



ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

КЛЯЧКО
НАТАЛЬЯ ЛЬВОВНА
КАЗАНКОВ
ГРИГОРИЙ МИХАЙЛОВИЧ

ХИМФАК МГУ

—
КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА VK.COM/TEACHINMSU.

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
VK.COM/TEACHINMSU.



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ ХИМИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
ПАНКРАТОВУ ЯНИНУ АЛЕКСАНДРОВНУ

Оглавление

Лекция 1. Общая информация про ферментативный катализ.	6
Разнообразие белков в природе.....	6
Эффективность ферментов.....	9
Механизмы действия ферментов.....	12
Факторы ускорения ферментативных реакций.....	13
Взаимодействия в белке-ферменте.....	13
Классификация ферментов.	18
Лекция 2. Сериновые протеазы.....	27
Основные сведения о сериновых гидролазах	27
Необратимое ингибирирование сериновых гидролаз	28
Активный центр химотрипсина	28
Специфичность сериновых протеаз	29
Механизм действия химотрипсина	32
Лекция 3. Принципы механизмов ферментативного катализа.	35
Общие особенности ферментативного катализа	35
Причины эффективности ферментов	35
Энергетический выигрыш при образовании фермент-субстратного комплекса	39
Лекция 4. Сериновые гидролазы. Ацетилхолинэстераза.	42
Ацетилхолинэстреаза: общие сведения	42
Молекулярные формы ацетилхолинэстеразы.....	43
Кинетика реакций с участием ацетилхолинэстеразы	43
Строение активного центра ацетилхолинэстеразы.....	45
Механизм катализа ацетилхолинэстеразой.....	47
Ингибиторы ацетилхолинэстеразы	48
Пенициллинацилаза: общие сведения.....	50
Структура пенициллацилазы и пенициллинов	51
Механизм катализа пенициллинацилазой	53
Лекция 5. Типы связывания фермента и субстрата.....	55
Взаимодействия в фермент-субстратном комплексе	55
Оценка энергетического выигрыша образования фермент-субстратного комплекса..	55

Типы связывания	59
Лекция 6. Теории ферментативного катализа.	64
Теория сближения и ориентации.....	64
Теория индуцированного соответствия.....	64
Теория напряжения и деформаций.....	66
Абзимы.....	66
Химический катализ в ферментах.....	67
Карбоксипептидаза А.	69
Папаин.....	70
Лекция 7. Классы протеаз.	71
Субтилизин.....	71
Другие классы протеаз. Цистеиновые протеазы.....	72
Механизм действия цистеиновых гидролаз на примере папаина.....	76
Аспартильные гидролазы	77
Лекция 8. Эффекты микросреды.....	82
Кислотно-основные катализаторы в ферментативных реакциях.....	82
Эффект микросреды в белках.....	86
Металлокомплексы в ферментах: общие сведения	87
Комплексообразование ионов металлов с белками.....	89
Лекция 9. Рибонуклеазы. Лизоцим.	91
Строение рибонуклеазы.....	92
Специфичность рибонуклеаз.....	93
Механизм действия рибонуклеазы.....	93
Лизоцим: общие сведения	95
Лекция 10. Неорганические элементы в составе ферментов.	101
Роль неорганических элементов в организме	101
Карбоангидраза	103
Ингибиторы карбоангидразы	105
Карбоксипептидазы	107
Механизм катализа карбоксипептидазой.....	107
Лакказа	111

Лекция 11. Флавин- и гем-содержащие белки.	112
ФАД-зависимые ферменты	112
ФАД-зависимые тиоловые оксиредуктазы	112
Механизм катализа глутатионредуктазой.....	113
Гем-содержащие ферменты.....	115
Катализ.....	118
Пероксидаза	118
Субстраты пероксидаз	120
Механизм катализа пероксидазой	121
Лекция 12. Специфичность ферментов.	123
Основные характеристики ферментов	123
Виды ферментативной специфичности.	124
Заключение по общим особенностям ферментативного катализа.....	126
Лекция 13. Металлы в составе ферментов.	127
Факторы, влияющие на эффективность катализа, на примере карбоангидразы	127
Механизмы связывания и роль металлов в катализе.....	128
Основные функции металлозимов	129
Принцип работы нитрогеназы.....	131
Фотосинтез	132
Органомеркурилиаза и меркурионредуктаза	132
Механизмы с участием ионов металла	132
Калиевый канал.....	133

Лекция 1. Общая информация про ферментативный катализ.

Разнообразие белков в природе. В природе существует большое количество типов различных белков, выполняющих самые разнообразные функции (Таблица 1.1). Основное внимание мы будем уделять ферментам, основная функция которых – катализ химических реакций, протекающих в организме.

Таблица 1.1. Основные типы белков и их функции.

Тип белка	Функция
Альбумины	Транспорт
Антитела, глобулины	Иммунитет, узнавание
Интерфероны	Защита
Актин, миозин	Мышечное сокращение
Рецепторы, гормоны	Узнавание, передача сигнала, регуляция
Структурные (коллаген, эластин, кератин)	Построение органов и тканей
Гистоны	Компактизация ДНК (за счет большого содержания лизина)
Ингибиторы	Регуляция
<i>Ферменты</i>	<i>Катализ</i>

По своему составу белки бывают разные – простые и сложные. **Простыми** белками называют белки, которые содержат *только аминокислоты*; белки, в которых есть *дополнительно включенные компоненты*, называют **сложными**. Среди таких небелковых компонентов, необходимых для катализа, выделяют *кофакторы, коферменты и простетические группы*. Существуют тонкие различия в том, как называть и обозначать эти компоненты, причем мнения на этот счет в литературе часто расходятся. Мы будем называть **кофакторами** всю совокупность небелковых компонентов, **коферментами** – то, что изменяется в ходе реакции (например, НАД, НАДН), а **простетическими группами** – то, чтоочно связано с белком и не может быть удалено без денатурации самого белка (например, гем в гемоглобине или флавин (ФАД, ФМН)).

Многие белки содержат углеводы на своей поверхности. Например, пероксидаза хрена (обычная, не рекомбинантная) содержит 20% углеводов по массе. Кроме этого, белки могут содержать *липиды* (протеинкиназа А), *нуклеотиды* (флавопротеины), а также *ионы металла*, который может как входить в состав гема (железо в гемоглобине), так и не входить (цинк в карбоксипептидазе). Также встречаются **фосфопротеины** (сигнальные белки) – белки, в состав которых входят аминокислоты серин, треонин и/или тирозин, *fosфорилированные по OH-группе*.

Что же дают эти структурные усложнения? Дело в том, что, благодаря им у белков появляются *новые химические* (например, возможность переноса гидрид-иона в реакциях) и/или *структурные* (молекулярное узнавание) свойства, которые никаким образом не могут быть достигнуты с использованием исключительно аминокислот. Это особенно важно для функционирования ферментов.

Общие принципы катализа. Протекание любой химической реакции *в принципе* возможно, если суммарная энергия продуктов меньше общей энергии исходных веществ, т.е. если реакция *термодинамически выгодна*. Однако на практике далеко не всякая термодинамически выгодная реакция протекает (точнее, она протекает, но очень и очень медленно). Это связано с тем, что значение энергии активации (т.е. величине энергетического барьера, которые надо преодолеть системе, чтобы реакция прошла) очень велико. Понизить величину этого барьера, и, как следствие, увеличить скорость реакции позволяет катализатор (Рисунок 1.1).

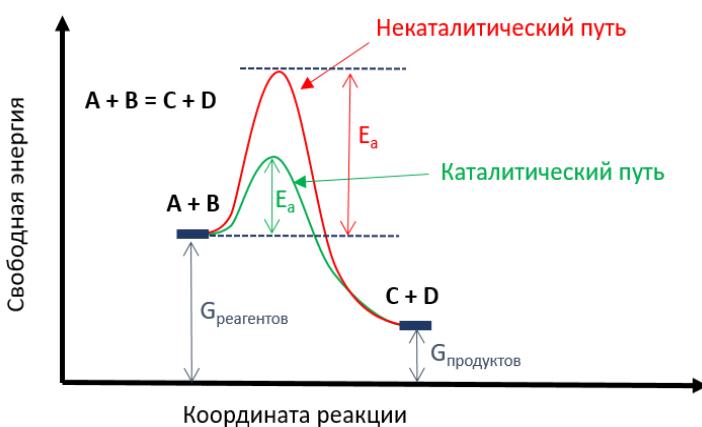


Рисунок 1.1. Энергетическая диаграмма реакции.

Если говорить точнее, на самом деле при добавлении катализатора несколько изменяется путь реакции, но для общего понимания и упрощения достаточно сказать, что *катализатор просто понижает энергию активации*.

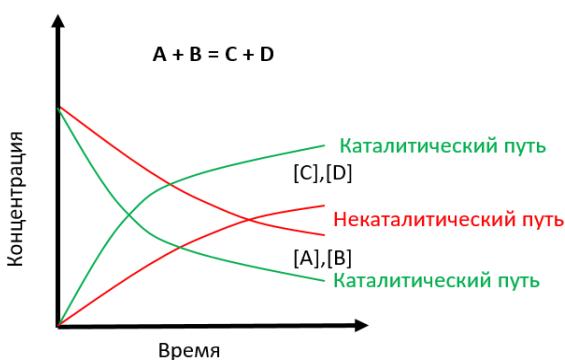


Рисунок 2.2. Изменение скорости реакции при добавлении катализатора.

ОЧЕНЬ ВАЖНО: Катализатор НЕ влияет на константу равновесия, а лишь ускоряет наступление равновесия (Рисунок 1.2).

Рассмотрим, как именно работает катализатор на примере реакции гидролиза сложноэфирной группы (Схема 1.1.).

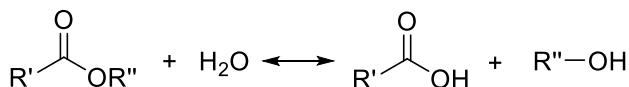
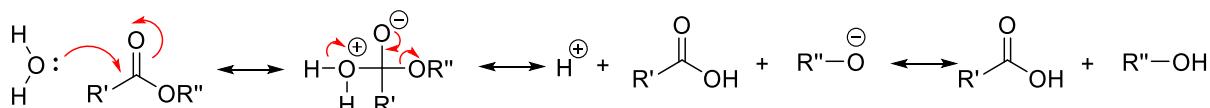


Схема 1.1. Гидролиз сложноэфирной группы.

В водной среде при *нейтральном* рН эта реакция идет, как правило, плохо. Реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения (Схема 1.2.).



Двухзарядное ПС

Схема 1.2. Механизм гидролиза сложноэфирной группы.

Сначала атом кислорода из молекулы воды атакует неподелённой парой карбонильный атом углерода. В результате этого образуется переходное состояние, где два заряда – положительный и отрицательный – находятся рядом; такое двухзарядное состояние нестабильно, а его образование требует высокой энергии активации, в результате чего такая протекает очень медленно.

Что же надо сделать, чтобы эта реакция стала идти быстрее? В этом нам поможет катализ. Различают **кислотно-основный**, **ковалентный** (электрофильный или нуклеофильный) и **внутримолекулярный** типы катализа. В случае нашей реакции гидролиза сложного эфира эффективным оказывается **кислотный катализ**, который основан на том, что кислоты могут временно отдавать протон сложному эфиру (Схема 1.3).

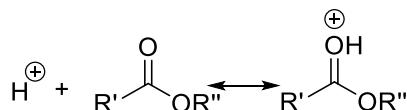
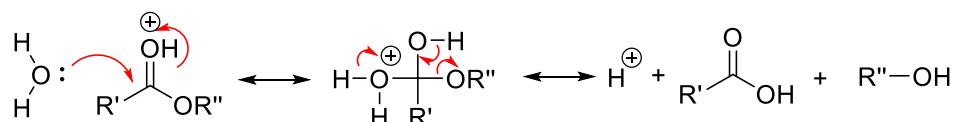


Схема 1.3. Протонирование сложного эфира кислотой.

При этом образуется протонированная форма эфира, благодаря которой в переходном состоянии вместо малоустойчивой двухзарядной формы образуется *более устойчивая* форма, содержащая лишь один заряд (Схема 1.4).



Однозарядное ПС

Схема 1.4. Взаимодействие воды с протонированным сложным эфиром.

Таким образом, кислоте удается стабилизировать ПС, и, как следствие, снизить энергию активации и повысить скорость реакции. Протонирование сложного эфира несколько

повышает энергию исходного вещества, но даже несмотря на это, реакция все равно начинает протекать гораздо быстрее благодаря тому, что энергия активации снижается.

Другой тип катализа – внутримолекулярный катализ – удобно рассмотреть на примере реакции гидролиза эфирной связи в молекуле аспирина. Реакция ускоряется с помощью *внутримолекулярного общеосновного катализа* (Схема 1.5).

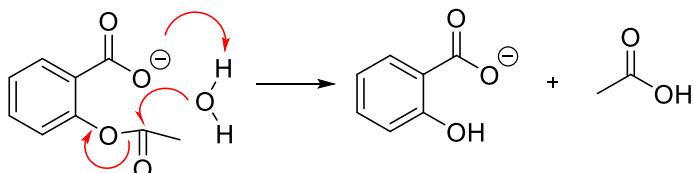


Схема 1.5. Внутримолекулярный гидролиз в аспирине.

В данном случае внутри одной молекулы сосредоточены два элемента – основание и эфирная связь. Скорость такой реакции возрастает в 200 раз.

Одним из важных факторов катализа, особенно ферментативного, является **энтропия**. Так, обычные реакции, протекающие в растворе, требуют обязательного сближения реагирующих молекул, в результате чего на стадии химической реакции происходит снижение энтропии. В случае ферментативных реакций, процесс во многих случаях происходит в пределах фермент-субстратного комплекса, и уменьшение энтропии происходит не на стадии химической реакции, а до нее.

