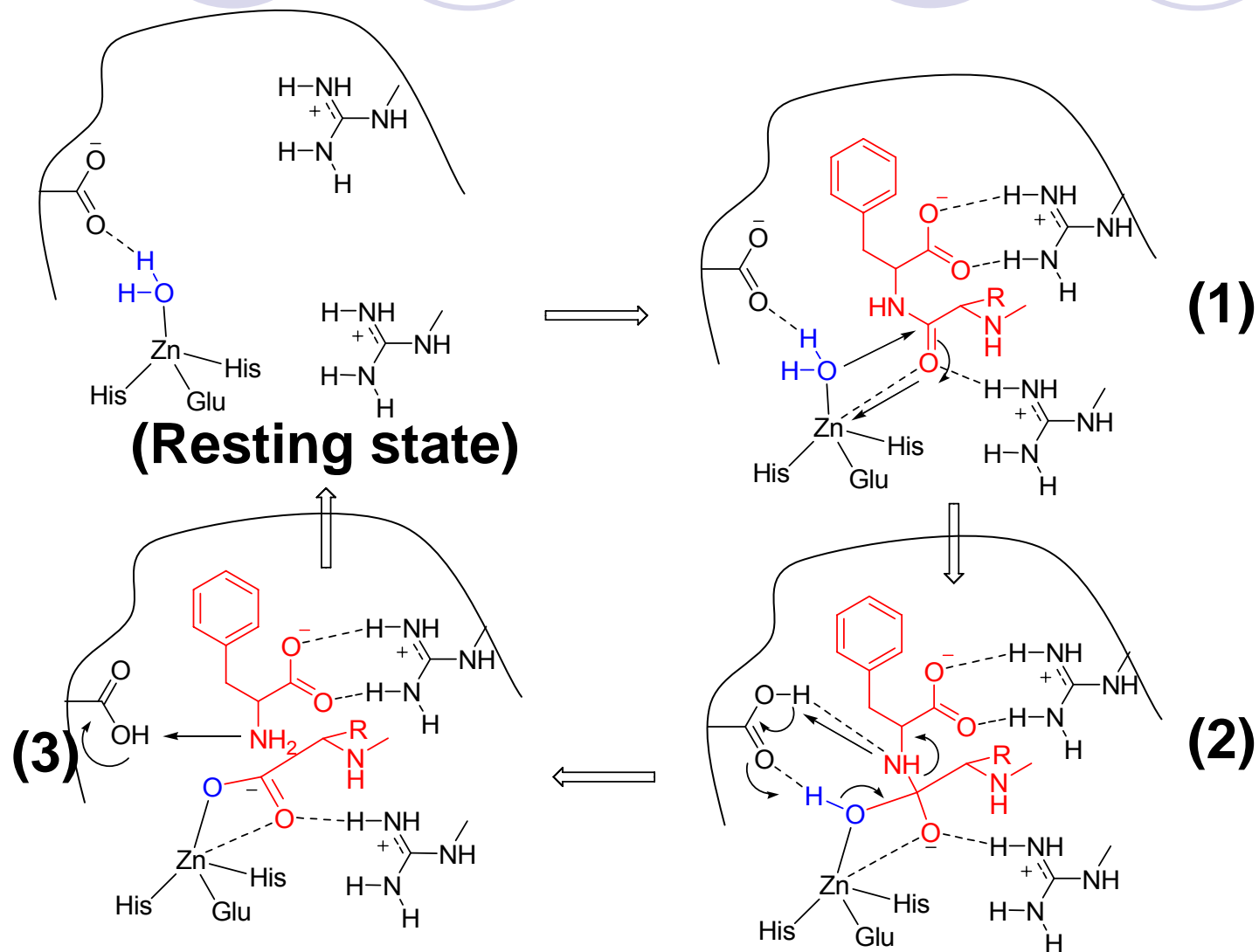
Comment l'enzyme fonctionne-t-elle?



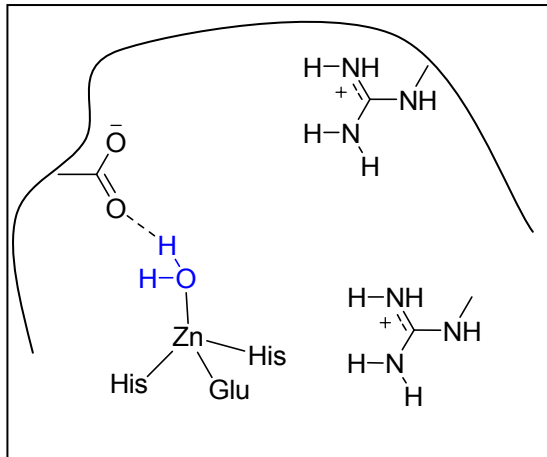
Structure du site actif

- Site actif:
- Zinc(II) pentacoordiné (bipyramide trigonale)
- 2 His, 1 Glu (bidentate), 1 molécule d'eau

Mécanisme proposé



Resting state



$\text{pK}_{\text{a}}_{\text{H}_2\text{O}} = 14$ dans H_2O
 10 dans $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$
 < 7 dans l'enzyme (assistance de Glu270)

Conséquence: Nucléophilie de H_2O augmente

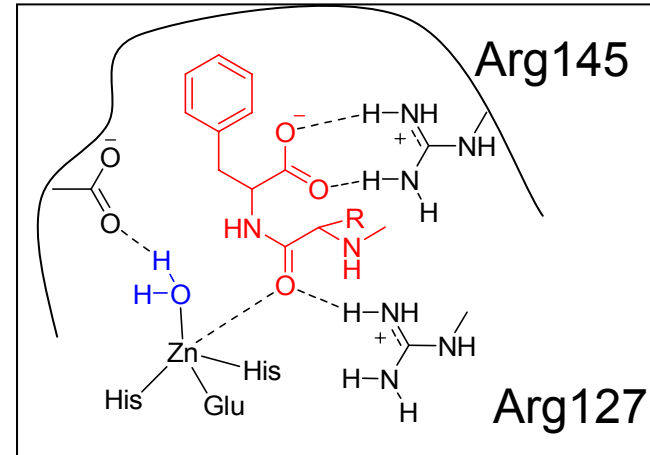
Intermédiaire 1

- Positionnement du substrat dans la cavité par liaisons H avec Arg127 et Arg145

→ Sélectivité du substrat

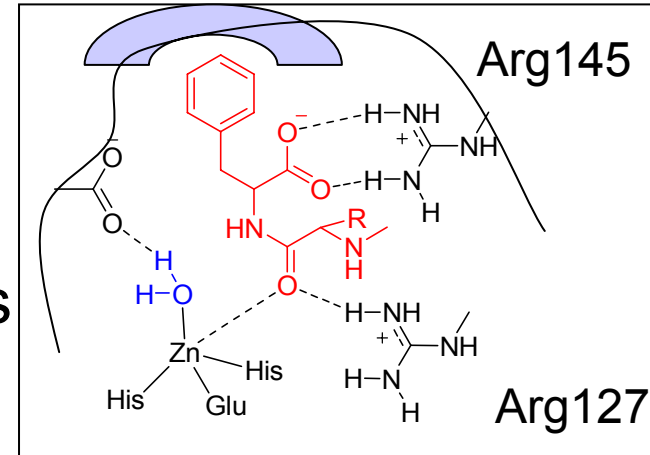
- C=O de la chaîne rendu plus électrophile par sa liaison avec Arg127

→ Réactivité de C=O augmente

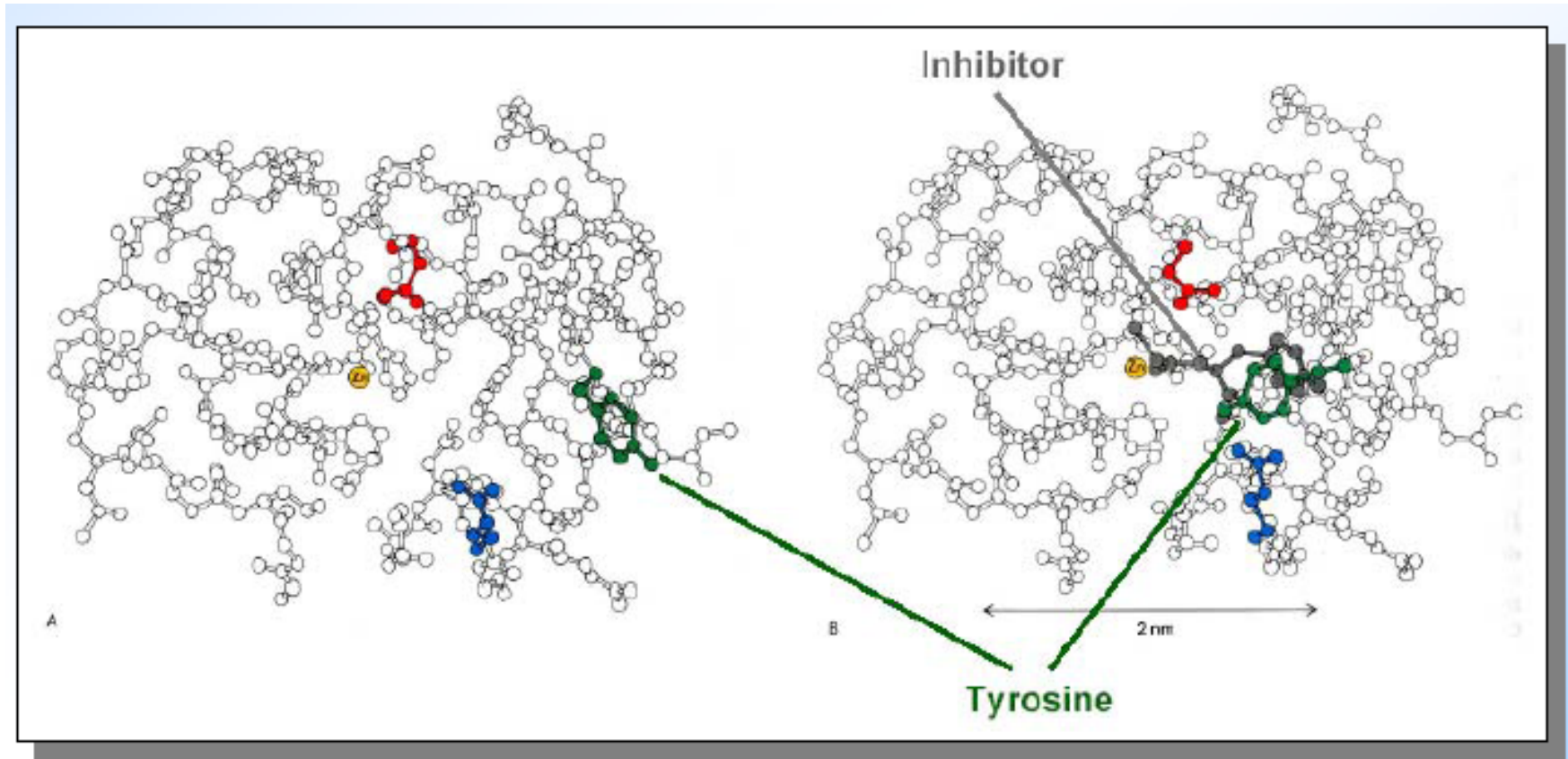


Intermédiaire 1

- Poche hydrophobe: Sélectivité de Carboxypeptidase A pour chaînes latérales aromatiques apolaires.
- Pour la Carboxypeptidase B la poche comporte des résidus anioniques qui vont interagir avec des résidus basiques du substrat d'où spécificité de cette enzyme pour peptides comportant un résidu terminal basique



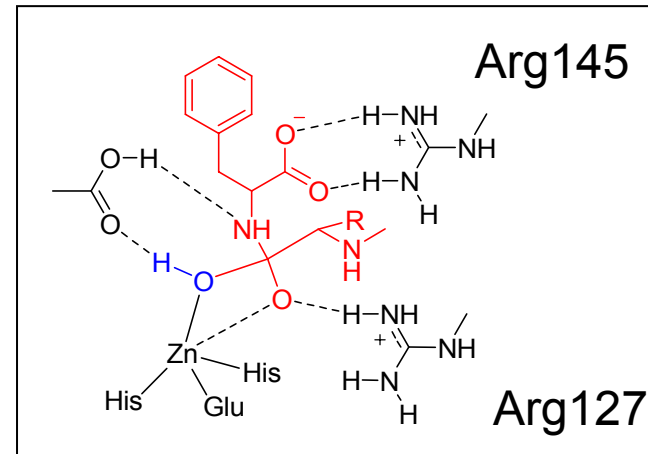
Fixation du substrat: Ajustement induit



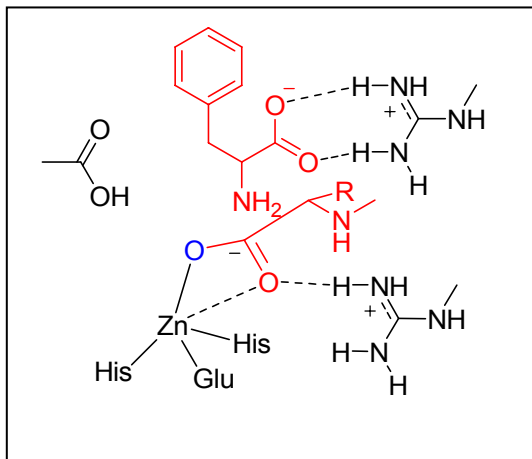
Le groupement OH de la Tyr248 migre de 12 Å (25% du diamètre de la protéine), ceci "ferme" le site actif aux molécules d'eau.

Intermédiaire 2

- Etat de transition de type oxyanion stabilisé par interaction avec Arg127 et Zn²⁺



Intermédiaire 3



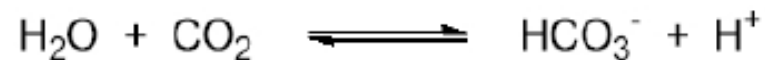
- Interaction avec les site actif plus faible
- Produits de réaction déplacés par fixation de H₂O

Bilan: Rôle de Zn^{2+}

- Exalte la nucléophilie de la molécule d' H_2O pour l'hydrolyse
- Stabilise l'intermédiaire clé de la réaction

III. Lyase: Anhydrase carbonique

- Famille des hydrolases
- Une seule chaîne polypeptidique (masse moléculaire ~ 29 000)
- Contient un seul atome de zinc
- Hydratation de CO_2 ($k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$)
- Au moins 7 formes chez l'humain (chacune codée par un gène différent).
- Majoritairement dans les globules rouges (Cf cours hémoglobine)

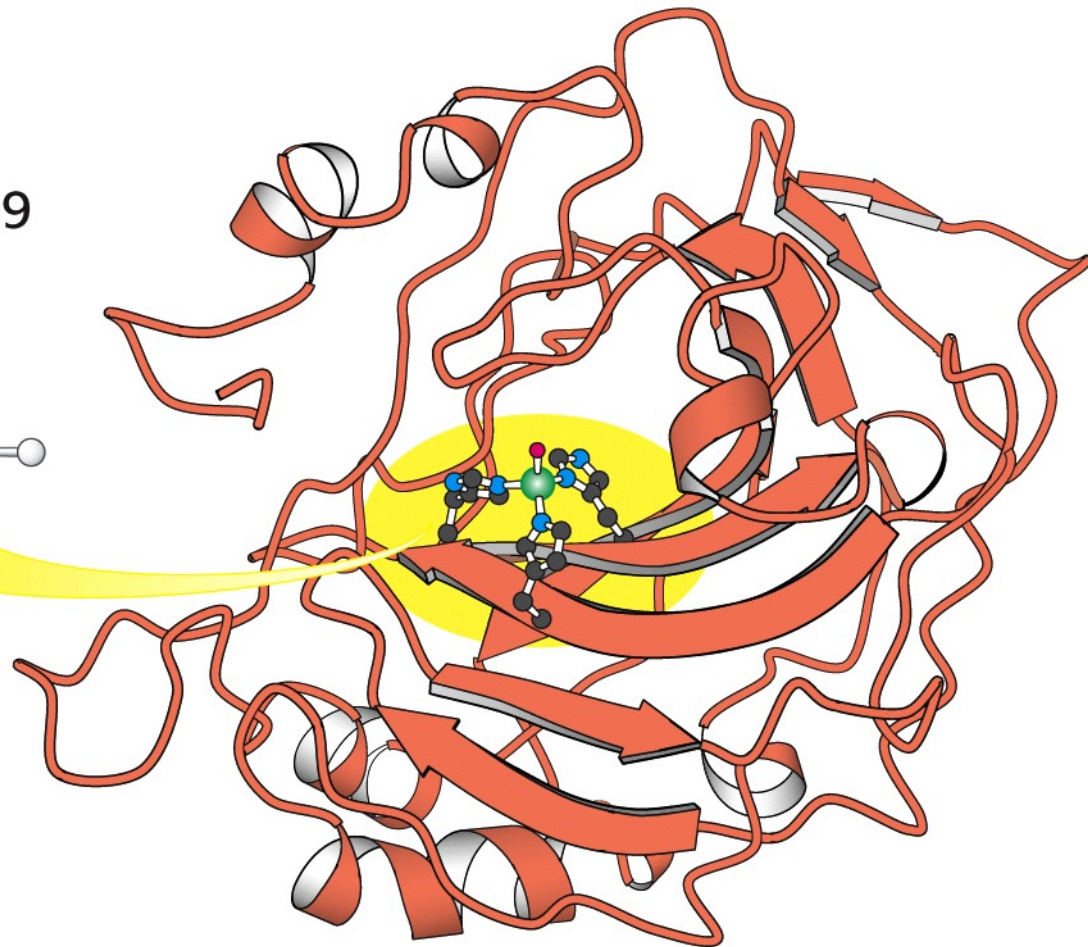
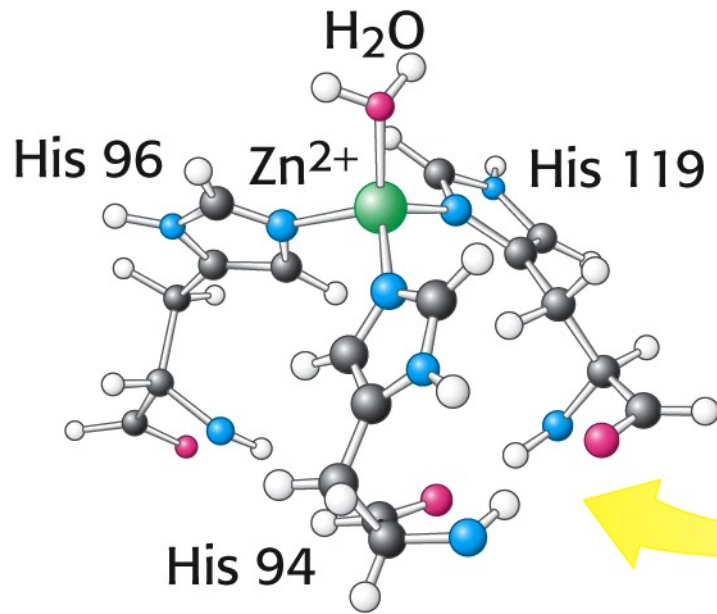