Эффективность ферментов. Ферменты – молекулы белков, которые катализируют (ускоряют) протекающие в организме процессы. Молекулы ферментов состоят из полипептидной цепи и образуются из аминокислот (Схема 1.6).

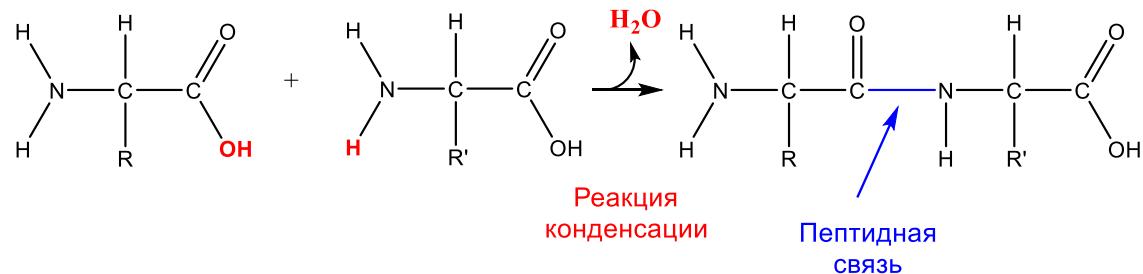


Схема 1.6. Образование пептидной связи в белках.

Ферменты – это уникальные биокатализаторы, обладающие непревзойденной эффективностью действия. *Любая реакция в организме, даже очень простая, происходит под действием катализатора – фермента.* Например, реакция гидратации углекислого газа протекает под действием фермента карбоангидразы. В среднем ферменты ускоряют реакции в 10^9 – 10^{12} раз.

К одним из наиболее «быстрых» ферментов относятся каталазы, карбоангидразы, а также декарбоксилазы (относятся к классу лиаз). Так, фермент *оротидин-5'-фосфат-декарбоксилаза* увеличивает скорость декарбоксилирования специфического субстрата в 10^{18} раз. Этот фермент катализирует реакцию синтеза важного предшественника РНК

и ДНК – уридин-5'-фосфата (УМФ), который образуется путем декарбоксилирования оротидин-5'-монофосфата (ОМФ) (Схема 1.7.).

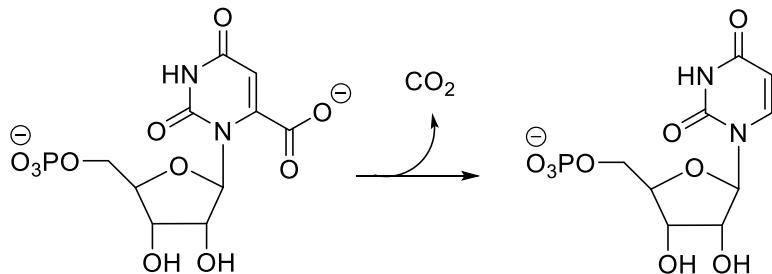
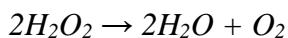


Схема 1.7. Декарбоксилирование ортоидин-5'-монофосфата.

Сравним, как влияют на снижение энергии активации и увеличение скорости различные катализаторы на примере реакции разложения пероксида водорода:



В отсутствие катализатора эта реакция идет очень медленно, поскольку в этом случае энергия активации достаточно высока (Таблица 1.2.). Можно использовать различные катализаторы (например, гетерогенный катализ на платине или гомогенный в присутствии ионов железа). Но фермент каталаза с ними не сравнима по своей эффективности – он в 10 раз снижает барьер активации и повышает скорость разложения практически до *диффузионно-контролируемого предела*.

Таблица 1.2. Сравнение эффективности различных катализаторов для реакции разложения пероксида водорода при 25°C, pH=7.

Катализатор	Энергия активации, кДж/моль	Относительная скорость при 25°C
отсутствует	70	1
Pt (гетерогенный катализ)	45	2100
Fe ⁺² (гомогенный катализ)	42	8100
Каталаза	7	9·10 ¹⁰

Энергетический профиль ферментативной реакции усложняется по сравнению с некаталитической реакцией. Один из вариантов – высокий барьер разбивается на несколько меньших барьеров (Рисунок 1.3). Первый барьер возникает из-за ограничения поступательного, вращательного и колебательного движения реагентов, происходящего при связывании субстрата ферментом и образовании фермент-субстратного комплекса. Затем возникает барьер, связанный непосредственно со стадией химической реакции;

последующие барьеры характеризуют процессы, связанные с высвобождением продукта из активного центра.

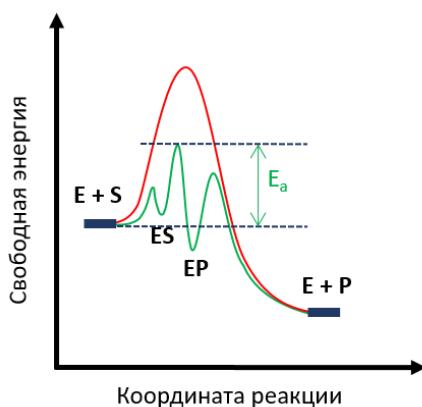


Рисунок 1.3. Энергетический профиль ферментативной реакции.

Особый участок фермента – его **активный центр**. На сегодняшний день еще не синтезировали *ни одного катализатора, который был бы близок к ферментам по эффективности*. Известны примеры синтетических катализаторов на основе пероксидазаподобных молекул, но даже здесь пока что не удалось достичь эффективности ферментов.

Итак, на первой стадии ферментативной реакции образуется фермент-субстратный комплекс, в котором реагирующие молекулы еще до начала химической реакции оказываются сближены, сориентированы и зафиксированы. Фактически, *в этот момент происходит перевод реакции во внутримолекулярный режим, когда энтропийные потери на сближение и ориентацию реагирующих молекул минимальны*. Поэтому для образования комплекса фермент-продукт требуется преодолеть меньший активационный барьер.

Кроме этого, энергетический барьер ферментативной реакции снижается за счет стабилизации переходного состояния, т.е. за счет приближения структуры субстрата в фермент-субстратном комплексе к структуре переходного состояния. Переходное состояние связывается ферментом лучше, чем исходный субстрат, что в некоторых (правда, редких, из-за технических сложностей) случаях подтверждено экспериментально, например, для реакций, катализируемых ферментом лизоцимом.

Перечислим **особенности ферментативного катализа**:

- Особый участок фермента – активный центр;
- Образование фермент-субстратного комплекса – за счет многоточечного взаимодействия с субстратом;
- При образовании фермент-субстратного комплекса – сближение и ориентация молекул/ перевод реакции во внутримолекулярный режим;
- Эстафетная передача заряда – повышение нуклеофильности реагирующих групп (химотрипсин);

- Поддержание микроокружения активного центра в состоянии, отличном от водного раствора (например, вытеснение воды из активного центра), благодаря чему наблюдается выигрыш в ориентации боковых цепей;
- Стабилизация переходного состояния (сродство фермента выше к переходному состоянию, чем к субстрату), в результате чего свободная энергия переходного состояния понижается;
- Селективность (специфичность).

Механизмы действия ферментов. Одна из наиболее ранних моделей, отражающих механизм работы ферментов, является **модель ключ–замок** (Рисунок 1.4), которая была предложена Фишером. Но такая модель не может работать как катализатор, поскольку за счет «идеального» соответствия между субстратом и активным центром в таком случае фермент–субстратный комплекс окажется в глубоком энергетическом минимуме, из которого система не «захочет» выходить. Эта модель больше подходит для описания ингибиторов.

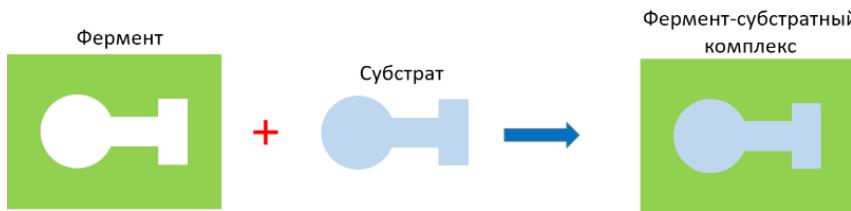


Рисунок 1.4. Модель ключ–замок.

Есть два механизма, которые более-менее отражают реальную работу ферментов. Первый из них – это **механизм индуцированного соответствия** (Рисунок 1.5), предложенный Кошландом, согласно которому субстрат является жесткой молекулой, а фермент меняет конформацию при входжении субстрата в его активный центр, т.е. подстраивается под субстрат. В ряде ферментов этот механизм преобладает, например, в дегидрогеназе, где целые петли полипептидной цепи фермента движутся при связывании субстрата. Другой пример – взаимодействие глюкозы с гексокиназой. Малая субъединица гексокиназы при связывании глюкозы поворачивается и приближается на 12 Å к большой субъединице. Глюкоза оказывается «зажатой» между двумя субъединицами, а аминокислотные остатки двух субъединиц сближены и сориентированы для катализа.

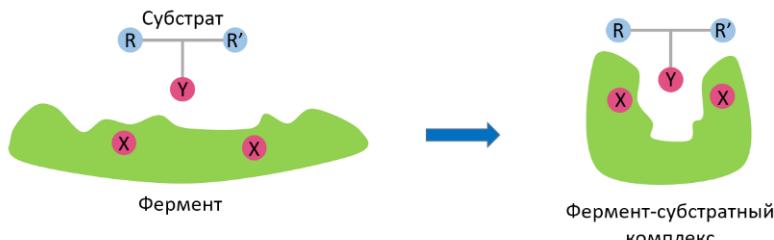


Рисунок 1.5. Механизм индуцированного соответствия.

Другой механизм – **механизм напряжения («дыбы»)**, предложенный Ламри, Эйрингом и Джэнксом (Рисунок 1.6.). Согласно этому механизму, молекула фермента является жесткой, а субстрат меняет конформацию. Такой механизм встречается в ряде ферментов, например, в лизоциме. Остаток N-ацетилуроновой кислоты в позиции D, содержащий гидролизуемую связь, переходит при связывании ферментом из конформации «кресло» в «полукресло», что облегает катализ.

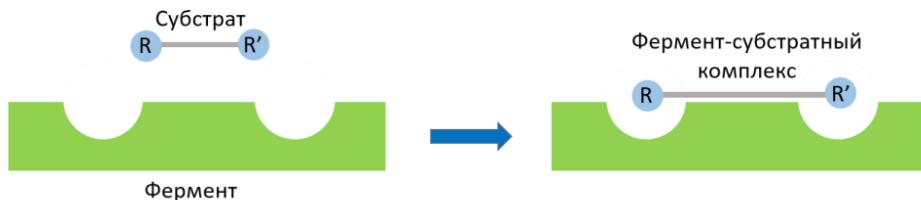


Рисунок 1.6. Механизм напряжений.

Также встречается комбинация двух механизмов – индуцированного соответствия и напряжений.

Факторы ускорения ферментативных реакций. К эффектам, влияющим на ускорение ферментативных реакций, относят:

- Сближение (концентрирование);
- Ориентация;
- Эффекты среды.

Если взаимодействие между активным центром и субстратом происходит лишь в одной или двух точках, то субстрат оказывается слишком подвижным и не может быть правильно зафиксирован (Рисунок 1.7., а). Чтобы произошло правильное ориентирование и связывание субстрата в активном центре, необходимо как минимум *три точки* (Рисунок 1.7., б).

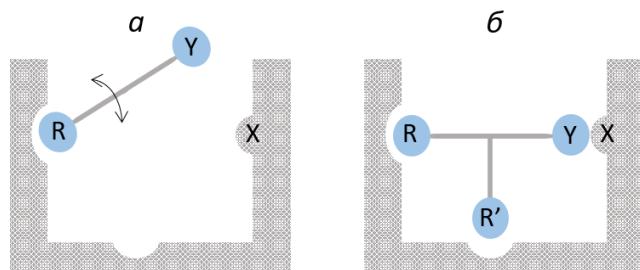


Рисунок 1.7. Варианты связывания субстрата.

Взаимодействия в белке-ферменте. Самые прочные связи в белке – *ковалентные*. В белках они представлены **пептидными связями** и **дисульфидными мостиками**. (Схема 1.8).

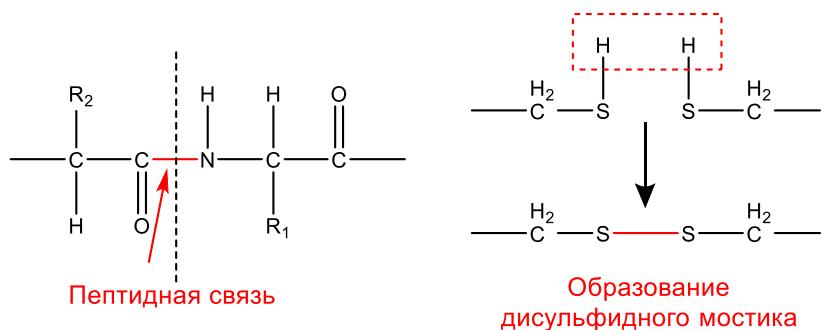


Схема 1.8. Ковалентные связи в белке.

Остальные взаимодействия в белке – **слабые**. Несмотря на малые энергии, слабые взаимодействия очень значимы для белков, поскольку количество этих связей очень велико. К первому типу слабых взаимодействия относятся **водородные связи** (Схема 1.9).

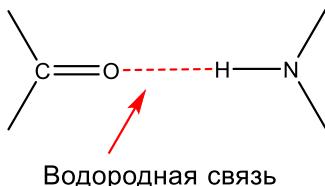


Схема 1.9. Образование водородной связи.

Например, в системе переноса протонов химотрипсина задействованы водородные связи, связывающие аспартат-гистидин-серин (Схема 1.10), $\Delta G = 0.5 - 1.8$ ккал/моль.

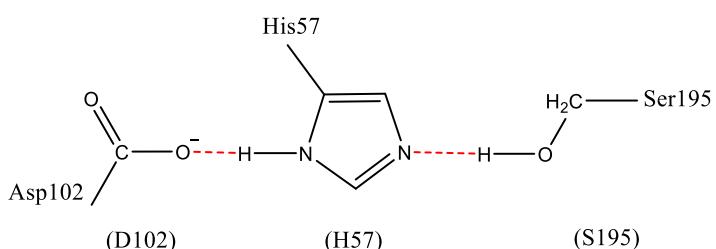


Схема 1.10. Каталитическая триада в сериновых протеазах.

Благодаря этому повышается нуклеофильность серина, который является нуклеофилом в каталитической реакции.

Другой тип слабых взаимодействий в белке – **электростатические**. Ими пренебрегают, когда рассматривают концентрированные водные растворы электролитов, однако внутри белковой глобулы, где среда не водная, а скорее органическая (с диэлектрической проницаемостью около 10), роль электростатических взаимодействий существенно возрастает. Например, карбоксильная группа глутамина и аминогруппа лизина образуют солевой мостик в белковой молекуле (Рисунок 1.8), $\Delta G = -3 - 4$ ккал/моль, разрыв которого может катастрофически сказаться на ферментативной реакции.

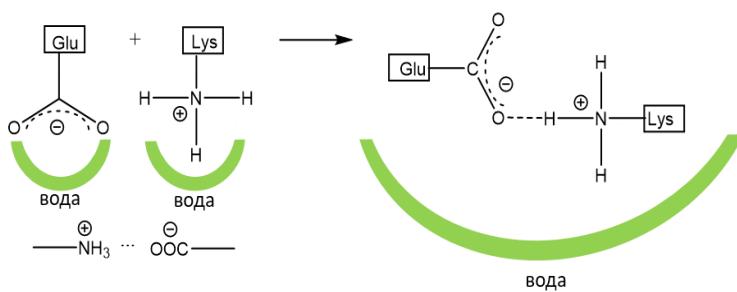


Рисунок 1.8. Образование солевого мостика в белке.

Следующий тип слабых взаимодействий – **гидрофобные взаимодействия** (Рисунок 1.9). Перенос неполярного остатка из воды в неполярную среду активного центра фермента – это выгодный процесс. В водной среде вокруг неполярного остатка образуется упорядоченная вода, из-за чего энтропия системы понижается, а при переходе в неполярную среду происходит разрушение упорядоченных (льдоподобных) структур воды, в результате чего энтропии увеличивается, т.е. это энтропийно выгодный процесс.

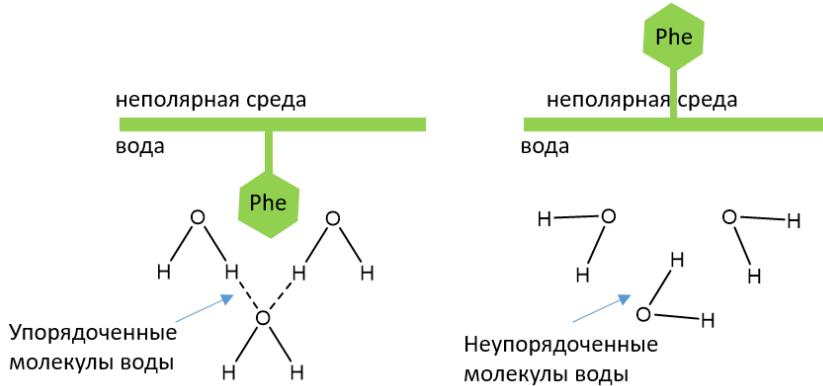


Рисунок 1.9. Переход боковой цепи остатка фенилаланина из раствора внутрь белковой молекулы.

Субстраты, имеющие гидрофобные фрагменты, чрезвычайно широко распространены, поэтому **гидрофобные взаимодействия особо важны для ферментативного катализа**.

Общий кислотно-основный катализ в механизме действия ферментов.

Существует много аминокислотных остатков, которые имеют ту или иную кислотную или основную форму с соответствующими значениями pK_a . Это играет роль и в катализе, и в структуре белка. В Таблице 1.3. приведены некие ориентировочные, *средние* значения pK_a для некоторых аминокислот (Помним, что значение pK_a зависит от среды).

Таблица 1.3. Прототропные группы ферментов.

Аминокислотный остаток в молекуле белка	Кислотная форма	Основная форма	pK_a
N-концевой	$\alpha\text{-NH}_3^+$	$\alpha\text{-NH}_2$	7.8
C-концевой	$\alpha\text{-CO}_2\text{H}$	$\alpha\text{-CO}_2^-$	3.8
Аспарагиновая кислота	$\beta,\gamma\text{-CO}_2\text{H}$	$\beta,\gamma\text{-CO}_2^-$	4.4/4.6
Глутаминовая кислота			
Гистидин	Ион имидазолия	Имидазол	7.0
Цистеин	$-\text{SH}$	$-\text{S}^-$	8.7
Тирозин	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{O}^-$	9.6
Лизин	$\varepsilon\text{-NH}_3^+$	$\varepsilon\text{-NH}_2$	10.4
Серин	$\beta\text{-OH}$	$\beta\text{-O}^-$	13
Тreonин			

Аргинин	$-\text{NH}(\text{C}=\text{NH}_2)\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}(\text{C}=\text{NH}_2)\text{NH}_2$	12.5
Пептид	$\text{R}-\text{CO}-\text{NHR}'$	$\text{R}-\text{CO}-\text{N}^+-\text{R}'$	14.8

Таким образом, в ферментах содержится огромное количество групп, которые выступают как кислотно-основные катализаторы.

При взаимодействии субстрата с активным центром фермента папаина участвует много разных типов взаимодействий: электростатические, водородные, гидрофобные взаимодействия (гидрофобный карман) (Рисунок 1.10). Все это создает прочный фермент-субстратный комплекс до того, как начнется химическая стадия – атака цистеином по карбонильному углероду.

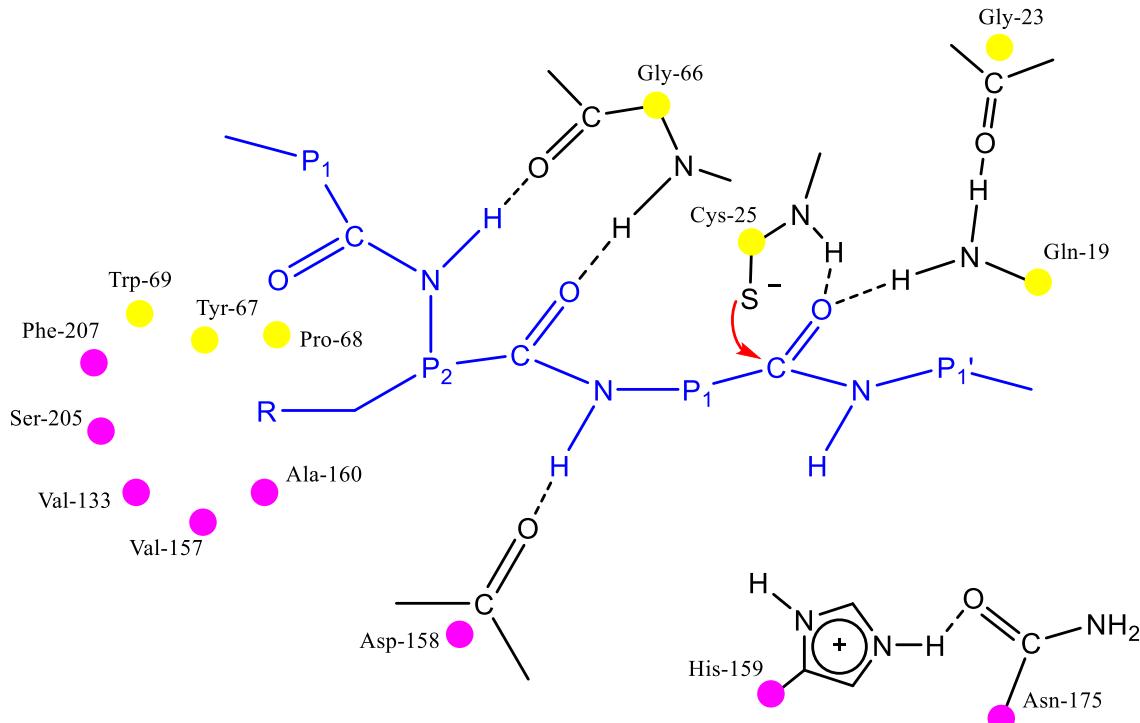


Рисунок 1.10. Активный центр папаина.

Сольватация – десольватация тоже играет огромную роль в катализе (Рисунок 1.11). Казалось бы, когда субстрат был в свободном состоянии, у него была высокая энтропия, а когда он пришел в активный центр фермента и произошло его ориентирование – энтропия снизилась. Процесс энтропийно не выгоден, но что является его движущей силой? При связывании субстрата из активного центра фермента вытесняется вода, что сопровождается выделением энергии. Субстрату очень часто бывает «некорошо» с водой, а десольватированный комплекс – гораздо более выгодное состояние для него.

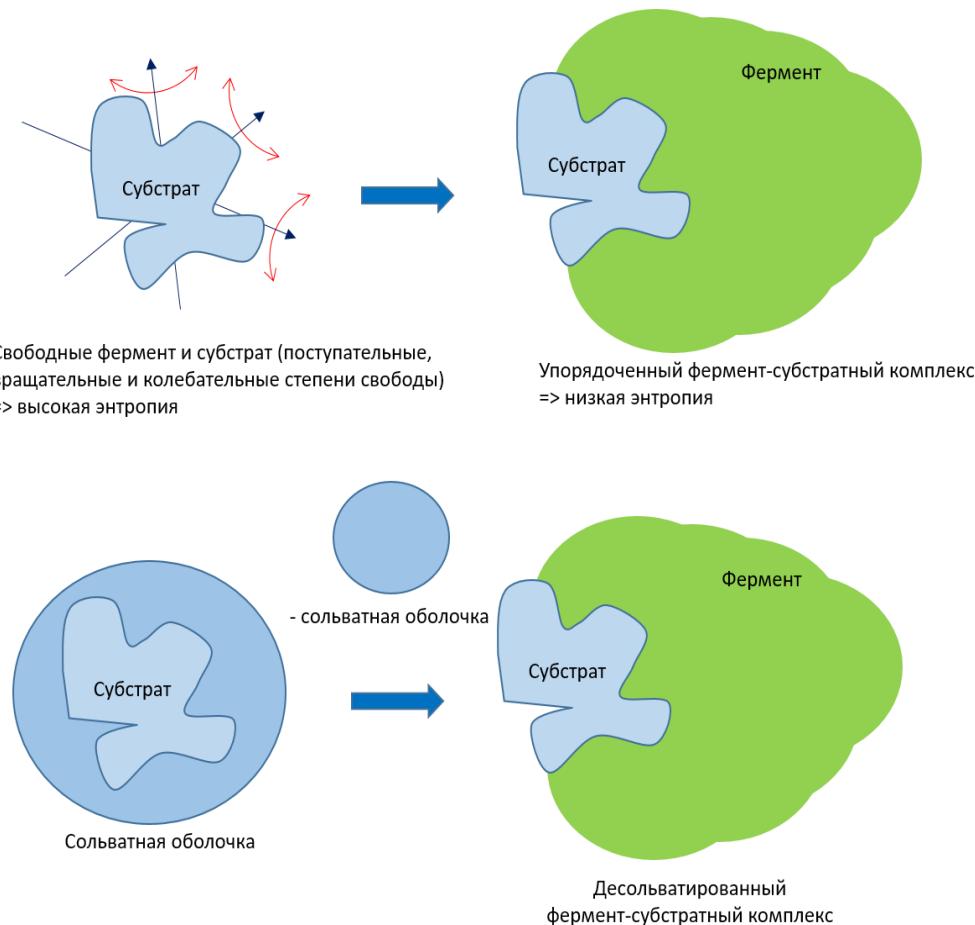


Рисунок 1.11. Роль сольватации в связывании субстрата ферментом.

Теперь рассмотрим еще одну особенность связывания субстрата с ферментом. В упрощенном виде энергетическую схему ферментативной реакции можно представить в виде как на Рисунке 1.12. Барьер свободной энергии разбит на две части, первый барьер отражает связывание субстрата ферментом, а второй – непосредственно химическую стадию процесса.

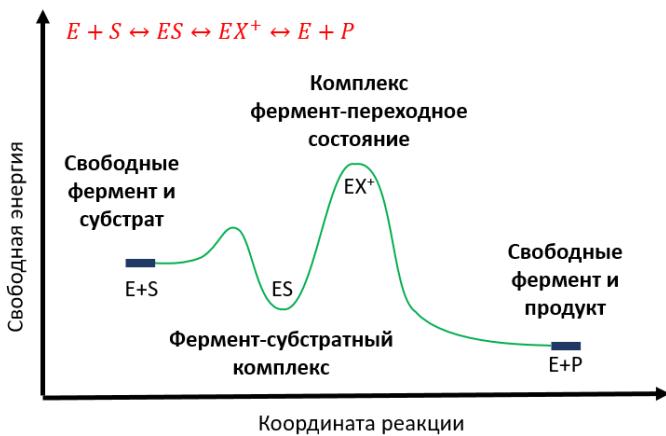


Рисунок 1.12. Энергетический профиль ферментативной реакции.

Для превращений, которые претерпевает во время реакции субстрат, можно провести следующую аналогию: субстрат – это палочка, а химическое превращение – это разламывание палочки (Рисунок 1.13).



Рисунок 1.13. Превращение субстрата в ферментативной реакции.