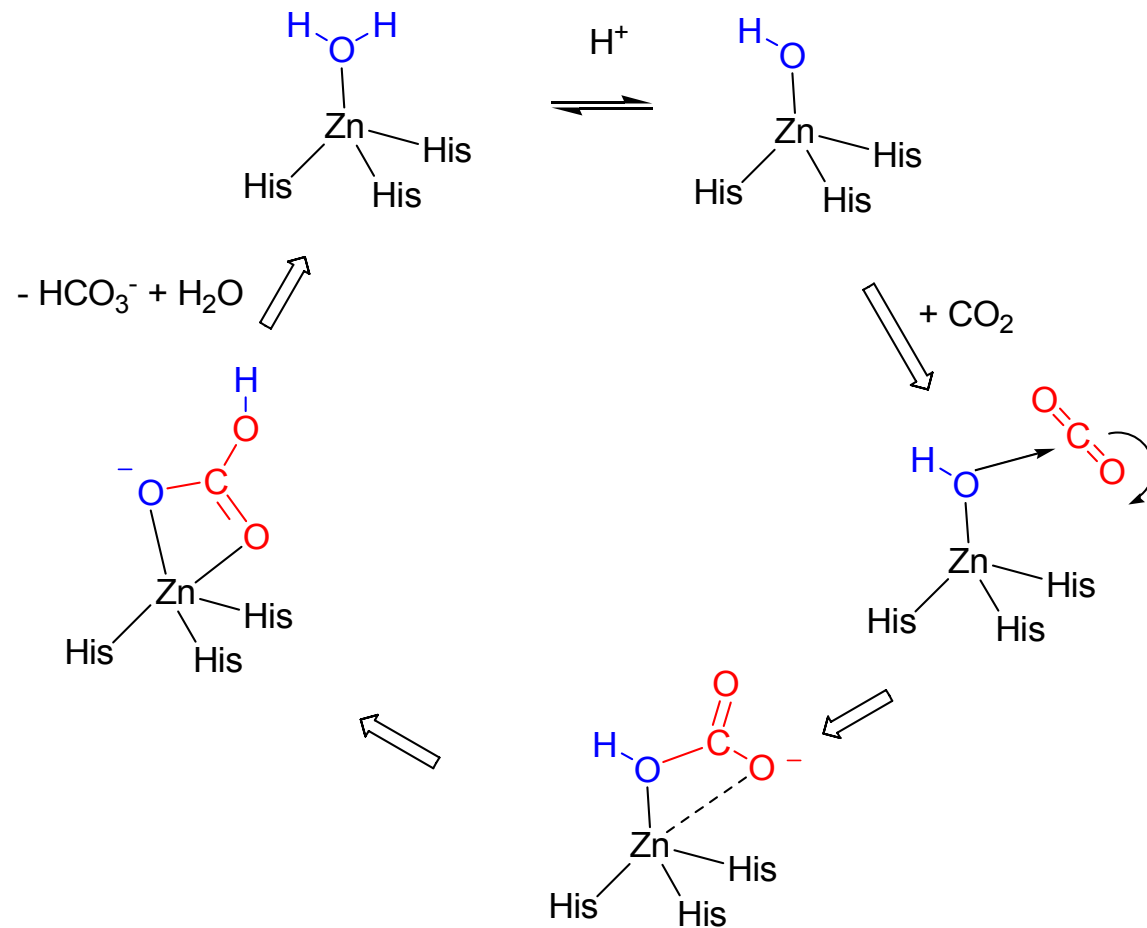
Divers rôles physiologiques

- Rein, appareil digestif: Acidification (réaction produit H^+)
- Modulation de l'affinité de O_2 pour l'hémoglobine
- Balance acido-basique
- Transport des ions
- Glycolyse (donne HCO_3^- à la pyruvate carboxylase)

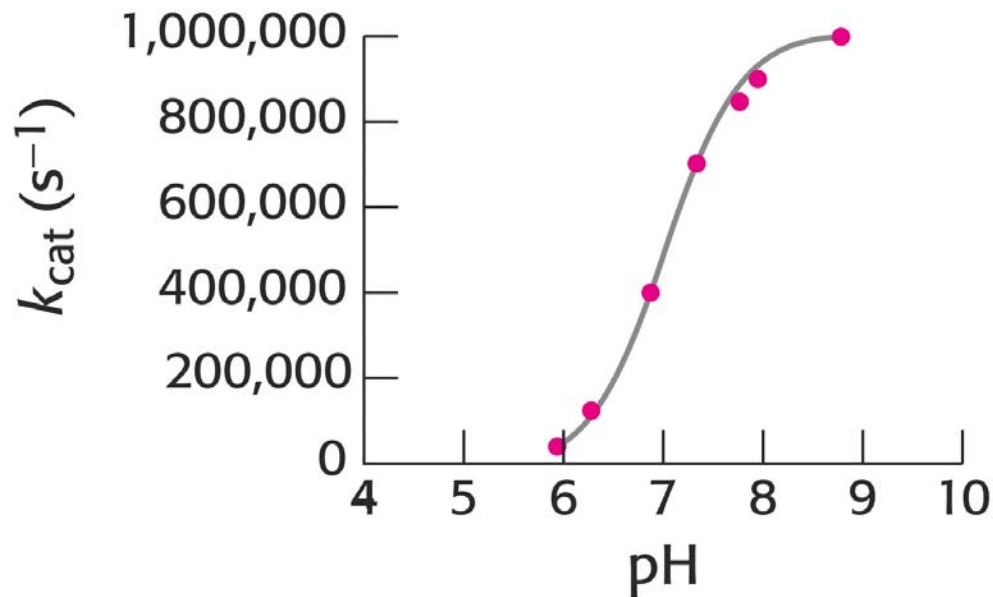
Structure de la protéine



Mécanisme proposé

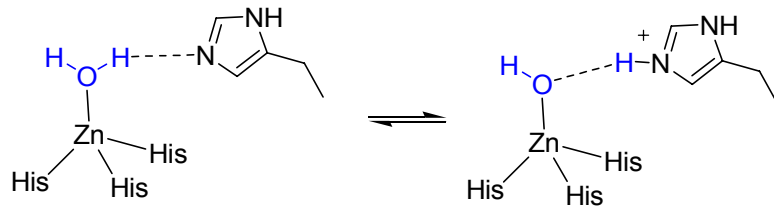


Effet du pH sur l'activité



- Transition vers pH 7.0
- Un groupe avec $\text{pK}_a = 7$ est important
- Ce groupe est la molécule d'eau coordonnée au zinc

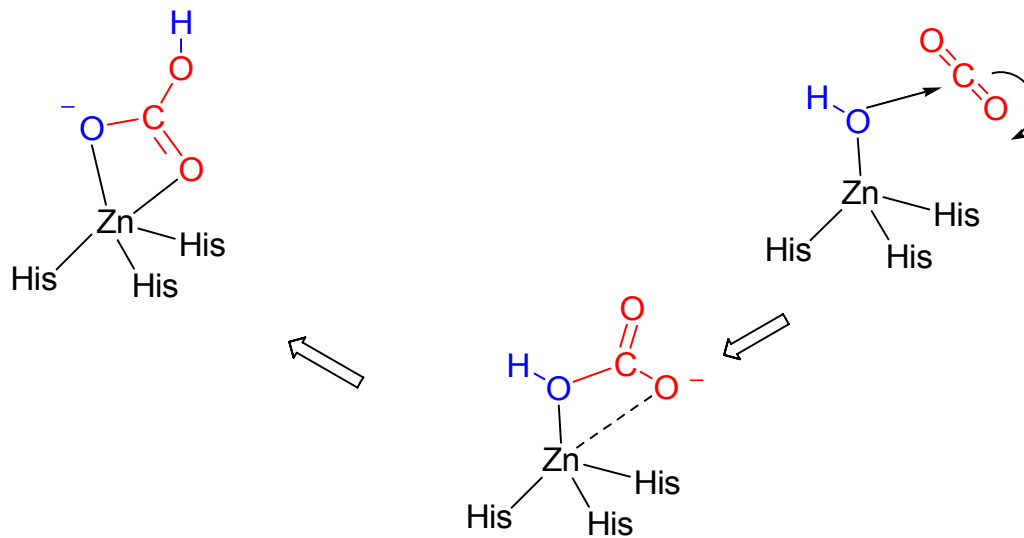
Déprotonation de H₂O liée à Zn²⁺



- Assistance de Zn²⁺ et H64 pour la déprotonation (pK_a = 7)
- Site actif fortement chargé (Zn²⁺, acides aminés neutres): Le relargage d'un H⁺ permet d'atténuer la charge
→ OH⁻ devient beaucoup plus nucléophile que H₂O

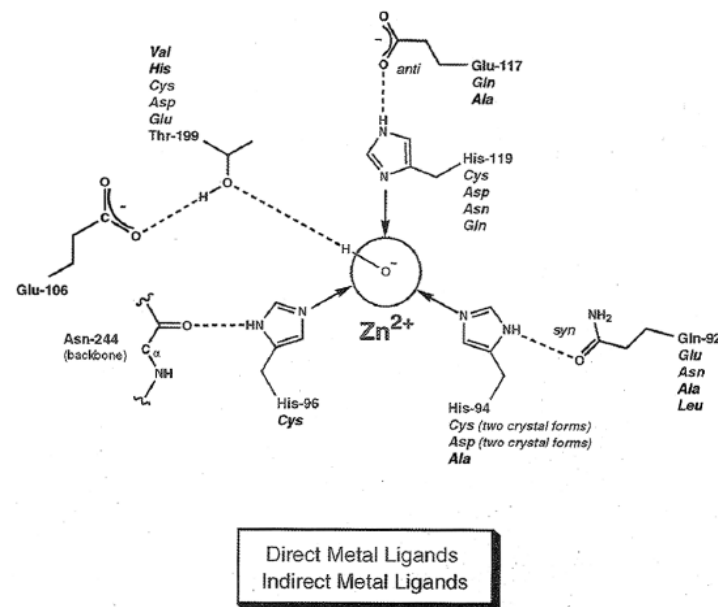
Hydrolyse

- Attaque de OH^- sur CO_2
- Stabilisation des intermédiaires par coordination au zinc



Etude du mécanisme réactionnel par mutagénèse dirigée au niveau de:

- Site de fixation du substrat
- Ligands « directs » (1ere sphère de coordination)
- Ligands « indirects » (2eme sphère de coordination)



a) Site de fixation du substrat

- Poche hydrophobe très conservée au voisinage du site à zinc:

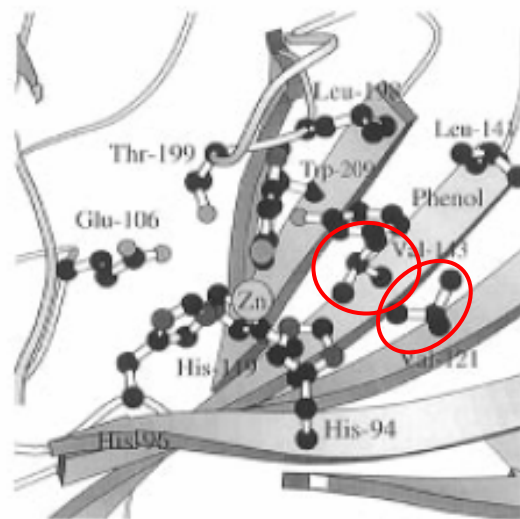
- Thr-199
- Trp-209
- Val-121, Val-143
- Leu-198



Prend la place du substrat

- Mutagénèse dirigée:

- Val-143 → Phe: Perte d'activité car encombrement au niveau du site de fixation
- Val-143 → Gly ou Val-121 → Leu: Effet moindre

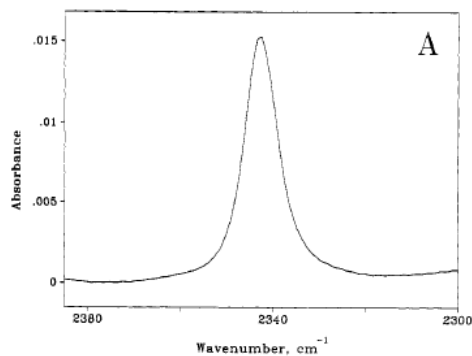


- Bilan: Les acide aminés Thr-199, Trp-209, Val-121, -143, Leu-198 définissent la taille de la poche

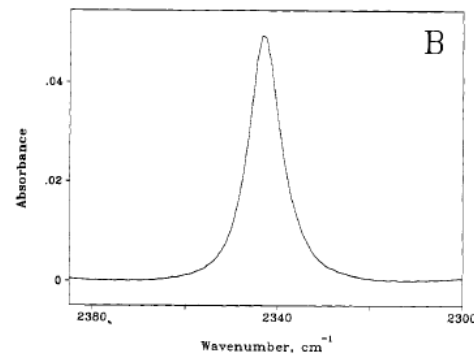
Le CO₂ rentre dans la poche

- Spectro infrarouge:

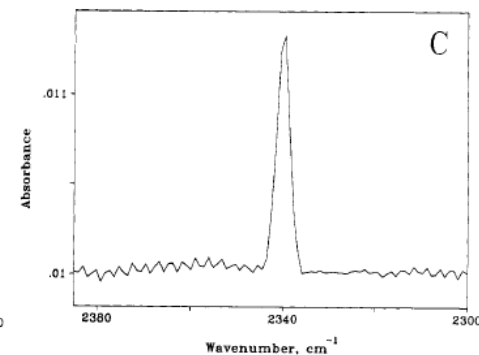
- CO₂ en présence de l'enzyme: déplacement de la vibration C=O vers les faibles nombres d'onde: Changement d'environnement
- Interprété par un environnement plus hydrophobe



CO₂ + protéine



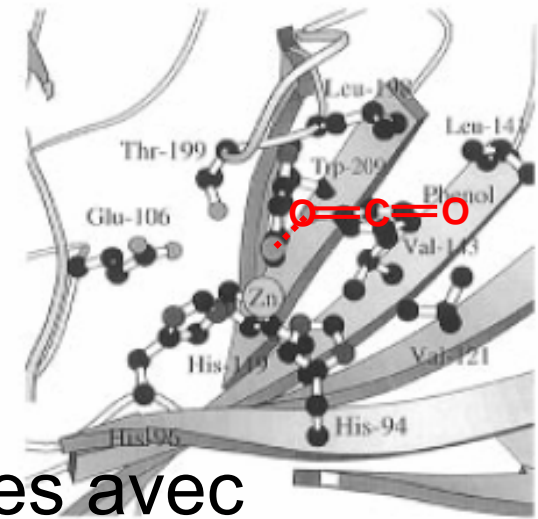
CO₂ seul



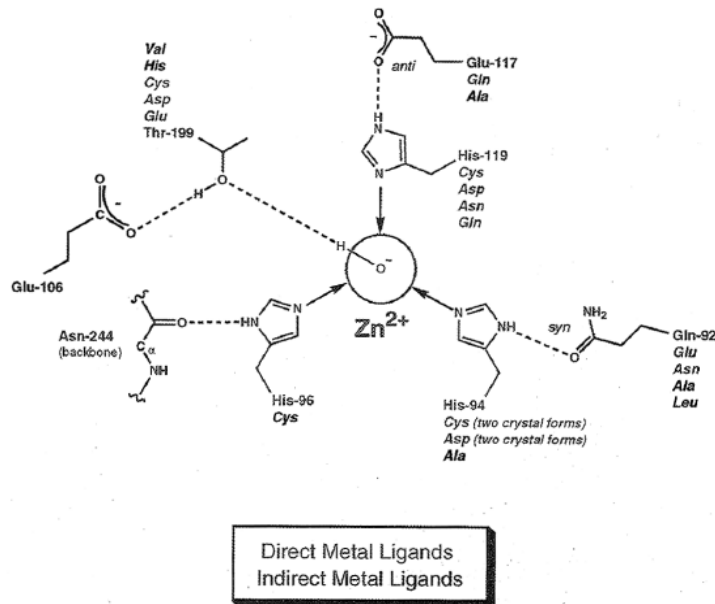
A - B

Effet de la fixation du substrat

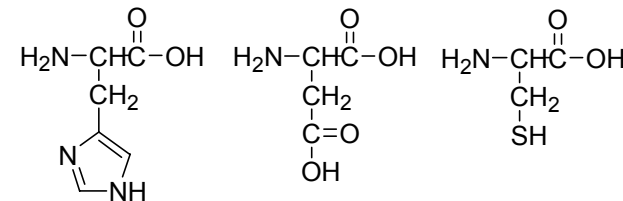
- Structure par diffraction des RX en présence d'un inhibiteur compétitif, le phénol.
- Interactions hydrophobes avec:
 - Trp-209
 - Val-121, -143
 - Leu-198
- Liaison H avec Zn-OH
- Même types d'interaction proposées avec CO₂



b) Ligands « directs »