Чтобы разломать палочку-субстрат, нужно ее сначала согнуть, чтобы она легче разломилась. На это требуется много усилий, и, если ферменту будет комплементарна палочка-сходный субстрат, ее будет достаточно разбить (Рисунок 1.14).



Рисунок 1.14. Комplementарность фермента исходному субстрату.

Если же ферменту будет комплементарна уже согнутая палочка (переходное состояние), то она разрушится гораздо легче (Рисунок 1.15).



Рисунок 1.15. Комplementарность фермента переходному состоянию.

Снижение энергии активации ферментативной реакции происходит за счет предпочтительного связывания переходного состояния ферментом.

Классификация ферментов. Это четырехномерная классификация, в которой обозначение фермента записывается следующим образом:

X.X.X.X

Первая цифра обозначает **класс** фермента, вторая – **подкласс**, третья – **подподкласс** и четвертая – **порядковый номер** фермента.

К классу 1 относят **оксидоредуктазы**. Это ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. В качестве доноров электронов могут выступать группы: спирт, альдегид или амин и тд. Тип донора электронов обозначает подкласс (вторая цифра X в обозначении фермента 1.X.Y.Z.):

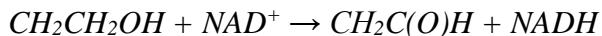
- 1.1. CH-OH → HC=O (окисление спирта в альдегид);
- 1.2. HC=O → COOH (окисление альдегида в кислоту);

и так далее. Третья цифра Y определяется типом акцептора электронов, например:

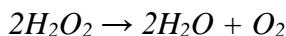
1.1.1. NAD⁺ (большой подподкласс НАД-зависимых ферментов)

Примеры ферментов-оксиредуктаз и катализируемых ими реакций:

1.1.1.1. Алкогольдегидрогеназа



1.1.1.6. Каталаза



Второй класс (2.) ферментов – **трансферазы**, которые осуществляют перенос группы A субстрата S₁ на субстрат S₂, где A и S₁ не могут быть водой или OH, поскольку это вынесено в отдельный класс. Некоторые подклассы:

2.1. Ферменты, переносящие одноуглеродный остаток;

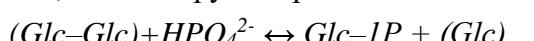
2.2. Ферменты, переносящие кетонную группу C=O;

2.4. Ферменты, переносящие гликозил;

2.7. Ферменты, переносящие фосфорсодержащую группу.

В качестве примера можно привести фермент

2.4.1.1. Фосфорилаза, катализирует перенос глюкозы на фосфат:



Класс 3. представлен **гидролазами**, это очень обширный класс и наиболее изученный. Это ферменты, катализирующие гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных, гликозильных и других групп и связей (C–C, C–Hal, P–N). Некоторые подклассы:

3.1. Ферменты, действующие на сложные эфиры;

3.1. Ферменты, действующие на гликозиды;

3.3. Ферменты, действующие на простые эфиры;

3.4. Ферменты, действующие на пептиды.

Примеры представителей класса гидролаз:

3.4.21.1 Химотрипсин. В основном он действует на пептидную связь белков (пептидаза), но на самом деле он имеет более широкую специфичность, например, он способен гидролизовать сложноэфирную связь в паранитрофениловом эфире триметилуксусной кислоты.

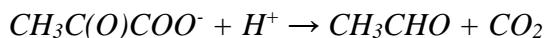
3.1.1.7. Ацетилхолинэстераза, катализирует гидролиз ацетилхолина в синапсах, при этом образуется холинацетат.

Класс 4 – это **лиазы**, катализируют реакции отщепления групп от субстратов (C–C, C–O, C–N) по негидролитическому механизму с образованием двойной связи (C=C, C=O, C=N) или присоединение по двойной связи. Некоторые подклассы:

4.1. Ферменты, действующие на связь C–C;

4.2. Ферменты, действующие на связь C–O.

Пример – 4.1.1.1. Пируватдекарбоксилаза, которая катализирует отщепление молекулы углекислого газа от пирувата:



Класс 5 – это **изомеразы**, которые катализируют взаимопревращения различных изомеров (оптических, геометрических и химических). Некоторые подклассы:

- 5.1. Рацемазы и эпимеразы;
- 5.2. Цис-транс-изомеразы;
- 5.3. Внутримолекулярные оксиредуктазы.

Пример представителя этого класса – 5.3.1.9. Глюкозо-6-фосфатизомераза, катализирует внутримолекулярный перенос (Схема 1.11.)

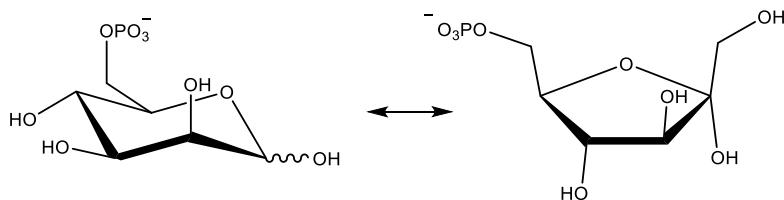
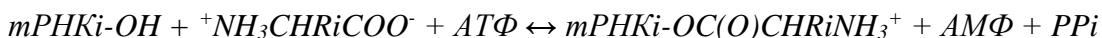


Схема 1.11. Реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатизомеразой.

Класс 6 – лигазы, они катализируют присоединение двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения. В результате образуются связи С–О, С–S, С–N, С–С. Некоторые подклассы:

- 6.1. Ферменты, образующие связи С–О;
- 6.4. Ферменты, образующие связи С–С.

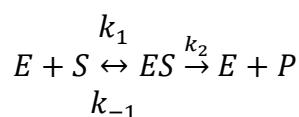
Подподкласс 6.1.1. этого класса представлен лигазами, образующими аминоацил-тРНК (участвуют в синтезе белка).



Пример – 6.1.1.1. тирозил тРНК синтетаза, катализирует перенос тирозина в реакции:



Ферментативная кинетика. Существует много вариантов кинетических схем для ферментативных реакций, но нам пока достаточно рассмотреть двухстадийную схему:



Скорость v ферментативной реакции, следующей этой схеме, описывает **уравнение Михаэлиса-Ментен:**

$$v = \frac{k_2 [E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

где $[E_0]$ – начальная концентрация фермента, $[S]$ – текущая концентрация субстрата, $V_{max} = k_2 [E_0]$ – максимальная скорость реакции (**катализическая константа**), $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ – **константа Михаэлиса**. Графически решения этого уравнения представляют собой гиперболу (Рисунок 1.16), у которой есть две асимптоты, одна из которых – максимальная скорость реакции (когда концентрация субстрата стремится к бесконечности). Концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине от максимально достижимой, равна константе Михаэлиса.

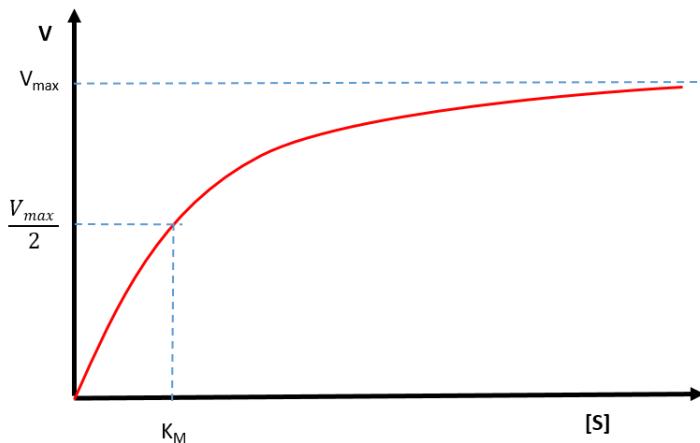


Рисунок 1.16. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Экспериментально определить параметры V_{max} и K_M можно с помощью разных методов, например, **метод Лайнуивера-Берка**, когда строят экспериментальную зависимость обратной скорости реакции, $\frac{1}{V}$ от обратной концентрации субстрата, $\frac{1}{[S]}$ (Рисунок 1.17). Катализическая константа (максимальная скорость) характеризует эффективность фермента. Чем она выше, тем «быстрее» работает фермент и тем большее число оборотов он совершает.

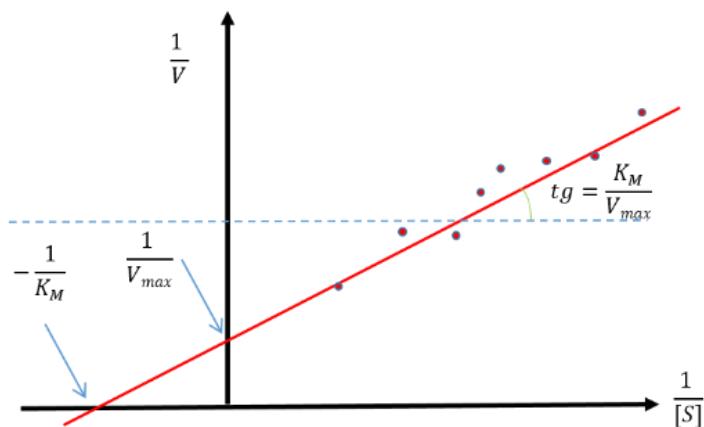


Рисунок 1.17. Метод Лайнуивера-Берка.

Числа оборотов для разных ферментов могут очень сильно различаться (Таблица 1.4.).

Таблица 1.4. Эффективность некоторых ферментов.

Фермент	Число оборотов в 1 мин при 37°C
Карбоангидраза	36 000 000
β-амилаза	1 100 000
Фосфоглюкомутаза	1 240

Отметим, что сильные различия в числах оборотов этих ферментов не мешает им быть эффективными.

По результатам исследований 500 различных ферментов установлены *средние, типичные значения катализитической константы (10^2 с^{-1}) и константы Михаэлиса (10^{-4} M) для ферментов*. Конечно, кроме этого есть как очень «медленные», так и «быстрые» ферменты, а сами распределения ферментов по константам имеет вид гауссова распределения.

Регуляция кинетических параметров ферментативных реакций осуществима с помощью:

- Ингибиции
- Варьирования рН среды
- Изменения температуры.

Рассмотрим сначала ингибицию. Различают следующие типы ингибиторов (вещества, замедляющие скорость ферментативной реакции):

Ингибиторы

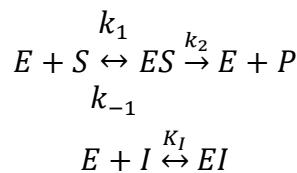
Обратимые

- Конкурентные;
- Неконкурентные;
- Бесконкурентные.

Необратимые

- Модификаторы;
- Субстратоподобные (суицидные).

Рассмотрим пример обратимого ингибиования – **конкурентное ингибиование**, когда субстрат и ингибитор конкурируют за один и тот же участок активного центра, причем если ингибитор занял активный центр, то субстрат туда уже не может «сесть». Кинетическая схема при этом несколько усложняется:



где K_I – константа ингибиования. В результате уравнение Михаэлиса-Ментен также видоизменяется:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M(1 + \frac{[I]}{K_I}) + [S]}$$

Получается, что максимальная скорость не зависит от наличия ингибитора, однако константа Михаэлиса изменяется при введении ингибитора, поскольку в новом уравнении Михаэлиса-Ментен именно она оказывается усложнена параметрами ингибитора – концентрация ингибитора $[I]$ и константа ингибирования K_I .

Теперь рассмотрим пример **необратимого ингибирования** – ингибирование сериновых гидролаз фосфорорганическими соединениями, например, дизопропилфторфосфатом или зарином. Необратимое ингибирование заключается в том, ингибитор необратимо ковалентно связывается с ферментом, и образуется неактивный фосфорил-фермент (Схема 1.12). Дальнейший катализ таким ферментом оказывается невозможным.

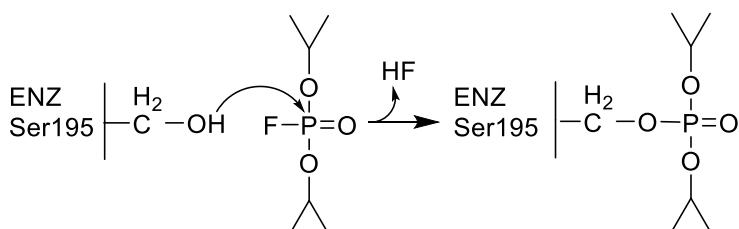


Схема 1.12. Ингибирование сериновых протеаз дизопропилфторфосфатом.

Теперь обсудим **влияние pH на ферментативную активность**. Для разных ферментов скорости по-разному зависят от pH (Таблица 1.5.). Например, оптимальными значениями pH пепсина, фермента, который функционирует в кислой среде желудка, являются значения pH 1.5-2. Гораздо большее число ферментов функционирует в области нейтрального pH; наконец, есть ферменты, активные в щелочной среде, например, аргиназа.

Таблица 1.5. Оптимальные значения pH для ряда ферментов.

Фермент	Оптимум pH
Пепсин	1.5
Трипсин	7.7
Каталаза	7.6
Аргиназа	9.7
Фумараза	7.8
Рибонуклеаза	7.8

Очень показательный пример, который стоит рассмотреть при обсуждении связи кислотности среды и активностью фермента – это **макроавтофагия**, т.е. уничтожение клеткой поврежденных органелл и белков. Вокруг поврежденной органеллы образуется двойная мембрана – автофагосома, которая затем движется в цитоплазме клетки к

лизосоме. **Лизосомы** – это органеллы диаметром 0.2–2.0 мкм, окруженные простой мембраной и способные принимать самые разные формы; в клетке содержится несколько сотен лизосом. Дальше происходит слияние автофагосомы с лизосомой, и лизосомальные ферменты в кислом рН деградируют содержимое автофагосомы. В лизосоме участвует очень много – 40 типов – расщепляющих ферментов – гидролаз с оптимумом действия в кислой области, рН 4.5–5.0. Очень важно отметить, что эти ферменты имеют низкую активность при нейтральных рН, что защищает клетку от самопреваривания в случае, если лизосомальный фермент попадает в цитоплазму с рН 7.0-7.3. Лизосомы обогащаются протонами за счет АТФ-зависимых протонных насосов. Главный фермент лизосомы – это кислая фосфатаза, однако помимо нее есть много других ферментов, которые участвуют в расщеплении поврежденных органелл или неправильных белков (нуклеазы, протеиназы, гликозидазы, липазы, сульфатазы, фосфолипазы).