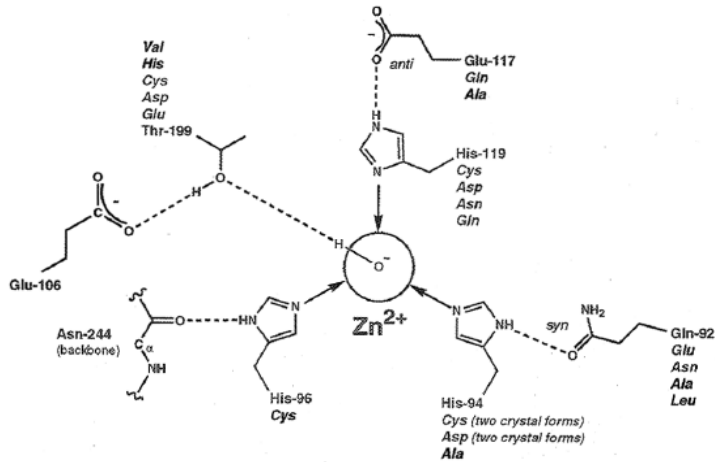
variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	pK_a	zinc K_d (nM)
wild type	110	6.8	0.004
→ H94D	0.11	≥ 9.6	15
→ H94C	0.11	≥ 9.5	33
→ H96C	0.073	8.5	60
→ H119C	0.11	nd	50
H119D	3.8	8.6	25



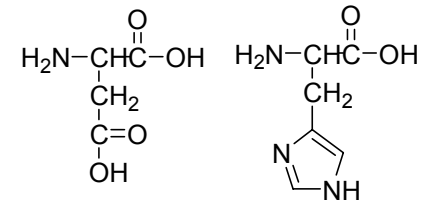
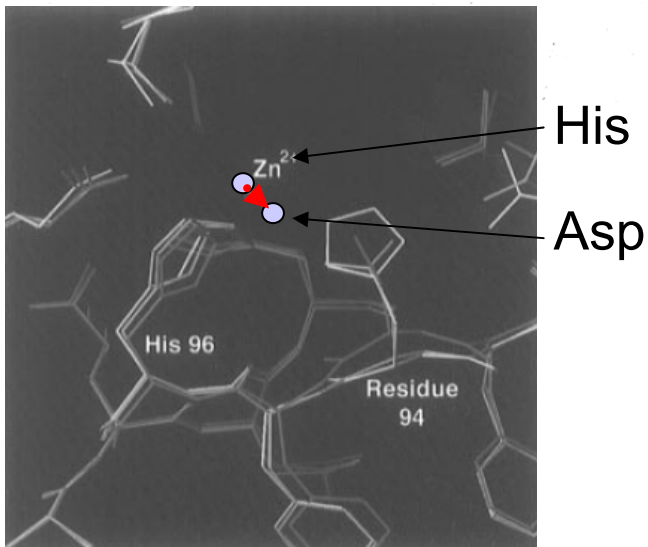
H = His D = Asp C = Cys

- Effet classique: k_{cat} diminue de 2 ordres de grandeur quand perte d'un ligand
- Ici >3 ordres de grandeur !!! → Effet coopératif

H94D



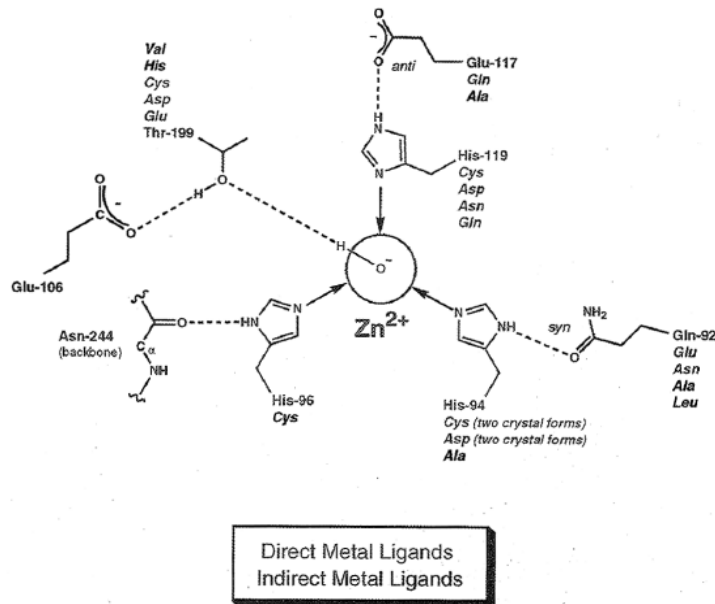
variant	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	pK_a	zinc K_d (nM)
wild type	110	6.8	0.004
H94D	0.11	≥ 9.6	15
H94C	0.11	≥ 9.5	33
H96C	0.073	8.5	60
H119C	0.11	nd	50
H119D	3.8	8.6	25



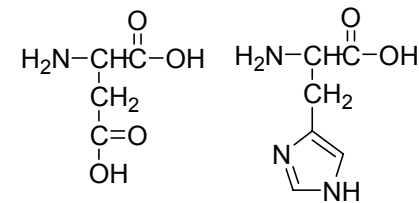
D = Asp, H = His

Chaîne latérale un peu plus courte,
le Zinc bouge \rightarrow K_d augmente

H94D: Effet de la charge



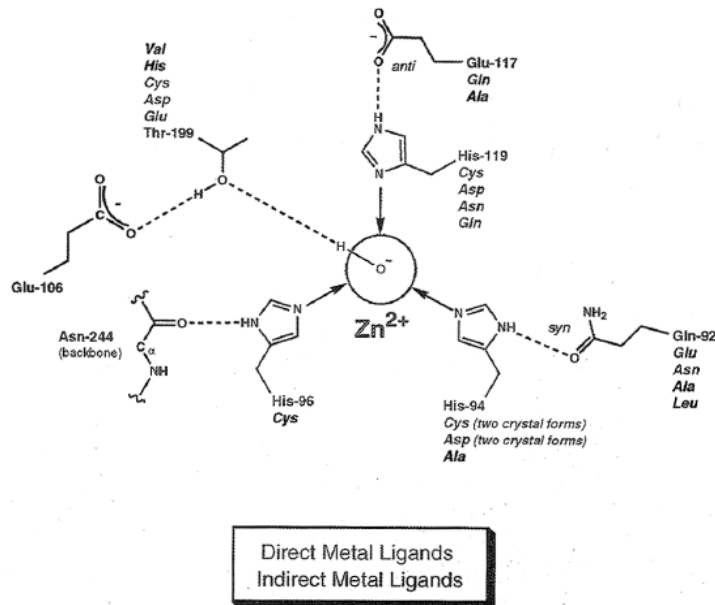
variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	pK_a	zinc K_d (nM)
wild type	110	6.8	0.004
H94D	0.11	≥ 9.6	15
H94C	0.11	≥ 9.5	33
H96C	0.073	8.5	60
H119C	0.11	nd	50
H119D	3.8	8.6	25



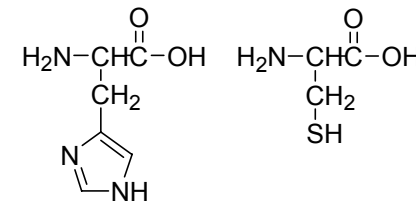
D = Asp, H = His

- Charge négative en plus → Déstabilisation de la forme anionique Zn-OH^- → Augmentation du pK_a de la molécule d'eau coordonnée

H96,119C



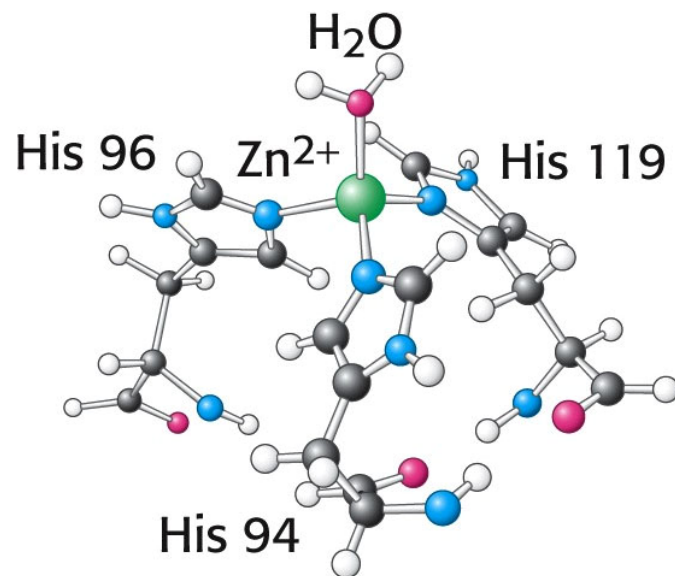
variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	pK_a	zinc K_d (nM)
wild type	110	6.8	0.004
H94D	0.11	≥ 9.6	15
H94C	0.11	≥ 9.5	33
H96C	0.073	8.5	60
H119C	0.11	nd	50
H119D	3.8	8.6	25



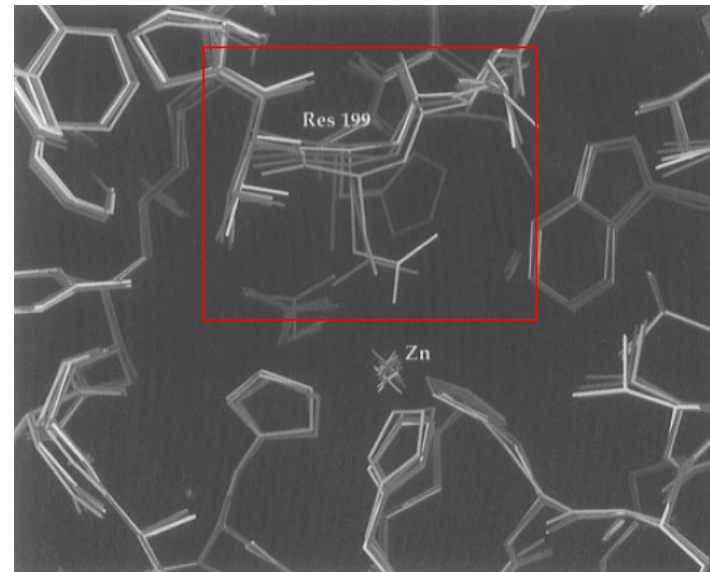
H = His, C = Cys

- Cys neutre mais k_{cat} diminue: en fait changement de conformation de la prot, et distance Cys – Zn augmente 2.8 – 6 Å

Augmentation du nombre de ligands

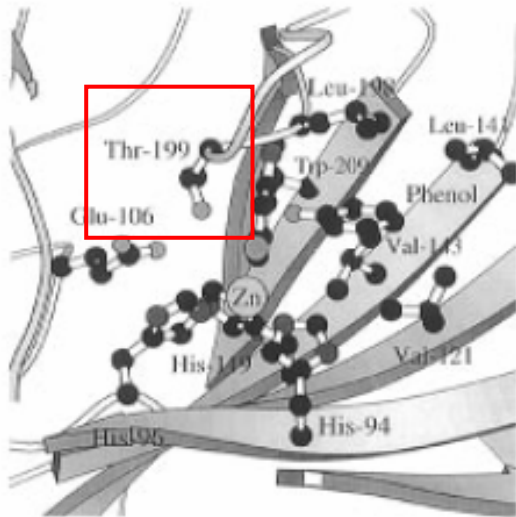


Site actif « normal »
4^{eme} ligand = H_2O
Résidu 199 = Thr non
coordinante



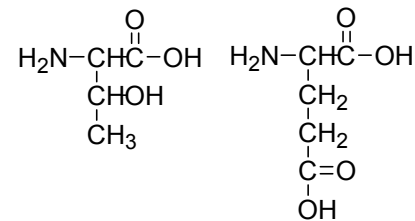
Mutants:
4^{eme} ligand = résidu 199
 CO_2^- (D,E), SH (C), N (H)

Augmentation du nombre de ligands

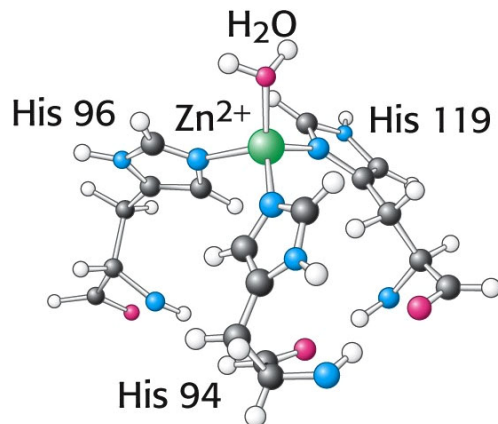


variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	zinc K_d (pM)	variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	zinc K_d (pM)
wild type	110	4	T199E	0.04	0.02
T199C	0.11	1.1	T199H	0.02	80
T199D	0.04	4			

La plus forte affinité d'une protéine pour le Zn

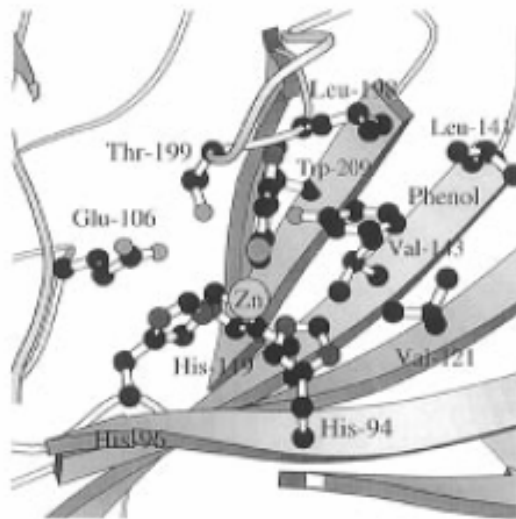


T = Thr, E = Glu



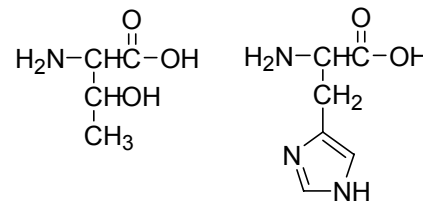
- Zn toujours tétraèdre, et K_d diminue (affinité prot pour Zn augmente) par effet chélate.
- k_{cat} chute car C(Cys) ou D(Asp) prend la place de la molécule d'eau

Augmentation du nombre de ligands

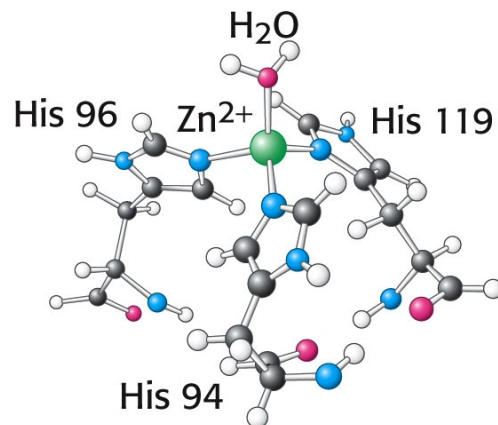


variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	zinc K_d (pM)	variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	zinc K_d (pM)
wild type	110	4	T199E	0.04	0.02
T199C	0.11	1.1	T199H	0.02	80
T199D	0.04	4			

Anomalie ?

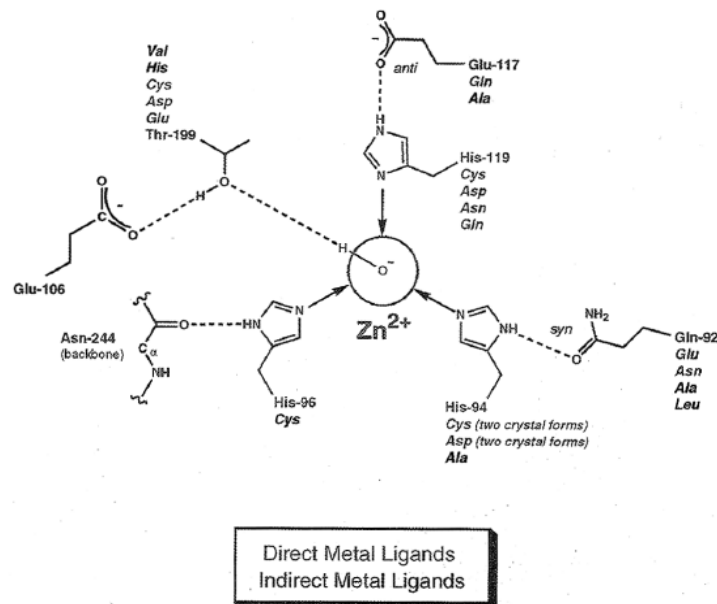


T = Thr, H = His



- H199 ne coordine pas.
- Existence probable d'un réseau de liaisons H qui est perturbé

c) Ligands « indirects »

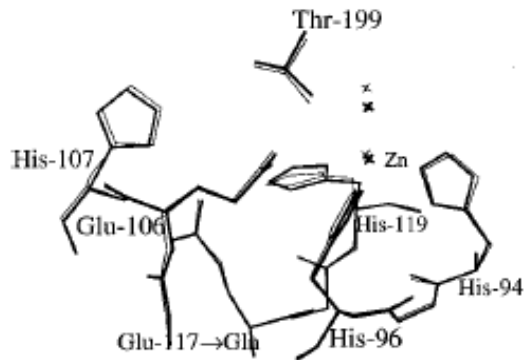


variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a$	zinc K_d (nM)
wild type	110	6.8	0.004
H94D	0.11	≥ 9.6	15
H94C	0.11	≥ 9.5	33
H96C	0.073	8.5	60
H119C	0.11	nd	50
H119D	3.8	8.6	25

variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$\text{p}K_a$	zinc K_d (pM)
wild type	110	6.8	4
Q92A	29	6.8	18
Q92L	30	6.4	30
Q92N	27	6.9	5
Q92E	12	7.7	5
E117A	19	6.9	40
E117Q	0.002	≥ 9.9	4,400
T199A	1.1	8.3	60

- Modifications influencent la charge et les réseaux de liaisons H
- Effet plus subtile que modification de ligands directs. Ex: $\text{p}K_a$ ± 1 unité, $1 < k_{cat} < 30$

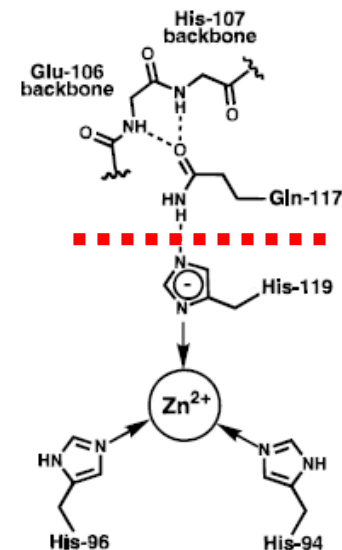
Cas particulier: E117Q



variant	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	pK_a	zinc K_d (pM)
wild type	110	6.8	4
Q92A	29	6.8	18
Q92L	30	6.4	30
Q92N	27	6.9	5
Q92E	12	7.7	5
E117A	19	6.9	40
E117Q	0.002	≥ 9.9	4,400
T199A	1.1	8.3	60

Pas d'effet structural

Perturbation indirecte de H119

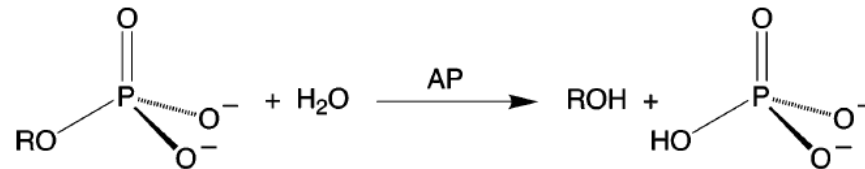


Anhydrase carbonique et médicaments ?

- Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique sont des diurétiques:
 - acetazolamide (Diamox)
 - methazolamide
 - dichlorphenamide
- L'eau va là où est Na^+ (principe de la pression osmotique). Sodium non absorbé par l'organisme → excrété. L'anhydrase carbonique crée des H^+ qui vont se substituer aux Na^+ (principe de l'électronégativité) Résultat: Moins de Na^+ à excréter donc moins d'eau, donc anti-diurétique

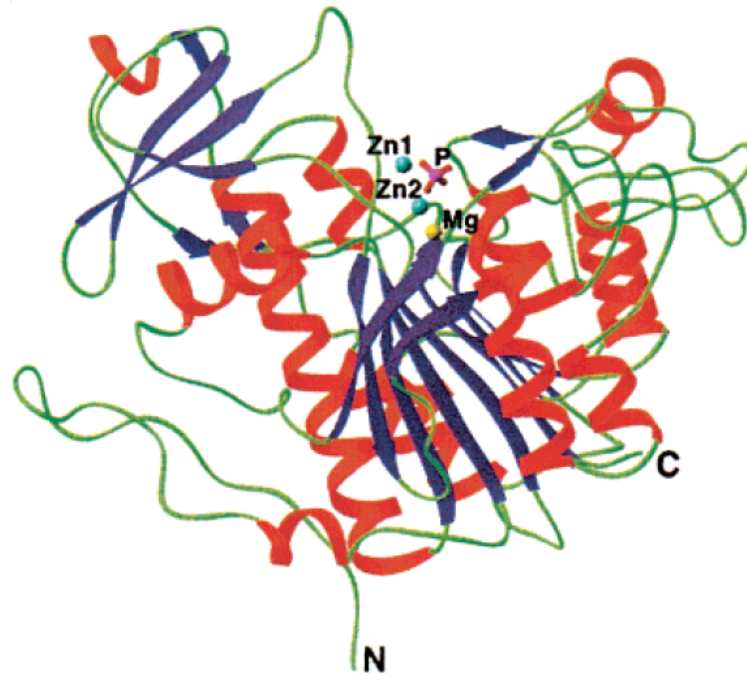
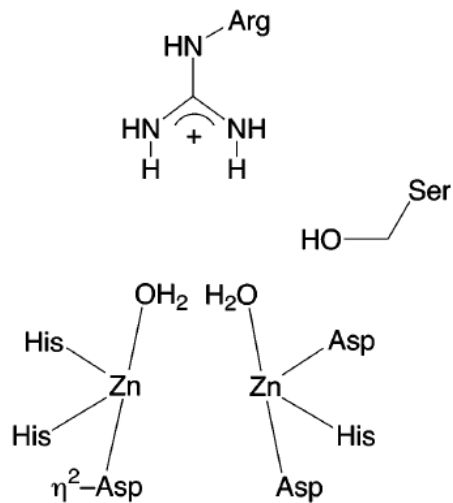
IV. Enzymes hydrolytiques di-Zinc: Phosphatase alcaline

- Impliqué dans le clivage de phosphates
- Procaryotes / Eucaryotes
- De nombreuses isoformes (4 chez les humains)