Теперь рассмотрим еще один интересный факт. Обычно, когда мы разбираем зависимость константы скорости реакции от рН, мы учитываем, что в катализаторе есть активные группы с разными значениями рК_a. В случае химотрипсина зависимость отношения каталитической константы к константе Михаэлиса от рН имеет колоколобразный вид (Рисунок 1.18), как будто бы в ферменте есть два типа групп с разными значениями рК_a.

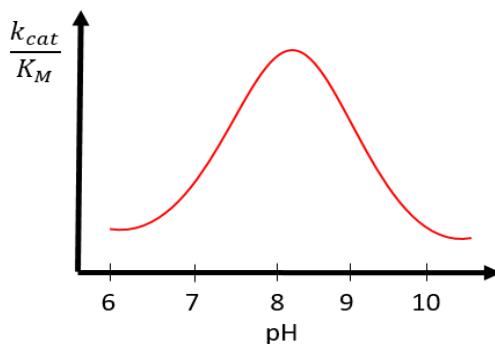


Рисунок 1.18. pH-зависимость отношения констант ферментативной реакции.

На самом деле такая форма зависимости связана с другой причиной. Дело в том, что зависимость каталитической константы от рН и константы Михаэлиса от рН имеют вид кривых с насыщением (Рисунок 1.19), при этом насыщение наступает при разных значениях рН для каждой из констант. Константа Михаэлиса начинает резко возрастать при рН больше 9, что связано с *разрывом одного солевого мостика в структуре химотрипсина* (поскольку рК_a аминогруппы лизина лежит в этом районе). Это приводит к очень существенным конформационным изменениям гидрофобного кармана, в который входит этот мостик.

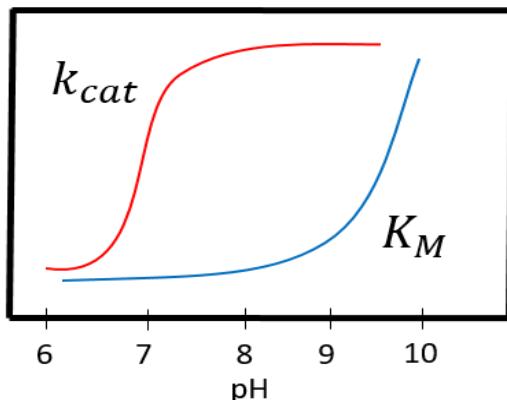


Рисунок 1.19. pH-зависимость каталитической константы и константы Михаэлиса химотрипсина.

Теперь рассмотрим влияние температуры на скорость реакции. Согласно правилу Вант-Гоффа, повышение температуры на 10 градусов приводит к повышению скорости в 2-5 раз. Следовательно, скорость ферментативной реакции должна сильно увеличиваться с ростом температуры. Однако на практике этого не происходит, поскольку при повышении температуры в ферментах протекают другие процессы, которые связаны с инактивацией фермента, т.е. его денатурацией. При достижении определенного

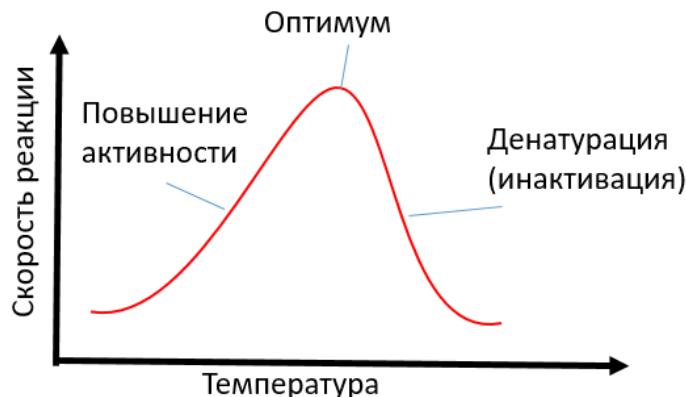


Рисунок 1.20. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

значения температуры инактивация начинает очень сильно проявляться, и скорость реакции снижается. В результате появляется максимум на зависимости скорости от температуры (Рисунок 1.20).

Теперь определим температурные зависимости каталитической и термодинамических констант реакции. Для каталитической константы используют уравнение Аррениуса:

$$k = k_0 e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

Отсюда можно найти значение энергии активации E_A , используя зависимость $\ln k$ от $\frac{1}{T}$. Что касается термодинамической константы (константы равновесия), известно, что

$$\frac{d \ln K}{d(\frac{1}{T})} = -\frac{\Delta H}{R}.$$

В заключение лекции перечислим факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов:

- Сближение и ориентация (перевод реакции во внутримолекулярный режим);
- Существование различных механизмов работы ферментов (напряжение и деформация/индуцированное соответствие);
- Природа катализа – общий кислотно-основный катализ/ковалентный катализ (как в органической химии);
- Эффекты микросреды (кислотность, температура, ингибиторы).

Лекция 2. Сериновые протеазы.

Основные сведения о сериновых гидролазах. Некоторые примеры ферментов этого класса:

- Ацетилхолинэстераза (EC 3.1.1.7)
- Щелочная фосфатаза (EC 3.1.3.1)
- Кислая фосфатаза (EC 3.1.3.2)
- α -D-глюкозидаза (EC 3.2.1.20)
- β -D-галактозидаза (EC 3.2.1.21)

Особый подкласс (3.4.) гидролаз представлены сериновыми протеазами:

- Химотрипсин (EC 3.4.21.1), M_w 25 кДа, 245 а.к.
- Трипсин (EC 3.4.21.4), M_w 24 кДа, 223 а.к.
- Эластаза (EC 3.4.21.11), M_w 26 кДа, 240 а.к.
- Энтеропептидаза (EC 3.4.21.9)
- Факторы свертывания крови IIa, VIIa, IXa–XIIa, белок C
- Ферменты системы комплемента
- Ферменты фибринолиза
- Плазмин (EC 3.4.21.7)
- Тканевой активатор плазминогена (EC 3.4.21.68)
- Катепсин G (EC 3.4.21.20)
- Акрозин (EC 3.4.21.10)
- Субтилизин Карсберг (*Bacillus subtilis*) (EC 3.4.1.62), M_w 28 кДа, 275 а.к.

Среди перечисленных примеров сериновых гидролаз почти все встречаются у животных, кроме *субтилизина*, являющегося бактериальным и имеющего несколько отличную от животных ферментов структуру. Также нужно отметить, что природным субстратом для сериновых гидролаз являются белки, при этом гидролиз цепи может катализироваться в разных участках пептида; ферменты, катализирующие гидролиз с конца цепи, называют **экзопептидазами**, а с середины цепи – **эндопептидазами** (например, химотрипсин, эластаза).

Все животные сериновые протеазы на 80% гомологичны, т.е. имеют очень близкую структуру. Все три фермента содержат в своей структуре две β -бочки, образованные несколькими β -листами, и две α -спирали, одна из которых расположена на С-конце. Концы β -бочек – это выступающие на поверхность петли, которые являются вариабельными и играют огромную роль в изменении специфичности ферментов. Каталитически важные остатки ферментов – это серин, гистидин и аспарагиновая кислота, они расположены в области контакта β -бочек. *Субтилизин существенно отличается от рассмотренных ферментов*, в нем содержится больше α -спиралей и совершенно другая укладка цепи. В данном случае имеет место эволюция от различных ферментов с разной структурой к одному механизму катализа – **конвергентный тип эволюции**.

Необратимое ингибиование сериновых гидролаз. Принцип работы необратимых ингибиторов уже был рассмотрен ранее в Лекции 1. Интересно отметить, что в трипсине содержится тридцать четыре остатка серина, однако один из необратимых ингибиторов сериновых протеаз – дизопропилфосфотиод – реагирует только с серином-195, и этого оказывается достаточным для необратимого ингибиования фермента. Существуют и другие ингибиторы – сульфонилиы. Тут следует вспомнить Дэвида Блоу (Davis Blow), который в 1967 году путем диффузии тозилфторида в кристалл химотрипсина получил неактивный химотрипсин. Для него впоследствии удалось получить данные РСА (впервые для ингибиированного фермента!), согласно которым установлено, что тозилфторид связан с серином-195, который, в свою очередь, располагается недалеко от гистидина-57; при этом имидазол гистидина-57 находится вблизи карбоксильной группы аспарагиновой кислоты-102. Сайт-направленный мутагенез субтилизина подтвердил, что аспарагиновая кислота, гистидин и серин необходимы для катализа. Замены Asp32Ala, His64Ala, или Ser221Ala приводят к падению активности фермента (k_{cat} снижается в $3 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^6$, и $2 \cdot 10^6$ раз, соответственно).

Существует ингибитор химотрипсина, избирательно алкилирующий только гистидин-57 – N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (Схема 2.1.).

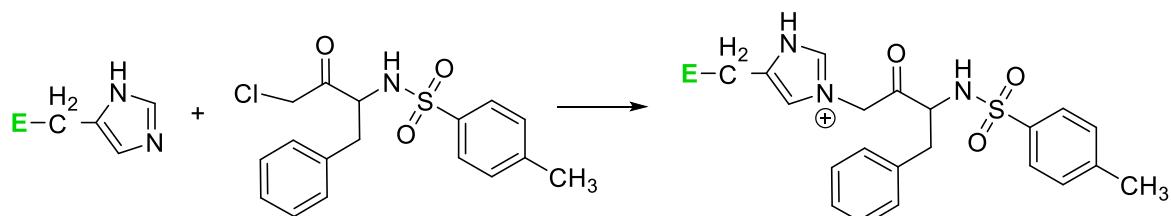


Схема 2.1. Ингибиование химотрипсина.

Активный центр химотрипсина. Рассмотрим важнейшие аминокислотные остатки в активном центре химотрипсина (Рисунок 2.1).

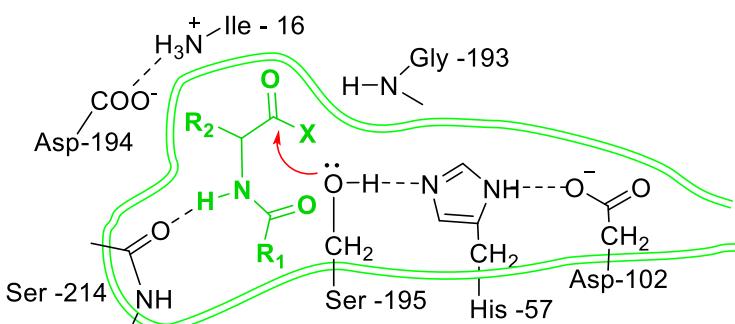


Рисунок 2.1. Строение активного центра химотрипсина.

Так, серин-214 образует дополнительную водородную связь с субстратом, благодаря чему реализуется принцип многоточечного взаимодействия. Искусственная замена данного остатка приводит к изменению константы михаэлиса. Глицин-193 тоже важен в катализе. Далее, изолейцин-16 и аспартат-14 создают солевой мостик,

участвующий в образовании гидрофобного кармана для включения радикала субстрата. Отметим, что гидроксильная группа серина-195 находится на расстоянии 3-4 Å от одного из атомов азота, принадлежащего имидазольному кольцу гистидина-57. Эта связь упрочняется при связывании субстрата, поскольку при этом происходят конформационные изменения – кольцо гистидина-57 поворачивается на 30 градусов и дополнительно приближает рассматриваемый атом азота к серину. Другой атом азота гистидина-57 расположен на расстоянии 3 Å от Asp-102, образуя каталитически важную систему переноса протонов. Согласно данным ЯМР и диффузии нейтронов, значение pK_a аспартата очень низко (менее 2), что свидетельствует о высокой полярности среды, значит, в условиях катализа аспартат является незаряженным и поэтому он не оттягивает на себя протон гистидина полностью, а электростатически взаимодействует с ним.

Специфичность сериновых протеаз. Специфичность в случае сериновых гидродаз пределяется структурой гидрофобного кармана. Так, трипсин, специфичный к аргинину и лизину (разрываемая связь указана стрелкой, Рисунок 2.2.), содержит на дне своего кармана заряженный аспартат-189, который электростатически взаимодействует с аминогруппой лизина. В гидрофобный карман химотрипсина, у которого на дне расположен незаряженный серин-189, помещаются гидрофобные ароматические остатки – тирозин, триптофан, фенилаланин. У эластазы карман маленький, и его основная специфичность – к аланину. Кроме 189-ого остатка, в формировании кармана фермента играют роль еще два остатка – 226-ой и 216-ый, которые расположены на «входе» в карман. В случае эластазы это объемные валин и треонин, поэтому её карман маленький, а у трипсина и химотрипсина – два глицина, поэтому карман больше.

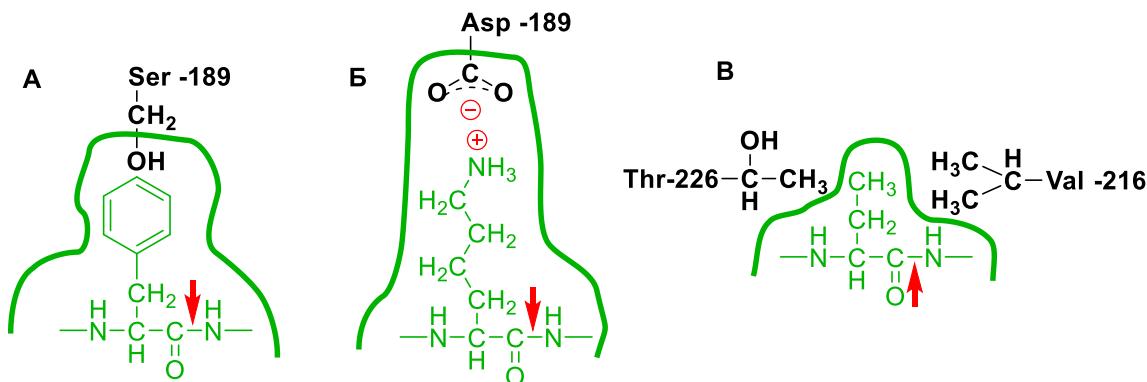


Рисунок 2.2. Гидрофобные карманы разных сериновых протеаз

Поговорим о субстратной специфичности сериновых протеаз. Она достаточно широка *кроме пептидов, гидролизу подвергаются также сложные эфиры (паранитрофенилацетат), анилидные субстраты.* Обычно анилидные субстраты характеризуются величинами каталитической константы около сотых или десятых долей обратной секунды. Однако существует анилидный субстрат – тетрапептид, каталитическая константа которого равна 110 c^{-1} (Рисунок 2.3)

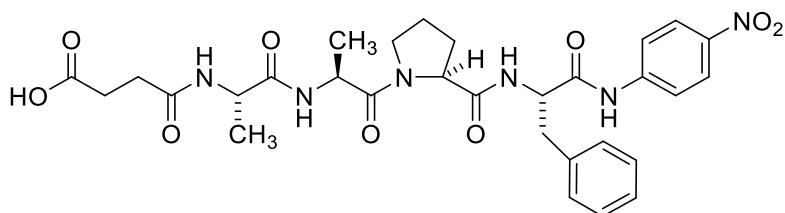


Рисунок 2.3. N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe п-нитроанилид.

Посмотрим, что важно при выборе субстрата. Схема катализа химотрипсином – трехстадийная, состоит из двух химических стадий (Схема 2.2).

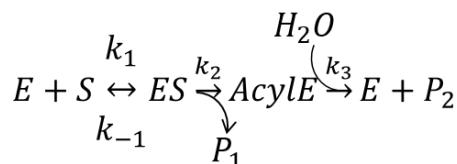


Схема 2.2.

Общая катализитическая константа рассчитывается сложно:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

и чтобы определить константы отдельных стадий, нужно прибегать к специальным приемам. Так, если взять паранитрофениловый эфир (хорошая уходящая группа), то $k_3 \ll k_2$, лимитирующая стадия – образование конечного продукта; в случае анилидов (плохая уходящая группа) $k_3 >> k_2$, т.е. лимитирующая стадия – ацилирование. На константы скоростей влияет строение субстрата (Таблица 2.1.).

Таблица 2.1. Влияние строения субстрата на эффективность катализа.

Субстрат (R-COOCH ₃)	K _s , М	k ₂ , с ⁻¹	k ₃ , с ⁻¹	k ₂ /k ₃ = k _{cat} /K _M , М ⁻¹ с ⁻¹	k _{on} , М ⁻¹ с ⁻¹
CH ₃ —	0.4	0	0.008	<<0.1	0.25
C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ — (гидрокоричная)	0.003	0.67	0.2	200	0.2
H—C—NHCOCH ₃ (N-ацетилглицил)	0.7	0.1	1.2	0.13	2.5
C ₆ H ₅ CH ₂ CH—NHCOCH ₃ (N-ацетилфенилаланил)	0.008	800	110	100000	1.9

Например, если у нас присутствует метильный радикал в субстрате, очень низкие константы сравнивают с константой щелочного гидролиза. Если берем вместо метила гидрофобный ароматический фрагмент – гидрокоричный остаток в субстрате – то значения всех констант улучшаются по сравнению с щелочным гидролизом. Если берем N-ацетилирование, благодаря которому возникает дополнительная водородная связь в фермент-субстратном комплексе между субстратом и ацильной группой серина- 214,

значения констант еще сильнее улучшаются. То есть взаимодействия субстрата с гидрофобным карманом и N-ацильной группы существенно важны для ускорения каталитической реакции.

При изучении топографии активного центра (т.е. взаимного расположения участков связывания и каталитического участка) исследовали взаимодействие химотрипсина с рядом субстратов с переменным количеством звеньев (C_nH_{2n+2}). Выяснилось, что при $n > 3$ каталитическая константа резко возрастает. Если в субстрате возникает разветвление цепи, то значение константы наоборот, падает, поскольку субстрат в таком случае не помещается в активный центр. То, как длина цепи влияет на значения констант каталитической и Михаэлиса, приведено в Таблице 2.2.

Таблица 2.2. Эффективность гидролиза синтетических субстратов химотрипсина.

Субстрат	$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{мM}$
N-Suc-L-Phe-pNA	0.009	1.1
N-Ac-L-Phe-pNA	0.01	0.4
N-Glt-Ala- Phe-pNA	0.38	1
N-Suc-Ala-Ala-Tyr-pNA	14	0.16
N-Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	9.8	0.23
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	45	0.043

Теперь поговорим больше о возможности изменения специфичности химотрипсина. Как уже упоминалось, на дне гидрофобного кармана расположен незаряженный серин-189 на дне кармана, можно ли менять специфичность? Замена глицина на аланин в 216 положении химотрипсина приводит к смене специфичности – теперь вместо аргинина связывается лизин.

Интересно отметить, что поскольку химотрипсин и трипсин имеют очень схожие между собой структуры, можно было бы ожидать, что если в химотрипсине заменить серин-189 на аспартат, как в трипсине, то произойдет изменение специфичности химотрипсина (приблизится к таковой у трипсина). Однако такая замена лишь *одного аминокислотного остатка на дне кармана не меняет специфичности фермента* – требуется провести дополнительные замены в петлях. Это свидетельствует о том, что не только структура активного центра, но и других участков фермента играет роль в специфичности.

Теперь поговорим о ранее упомянутом солевом мостице в активном центре химотрипсина. В прошлой лекции мы уже показали, что у данного фермента существует оптимальное значение pH среды, и что при повышении значения pH происходит увеличение константы Михаэлиса, связанное с разрешением солевого мостика. Откуда берется этот мостик? Дело в том, что многие гидролазы синтезируются в виде предшественников – неактивных ферментов (**зимогенов**). Неактивный трипсин – **трипсиноген** – синтезируется в виде одноцепочечного белка, для которого существует

есть несколько вариантов активации: медленная (если в системе уже и так много химотрипсина) и быстрая (если в системе очень мало химотрипсина). В ходе активации трипсиногена происходит несколько разрывов исходной цепи, в результате чего конечный химотрипсин оказывается состоящим из трех отдельных полипептидных цепей, и возникающий при этом солевой мостик связывает две из этих цепей.

Механизм действия химотрипсина. Рассмотрим в общих чертах, как связывается N-ацетил-L-триптофаниланинамид с химотрипсином. Сначала происходит образование водородных связей между карбонильной группой субстрата и NH-группами Gly-193 и Ser-195. При этом происходит поворот OH-группы серина-195 в сторону субстрата. Кроме этого, образуется водородная связь между субстратом и серином-214 фермента, что оказывается важным для правильной ориентации субстрата. Затем происходит образование тетраэдрического промежуточного соединения. При этом OH-группа серина-195 продолжает поворот и образует связь с субстратом; кроме этого, образуются более прочные водородные связи между карбонильной группой субстрата и группами остава фермента (NH-группами глицина-193 и серина-195, и O- серина-195). На следующей стадии происходит распад тетраэдрического промежуточного соединения с высвобождением аланинамида и образованием ацилфермента. Аланинамид не может оставаться связанным, поскольку он находится в слишком тесном контакте с карбонильной группой ацилфермента.

Теперь обсудим **механизм катализа сериновыми протеазами более подробно**. На первом этапе происходит образование нековалентного фермент-субстратного комплекса ES. Существенную роль играет *каталитическая триада*, где гистидин выступает в роли основания, серин – нуклеофила. Серин, входящий в состав активного центра фермента, атакует субстрат по карбонильному атому углерода, и в этот же момент образуются длинные дополнительные водородные связи между атомом кислорода субстрата, связанным с атакуемым атомом углерода, и аминогруппами серина-195 и глицина-193 (Схема 2.3).

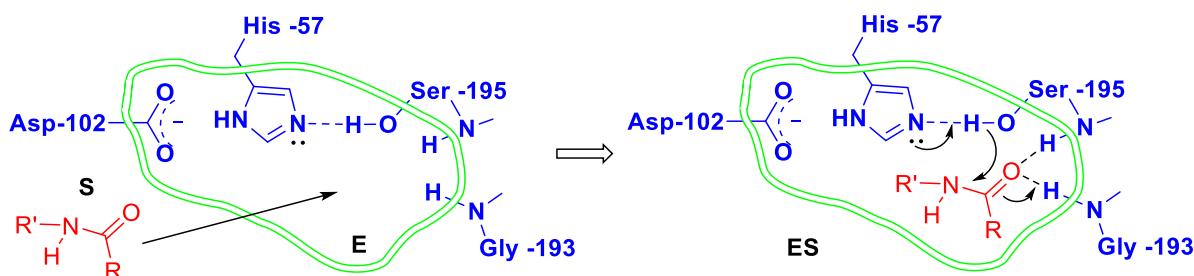


Схема 2.3. Связывание субстрата с активным центром сериновой протеазы.

Затем происходит переход протона OH-группы серина-195 на атом азота гистидина-57 и удлинение C=O связи в субстрате, сопровождающееся одновременным сокращением длины и увеличением прочности водородных связей с глицином-193 и серином-195 (возникает **оксоанионная дырка**), благодаря чему происходит стабилизация переходного состояния. В результате образуется **тетраэдрическое**

переходное состояние Т11 (Схема 2.4). Дальше протон с гистидина переходит на аминогруппу гидролизуемого пептида (уходящую группу) – первый продукт; также образуется второй продукт – **ацилфермент ЕА**. Эта стадия является скоростьлимитирующей.

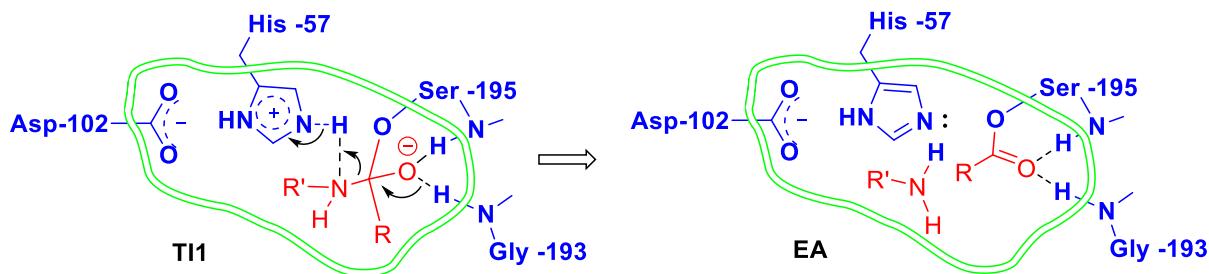


Схема 2.4. Образование тетраэдрического переходного состояния и ацилфермента.

Отметим, что *гидролиз сложных тиоэфиров не идет под действием химотрипсина*, так как у серы меньше тенденций к образованию водородных связей, из-за чего не происходит стабилизация переходного состояния.

Теперь перейдем к превращениям образовавшегося ацилфермента ЕА. Главный участник реакции – молекула воды; гистидин забирает от нее протон, а образующийся ОН анион атакует карбонильный атом углерода с образованием тетраэдрического ПС, которое тоже стабилизировано дополнительными водородными связями (Схема 2.5).

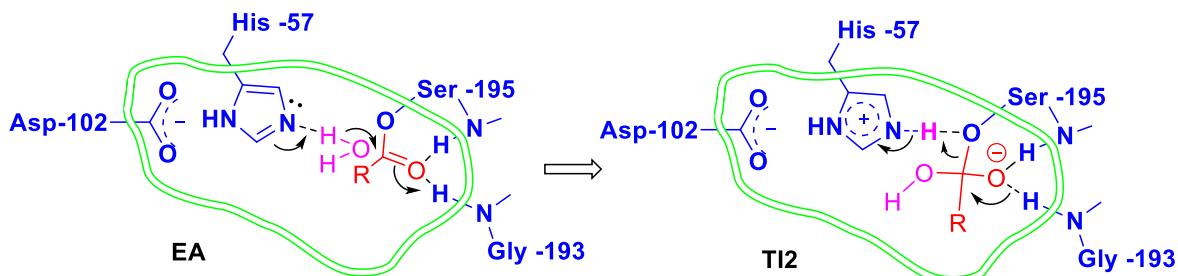


Схема 2.5. Атака ацилфермента молекулой воды.

На завершающей стадии протон уходит от гистидина на серин, и образуется комплекс фермента с окончательным продуктом ЕР (Схема 2.6).

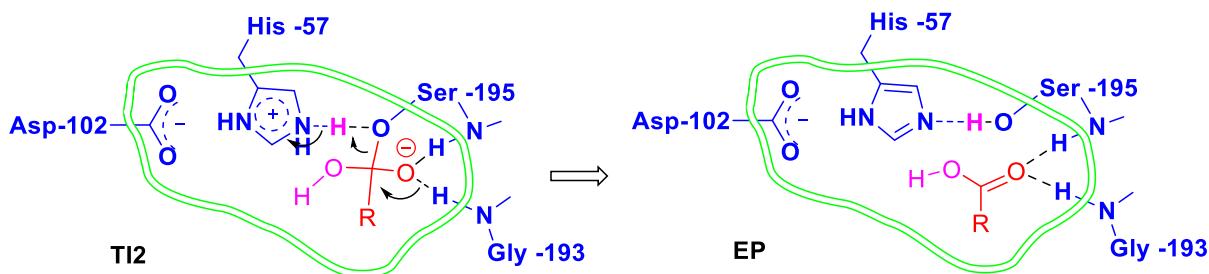


Схема 2.6. Образование окончательных продуктов реакции.