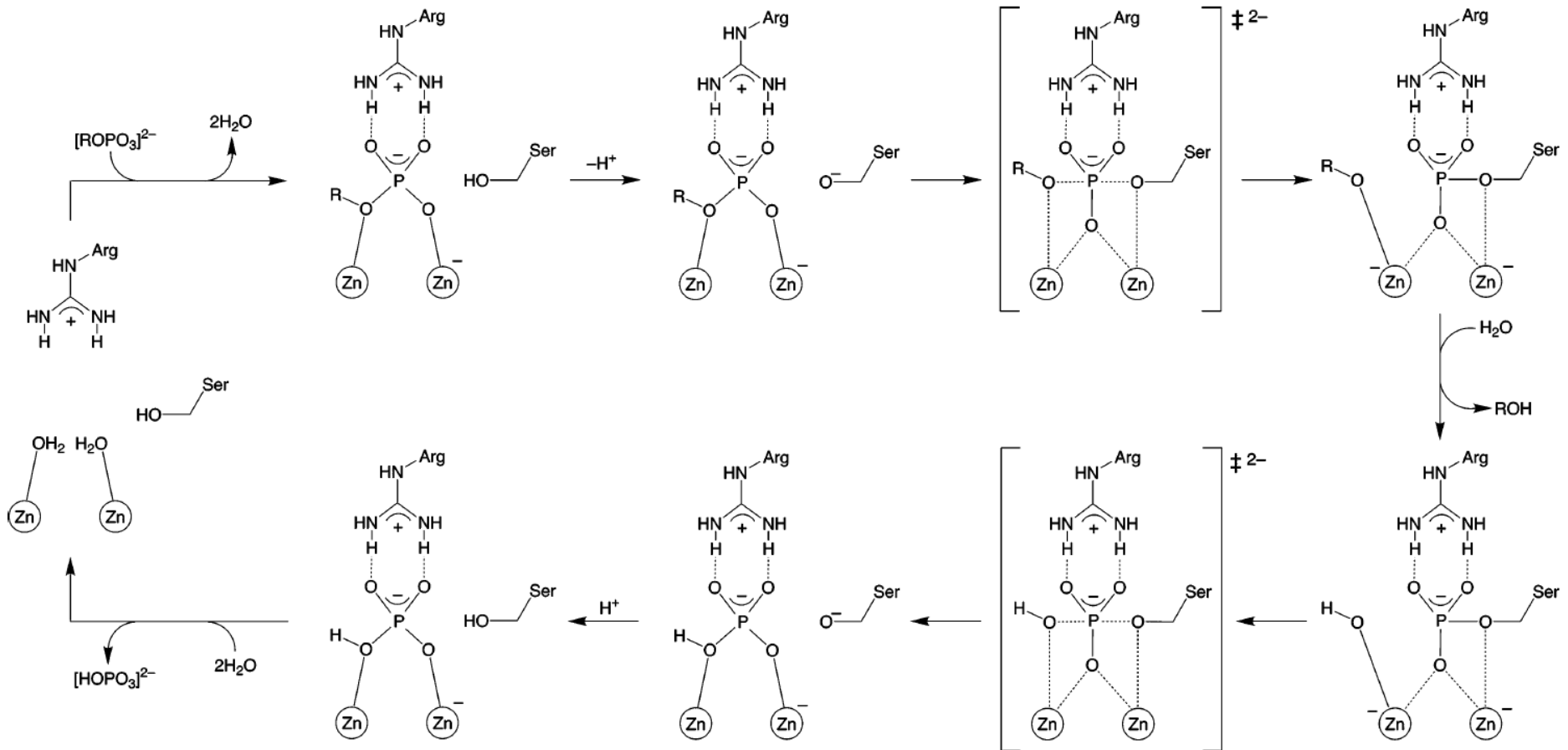


Structure de l'enzyme

- Homodimère de 94 kDa
- 449 résidus, 2 Zn^{2+} , 1 Mg^{2+} / monomère

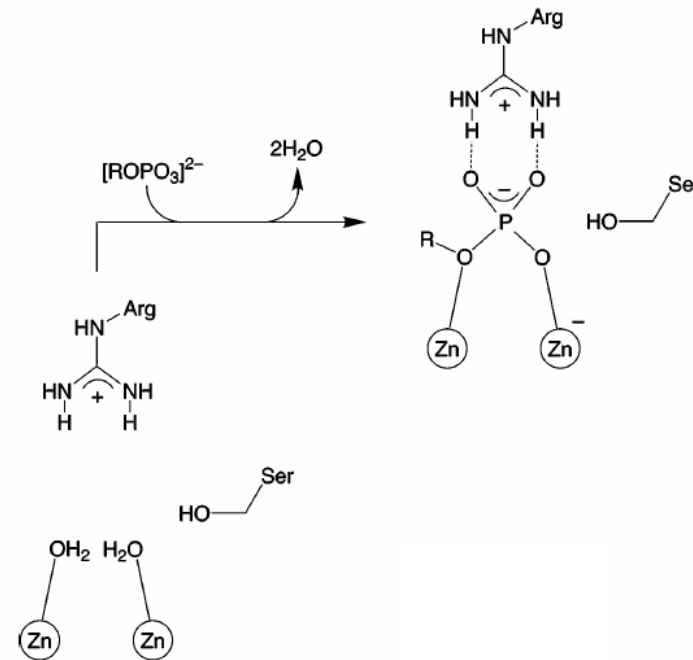


Mécanisme catalytique

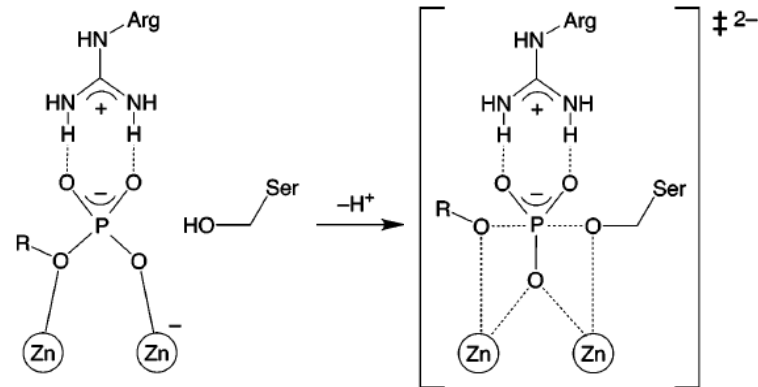


Mise en place du substrat

- Fixation bidente du substrat au zinc:
 - Orientation imposée
 - Association forte
- Fixation additionnelle (liaisons H) à Arg166

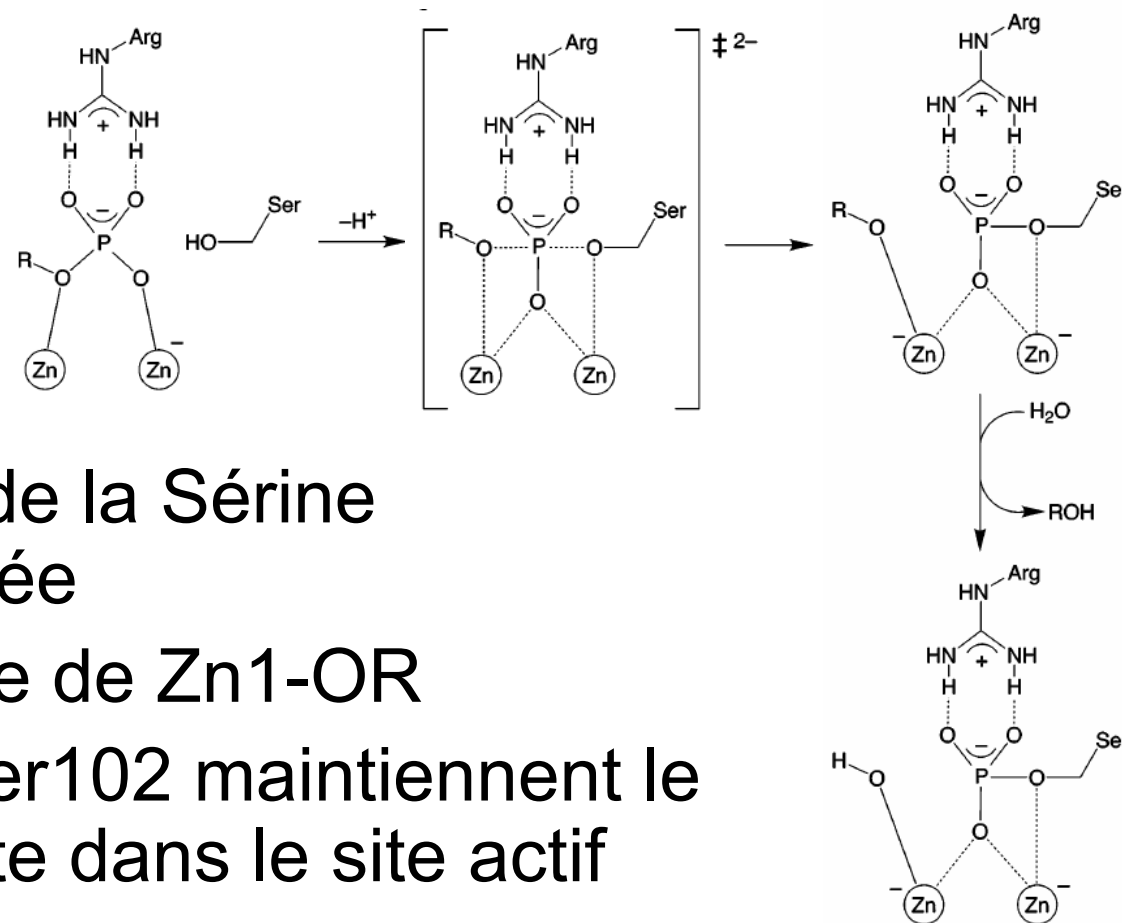


Un rôle différent pour chaque Zn

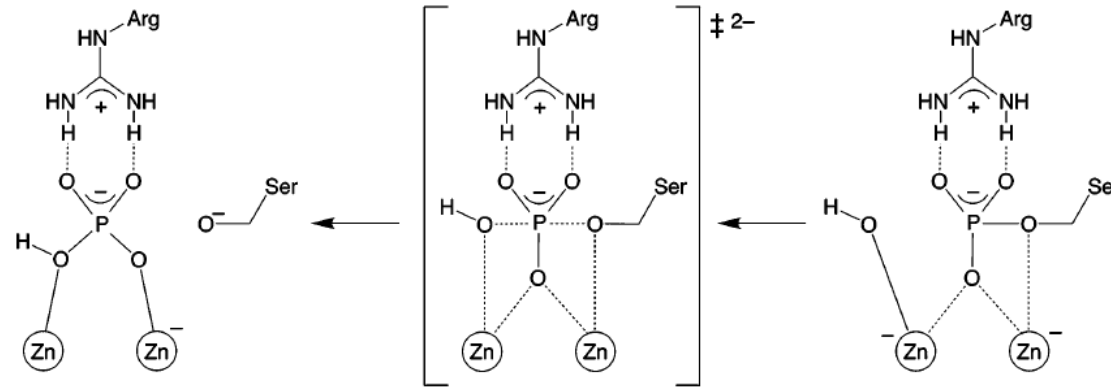
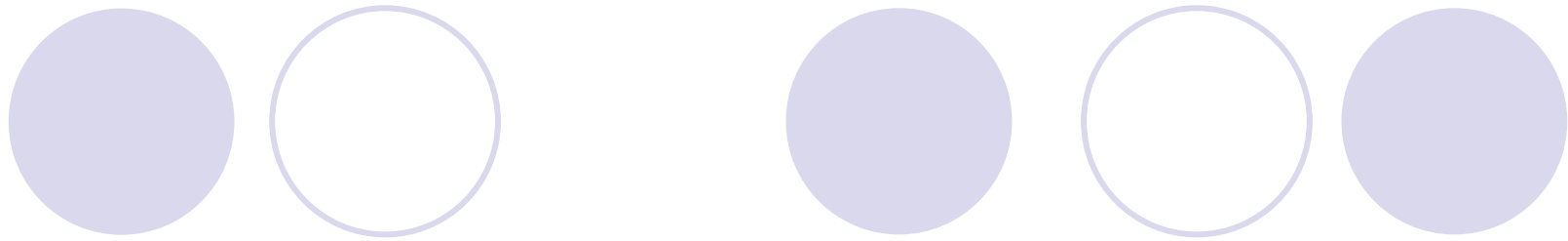


- Coordination groupe OR sur Zn1: Activation du substrat pour le clivage.
- Coordination Ser au Zn2: Diminution du pKa de la sérine → déprotonation → formation d'un nucléophile

Libération de ROH



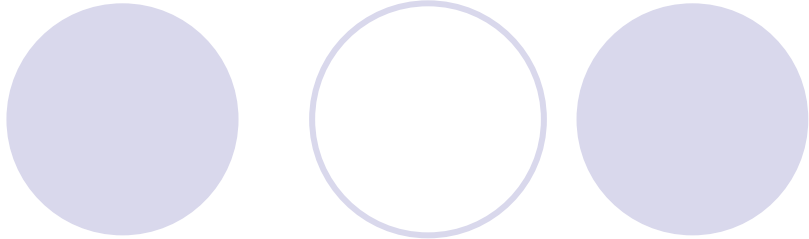
- Attaque de la Sérine déprotonée
- Hydrolyse de Zn₁-OR
- Zn₂ et Ser102 maintiennent le phosphate dans le site actif



- Molécule d'eau « activée » par Zn1 (déprotonnée)
- Attaque nucléophile (similaire à l'anhydrase carbonique ou la carboxypeptidase) de l'hydroxyde sur le phosphore.

Bilan: di-Zinc



- Les 2 zincs fonctionnent en synergie
 - Successivement :
 - Un zinc maintient le substrat
 - L'autre forme un nucléophile
- 



V. Conclusion (à retenir)

- Rôle structural:
 - Orientation du substrat (contrôle stéréospécifique)
 - Maintient du substrat au cours de la réaction
 - Participe à l'agencement permettant au site actif de « ressembler à l'état de transition »
- Formation de nucléophile (déprotonation de R-OH ou H₂O).
- Formation d'électrophile (polarisation de C=O).

Zn²⁺ = structuration, hydrolyse