Продукт затем уходит из сферы реакции, освобождая активный центр фермента. **Ингибиторы сериновых протеаз.** Ингибиторы сериновых протеаз называются **серпины**. Они защищают фермент от преждевременной активации. Таких ингибиторов существует

довольно много, например, антитромбин III, благодаря которому коагуляция крови ограничивается местом повреждения сосуда. Недостаточная эффективность этого ингибитора приводит к образованию тромбов и инфаркту миокарда. Другой пример – ингибиторы ферментов поджелудочной железы, которые защищают органы от автолиза. Ингибитор трипсинаочно связывается с ферментом, закрывая аспрагин-189 остатком лизина, входящим в состав ингибитора. Гидролиз ингибитора трипсином – очень медленный, поскольку гидролизуемая в нем связь расположена далеко от серина- 195.

Лекция 3. Принципы механизмов ферментативного катализа.

Общие особенности ферментативного катализа. Классификация ферментов достаточно условна, есть возможность классифицировать по реакциям, которые они катализируют, *по структуре их классифицировать невозможно*. Очень часто ферменты с близкой структурой катализируют совершенно разные реакции, и наоборот, абсолютно разные по структуре ферменты катализируют одинаковые реакции.

Ферментативные реакции известны и используются человеком с древних времен (сыроделие, виноделие, пивоварение), однако долгое время ничего не было известно о природе ферментов, и вплоть до начала XX века ставили под сомнение, что ферменты являются белками. Почему долго не могли утвердить, что фермент является белком? Дело в том, что для ферментов характерна высокая химическая инертность (в противном случае белковая жизнь была бы невозможна). У белков есть малый набор реакционноспособных функциональных групп, происходящих из 21 аминокислоты: неполярные (глицин, аланин, валин), полярные (серин, глутамин, треонин, аспарагин), и ионизируемые (лизин, аргинин и др). Все они не слишком реакционноспособны, и если рассматривать варианты катализа с этими группами с точки зрения обычного оргсинтеза, то они в основном могут выступать лишь в роли общего кислотно-основного катализатора (карбоксилат-анион). По сути, у белка нет широких химических возможностей, чтобы быть очень эффективными катализаторами реакций типа гидролиза или нуклеофильного замещения.

Как правило, в ферменте пространственно разнесены центры, которые ответственны за связывание и за химическую стадии реакции. Если в ходе эволюции удалось сформировать эффективный химический центр, то за счет того, что сорбционный центр вынесен отдельно, специфичность фермента оказывается удобно регулировать. Также можно добиться того, что разные ферменты будут связывать одно и то же вещество, но при этом катализировать совершенно разные превращения. Так, одинаковый каталитический центр и разные центры связывания характерны, например, для ряда сериновых протеаз: специфичность в данном случае контролируется формой кармана и аминокислотой на его дне.

Причины эффективности ферментов. Эффективность ферментов очень высока. Например, алкогольдегидрогеназа превращает в альдегиды спирт, ускоряет эту реакцию в 500 млн раз. Гексоконаза –ускоряет фосфорилирование глюкозы в 10 млрд раз. Карбоангидраза ускоряет реакцию гидратации углекислого газа в 10^{11} раз. Вообще, максимальная химическая скорость реакции $K_B T/h = 10^{12} \text{ с}^{-1}$. К такой эффективности близка карбоангидраза. Ферменты, которые приводят реакцию к диффузионно контролируемому режиму, называются **эволюционно совершенными**. Как этого достигает фермент? Когда пытались изучить эффективность ферменты, сначала нашли, что он связывает субстрат. При этом происходит перевод реакции во внутримолекулярный режим, т.е. реализуется **катализ сближения**. Какой **максимальный**

катализический эффект мы можем получить при переводе реакции во внутримолекулярный режим? Для этого рассмотрим две реакции (Схема 3.1).

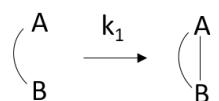
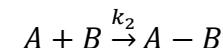


Схема 3.1. Сравнение меж- и внутримолекулярной реакций.

Какое максимальное возможное ускорение реакции? Считаем, что реакционная способность центров не изменилась при переходе от первой ко второй из этих реакций. Отношение скоростей реакции принимает вид:

$$\frac{v_2}{v_1} = \frac{k_2}{k_1} [A]$$

Скорости двух этих реакций будут одинаковы, если мы поместим вещество В в среду, состоящую из вещества А. Значит, максимальное ускорение реакции определяется максимально возможной концентрацией вещества А. Следовательно, катализ сближения может обеспечить ускорение реакции лишь на пару порядков. Величина, которая характеризует это ускорение, называется **эффективной молярностью**. Значит, высокая эффективность ферментативного катализа не может быть обоснована лишь просто катализом сближения.

На самом деле, в рамках ферментативного катализа происходит не только сближение фермента и субстрата, но и правильное ориентирование субстрата. Пусть у нас есть два амида (Рисунок 3.1).

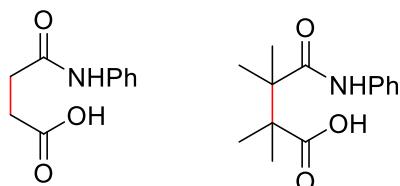


Рисунок 3.1. Структурно-родственные амиды с разной скоростью гидролиза.

В обоих случаях амидная связь гидролизуется достаточно быстро, однако соотношение констант скоростей составляет 1:1200. Это достигается за счет того, что во втором соединении из-за наличия двух метильных групп затруднено вращение вокруг связи С–С (показана красным на схеме), и в результате катализически активная в реакции гидролиза амидной связи группа – карбоксильная – оказывается «удачно» ориентирована относительно гидролизуемой связи.

На самом деле, при переводе реакции во внутримолекулярный режим имеет значение и энтропийный вклад. Можно снижать энтропийные потери на «ненужное» вращение связей внутри молекулы. Так, для внутримолекулярной реакции типа, как на Схеме 3.2, существует закономерность в изменении скорости реакции в зависимости от структуры молекулы (Таблица 3.1.)

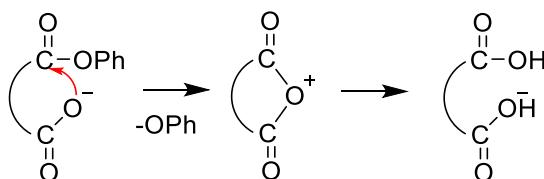


Схема 3.2. Внутримолекулярная реакция гидролиза сложноэфирной группы.

Таблица 3.1. Скорость реакций гидролиза ряда сложных эфиров.

№	Эфир	Относительная скорость реакции гидролиза
1		1
2		20
3		230
4		10 000
5		53 000

Ограничения внутреннего вращения за счет введения объемных групп или изменения кратности связей, приводящие к «правильной» ориентации в пространстве, а также напряжение структуры, которое снимается после гидролиза (как в эфире №5), приводит к существенному возрастанию скорости внутримолекулярной реакции гидролиза в ряду рассматриваемых эфиров.

Отметим, что в данном случае мы говорим о внутримолекулярных реакциях, однако *при переходе от бимолекулярной к внутримолекулярной реакции будет наблюдаться дополнительное возрастание скорости*. Так, для соединений, представленных на Рисунке 3.2, общее увеличение скорости реакции (с учетом перехода во внутримолекулярный режим) гидролиза сложноэфирной группы при переходе от первого соединения ко второму составляет около 10^6 – 10^7 раз (эффективная молярность при переходе от первого соединения ко второму 600М).

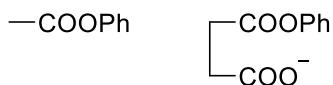


Рисунок 3.2. Структурно-родственные сложные эфиры с разной скоростью гидролиза.

Таким образом, даже «слабая» каталитически активная группы, которая правильно ориентирована относительно реагирующей химической связи, при условии, что также происходит переход реакции во внутримолекулярный режим, способна привести к ускорению реакции в более, чем миллион раз. Другими словами, катализ сближения очень важен для повышения эффективности ферментативных реакций.

Теперь рассмотрим нуклеофильный и электрофильный катализ. В ходе катализа образуется ковалентный интермедиат. Наиболее распространенный нуклеофильный катализатор – имидазол, а электрофильный, как правило, протекает с помощью ионов металлов. При нуклеофильном и электрофильном катализе скорость реакции повышается в 10^3 – 10^5 раз.

Кислотно-основный катализ приводит к увеличению скорости реакции в 10^3 раз. Наблюдаемое в данном случае ускорение не слишком велико, и это связано с тем, что чтобы протон был эффективным катализатором, необходимо разрушить плотную гидратную оболочку вокруг него. Раствор белка в воде, по сути, является коллоидной системой, и на поверхности белковой глобулы происходит множество физико-химических процессов. В частности, с водой вблизи раздела фаз разрушаются льдообразная структура воды в приповерхностном слое вокруг белковой глобулы. Физико-химические характеристики воды в этом состоянии изменяются, в частности, диэлектрическая проницаемость существенно снижается, т.е. полярность уменьшается, и соответственно прочность гидратной оболочки снижается. В результате скорость ферментативного кислотно-основного катализа увеличивается в гораздо большее число раз (больше, чем в 10^3 раз) по сравнению с обычным кислотно-основным катализом.

Что еще может приводить к увеличению скорости реакции, если брать примеры из классической органической химии? Это деформации. В момент, когда образуется фермент-субстратный комплекс, субстра в растворе и субстрат связанный – происходят изменения как в самом субстрате, так и в белке (конформационные изменения). Могут ли быть такие деформации быть полезны? Если субстрат деформируется так, что он становится больше похож на переходное состояние, и мы уменьшаем энергию активации. Пример – реакция гидролиза фосфорноэфирных связей в двух системах (Рисунок 3.3.)

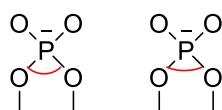


Рисунок 3.3. Фосфорные эфиры с разным углом между связями Р–О.

Скорость гидролиза в данном случае определяется углом между двумя связями Р–О (на Рисунке 3.3. показан красным цветом). Чем меньше величина этого угла, тем легче гидролизуется связь О–С. Во втором соединении благодаря этиленовому фрагменту, соединяющему два атома кислорода, величина рассматриваемого угла существенно снижается по сравнению с первым веществом, и в результате скорость гидролиза возрастает более, чем в 10^8 раз. Добавим, что в состав ферментов, гидролизующих

фосфодиэфирные связи, иногда входят ионы кальция или магния, которые координируют атомы кислорода и тем самым уменьшают величину рассматриваемого угла. В принципе, ни один из типов обычного гомогенного катализа не позволяет достигать эффективности ферментативного катализа.

Энергетический выигрыш при образовании фермент-субстратного комплекса. Специфика белка – он образует не вполне истинный раствор, а скорее, коллоидный раствор, т.е. система похожа на гетерогенную систему. Как ускоряется реакция в гетерогенном катализаторе: сначала сорбция и выделяется энергия, которая и используется для дальнейшего ускорения реакции. Возможно ли такое в ферментативном катализе? Есть ли выигрыш в энергии? И если он есть, может ли он быть использован для ускорения реакции? Нужно рассмотреть, за счет чего образуется фермент-субстратный комплекс.

Процесс взаимодействия фермент-субстратного комплекса энтропийно невыгоден. Компенсация энтропийных потерь может происходить за счет образования новых связей. Между ферментом и субстратом могут образовываться ковалентные связи, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. Обычно связывание фермента и субстрата происходит многоточечно. При этом происходят конформационные изменения в ферменте, которые тоже энтропийно невыгодны. В приповерхностном слое фермента меняется микровязкость среды, существенно выше чем вязкость обычной воды, и энтропийные потери снижаются при конформационных изменениях. Таким образом, если мы будем рассматривать такой процесс:



то свободная энергия Гиббса образования фермент-субстратного комплекса ES будет складываться из энергий Гиббса сближения $\Delta G_{\text{сближ.}}$ и взаимодействий внутри фермент-субстратного комплекса $\Delta G_{\text{внутр.}}$:

$$\Delta G_{\text{ассоц.}} = \Delta G_{\text{сближ.}} + \Delta G_{\text{внутр.}}^{E-S}$$

Надо оценить полую энергию, чтобы установить, есть ли выигрыш в энергии при образовании фермент-субстратного комплекса и понять, может ли этот выигрыш использоваться для ускорения химической реакции на следующей стадии ферментативной реакции. Как оценить первую составляющую $\Delta G_{\text{сближ.}}$? Возьмем самую простую модель – сферический белок и сферический субстрат. Надо оценить энтропийные потери, и потери за счет уменьшения вращательных степеней свободы можно оценить, как:

$$-T\Delta S_{\text{сближ.}} \sim 3 \div 5 \text{ ккал/моль}$$

Потери за счет сокращения внутренних степеней свободы оцениваются как:

$$-T\Delta S_{\text{сближ.}} \sim 20 \div 30 \text{ ккал/моль}$$

что близко к средней энергии одинарной ковалентной связи $C-C$.

Какие еще энтропийные потери могут возникать? Как правило, в фермент-субстратный комплекс включаются одна и более молекул воды. Потери за счет

вхождения одной молекулы воды в комплекс составляют около $4 \div 6$ ккал/моль. Таким образом, максимальные потери $\Delta G_{\text{сближ.}}$, возможные при образовании ф-с комплекса, составляют порядка $30 \div 4$ ккал/моль, минимальные – $3 \div 4$ ккал/моль (меньше быть не может).

Теперь оценим величину $\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S}$. Чаще всего связывание субстрата с ферментом происходит за счет гидрофобных взаимодействий. Обычно рассматривают две модели – **экстракционную и экстракционно-конформационную**. В рамках **экстракционной модели** величину $\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S}$ сопоставляют с энергией ΔG_{trans} переноса молекулы или ее части из воды в органический растворитель, поскольку центр связывания АЦ гидрофобен и похож на неполярный растворитель. Основной вклад в ΔG_{trans} вносит энергия разрушения сольватной оболочки, поэтому величина ΔG_{trans} практически не зависит от природы органического растворителя

$$\Delta G_{\text{trans}} = -0.75 \text{ ккал/моль для алифатических углеводородов на одну } CH_2$$

Аддитивность сохраняется до цепи 12-14 атомов углерода (цепи с большей длиной начинают сворачиваться в клубок и образовывать совершенно другую структуру с новыми свойствами, поэтому аддитивность величины ΔG_{trans} и утрачивается). В случае ароматики:

$$\Delta G_{\text{trans}} = -2 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}} \text{ на один фенил}$$

Если взять толуол, то энергетический выигрыш будет -2.75 ккал/моль при переносе из воды в органическую среду. Аддитивность сохраняется практически для любой химической структуры. Ганш сам провел множество энергий переноса и получил и обработал огромный объем экспериментальных данных, и ввел т.н. **параметр Ганша π (инкремент гидрофобности)**, которая обределяет энергию переноса части молекулы из воды в органику):

$$\pi = \lg P_X - \lg P_H$$

где P_X и P_H – коэффициент распределения вещества, содержащего и не содержащего рассматриваемый инкремент соответственно, в системе вода-октанол. Далее остается рассчитать параметр Ганша для наиболее широко встречающихся заместителей (Таблица 3.2.).

Таблица 3.2. Значения параметра Ганша для некоторых заместителей.

Заместитель	Параметр Ганша π
CH ₂	0.5
C ₂ H ₅	1
C ₃ H ₇	1.5
CH(CH ₃) ₂	1.3
Разветвление в цепи	-0.2
C ₆ H ₅	2.13

C ₆ H ₅ CH ₂	2.63
CH ₂ OH	-0.75
CONH ₂	-1.71
-NH-CO-CH ₃ (пептидная связь)	-1.21
Двойная связь	-0.3
Положительный заряд	-5.7

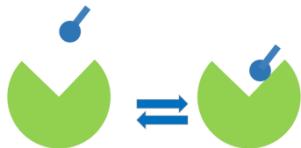


Рисунок 3.4.
Экстракционная модель.

Обратим внимание на то, что разветвление в цепи тоже имеет свою величину инкремента гидрофобности. Большое отрицательное значение параметра Ганша для положительного заряда свидетельствует о том, что ему совсем выгодно находиться в неполярной среде. В рамках экстракционной модели

$$\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S} \approx \Delta G_{\text{trans}}.$$

Можно учесть и то, что *на самом деле при образовании фермент-субстратного комплекса происходят конформационные изменения, которые способствуют многоточечному взаимодействию между ферментом и субстратом*. Именно этот случай рассматривает **экстракционно-конформационная модель**. И тогда величина $\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S}$ учитывает изменение состояния гидрофобной полости; она будет коррелировать с гидрофобностью фрагментов молекулы:

$$\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S} = \chi \Delta G_{\text{trans}},$$

где коэффициент χ позволяет характеризовать степень конформационных изменений фермента при связывании субстрата.

Оценим величину связывания боковой цепи фенилаланина химотрипсином. Параметр Ганша для боковой цепи фенилаланина равен 2.63, энергия переноса одной CH₂ группы из водной в органическую фазу равен -0.75 ккал/моль, а параметр Ганша для CH₂ группы равен -0.5. Перейдем от величины параметра Ганша к единицам энергии (в ккал/моль) переноса боковой цепи фенилаланина, для этого введем нормировочный множитель, равный (0.75/0.5):

$$\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S} = 2.63 * (0.75/0.5) = -4 \text{ ккал/моль}$$

Таким образом, при связывании полипептидной цепи с химотрипсином только за счет гидрофобных взаимодействий наблюдается выигрыш в 4 ккал/моль, который оказывается сопоставим с минимально возможными энтропийными потерями.

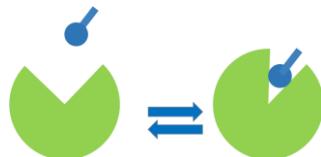


Рисунок 3.5. Экстракционно-конформационная модель.

Лекция 4. Сериновые гидролазы. Ацетилхолинэстераза.

Ацетилхолинэстреаза: общие сведения. У каждой сериновой гидролазы есть свои особенности. Сегодня поговорим о ферменте, участвующем в передаче нервного импульса – **ацетилхолинэстеразе**. **Нейромедиатор** – ацетилхолин – выбрасывается в синаптическую щель, связывается на постсинаптической мембране другой клетки с рецептором ацетилхолина, и таким образом происходит передача нервного импульса. Это может происходить в скелетных мышцах, сокращение. Передача импульса дискретна, и нужно закрыть передачу – убрать ацетилхолин из синапса и подготовить клетку к передаче следующего импульса. В этом участвует ацетилхолинэстераза

В 1914 году Генри Дэйл (Henry Dale) предположил, что *фермент, который гидролизует эфиры холина (ацетилхолинэстераза) играет важную роль в передаче нервного импульса от нервных клеток человека к скелетным мышцам*. Ацетилхолинэстреаза локализуется в синаптической щели холинергических синапсов (например, в нервно-мышечных соединениях клеток позвоночных, между нейронами позвоночных, между нейронами и электроцитами (скат *Torpedo californica*) и др.) **Общая схема передачи нервного импульса** следующая:

1. Синтез ацетил-КоА в митохондриях
2. Холинацетилтрансфераза катализирует образование ацетилхолина из холина и ацетил-КоА
3. Ацетилхолин упаковывается в синаптические пузырьки
4. Ацетилхолин выходит в синапс
5. Ацетилхолин связывается с его рецептором на постсинаптической мемbrane
6. Ацетилхолинэстераза разрывает ацетилхолин на холин и ацетат, останавливая передачу сигнала
7. Пресинаптическая клетка забирает обратно холин, и ацетат диффундирует из синапса наружу.

Существуют разные нейротрансмиттеры, большинство из них – высококонсервативны, есть также быстродействующие, из которых лишь один тип синтезируется индивидуальными нейронами (к их числу относится ацетилхолин). В момент передачи импульса внутрь мышечной или нервной клетки также поступают ионы Na^+ и Ca^{2+} .

Типы холинэстераз:

1. **Ацетилхолинэстераза.** Локализована в синапсах. Субстратная селективность – ацетилхолин.
2. **Плазматическая холинэстераза.** Локализована в плазме (не нейрональные). Субстратная селективность – ацетилхолин, сукцинилхолин, локальные анестетики (прокайн).

Ацетилхолинэстераза (AChE, EC 3.1.1.7) и **бутирилхолинэстераза** (BuChE, EC 3.1.1.8) – наиболее изученные представители эстераз. Катализируют реакцию гидролиза ацетилхолина и бутирилхолина, соответственно (Схема 4.1.).

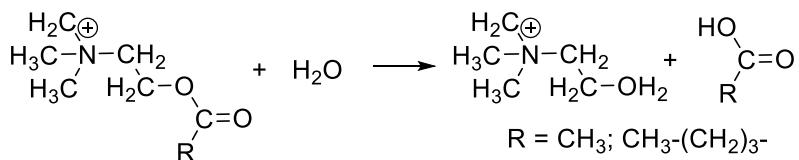


Схема 4.1. Гидролиз ацетилхолина.

Ацетилхолинэстераза – один из самых быстрых ферментов (с очень высокими значениями констант $k_{\text{cat}}/K_M = 1.6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 1.4 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$, $K_M = 9 \cdot 10^5 \text{ M}$). Фермент подчиняется кинетике Бриггса-Холдейна (т.е. $K_M = K_s + k_2/k_1$, где K_s – константа связывания, k_1 k_2 – константы элементарных стадий)

Бутирилхолинэстераза находится в плазме крови. Оба фермента AChE и BuChE в гемопоэтических клетках (клеточная дифференцировка). BuChE – в основном встречается в развивающейся нервной системе, а AChE возникает на более поздних стадиях развития.

Молекулярные формы ацетилхолинэстеразы. На самом деле ацетилхолинэстераза встречается в клетке в разных формах: в виде мономера и в виде олигомерных структур. Существуют три типа С-концевых последовательностей AChE (обозначаются как R, H и T):

- AChER – мономер;
- AChER – димер, содержащий короткий С-конец и прикрепляется к гликолипидам внешних мембран эритроцитов; COO-группа концевого остатка цистеина взаимодействует через этаноламин с гликолипидом – фосфатидилинозитом. Две субединицы связаны дисульфидным мостиком, образованным С-концевыми цистеинами двух субединиц;
- AChEt – тетramer, который образуется за счет длинного (около 40 аминокислотных остатков) С-конца, где цистеин находится за 4 аминокислоты до конца. Образующийся тетramer прикрепляется через дисульфидные мостики к структурным белкам: коллагеновой субединице и гидрофобному белку P.

Коллаген-содержащая форма AChE (3 тетраметра AChEt и коллагеновая субединица) встречаются в синапсах между нервными и мышечными клетками. Белок P (около 20 кДа) содержит ковалентно связанные жирные кислоты. Тетрамер AChEt закрепляется на внешней мемbrane клеток. Содержание AChEt (тетрамер с белком P) увеличивается в процессе развития организма, и в результате у взрослых доминирует именно эта форма. BuChE встречается в виде коллаген-содержащей формы и в виде свободных мономера, димера и тетрамера.

Кинетика реакций с участием ацетилхолинэстеразы. Классическая схема Михаэлиса-Ментен (в том числе привычный нам случай, когда константой k_2 можно пренебречь) (Схема 4.2).

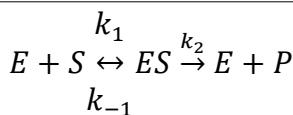


Схема 4.2.

Бриггс и Холдейн вывели уравнение для зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, и записали выражение константы Михаэлиса в виде соотношения констант скоростей отдельных стадий реакции.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

Для ацетилхолинэстеразы $k_2 \gg k_{-1}$, (почти каждый фермент-субстратный комплекс переходит в продукт). В результате окажется, что $k_{\text{cat}}/K_M = k_1$, т.е. константа связывания фермента и субстрата определяют скорость всего процесса.

Первичная структура холинэстераз и сериновых протеаз млекопитающих негомологична. Консервативны только четыре аминокислотных остатка, окружающих Ser-203 в активном центре.

Мономер AChE человека – 539 остатков, около 59 кДа

Мономер BuChE человека – 529 остатков, около 60 кДа.

Первичные структуры ацетилхолинэстераз млекопитающих и электрического ската *T.californicum* имеют более 60% идентичности в аминокислотной последовательности.

AChE и BuChE из одинаковых источников идентичны между собой на 50-52% .

AChE млекопитающих содержит семь остатков цистеина. Из них шесть – консервативные, формируют внутрисубъединичные дисульфидные связи. Седьмой остаток располагается около С-конца и участвует в связывании субъединиц AChE и структурных белков.

Фосфорорганические ингибиторы, *действующие на серин* в активном центре – это и пестициды, и военные газы (Рисунок 4.1).

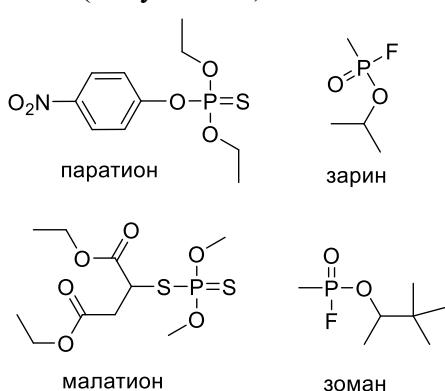


Рисунок 4.1. Фосфорорганические ингибиторы, действующие на серин.

Также существуют ингибиторы, *действующие на гистидин* в активном центре (Рисунок 4.2).

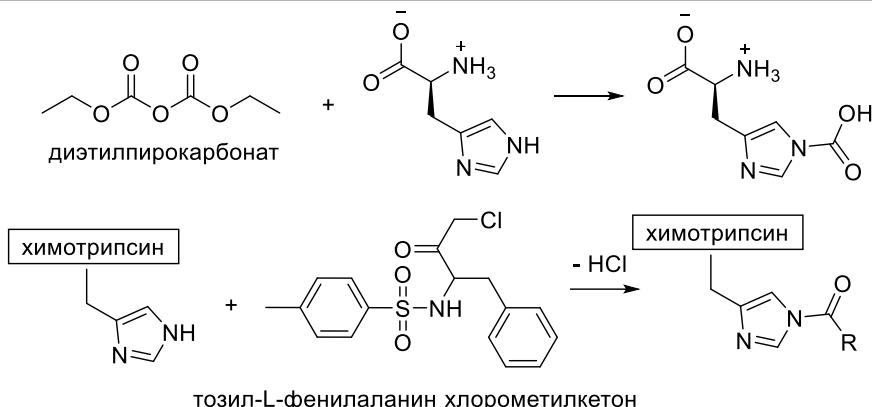


Рисунок 4.2. Фосфорорганические ингибиторы, действующие на гистидин.

Строение активного центра ацетилхолинэстеразы. Каталитический участок ацетилхолинэстеразы (*T.californicum*) включает в себя остатки серин-200, гистидин-440, глутамат-327, и особенность заключается в том, что он находится на дне глубокой щели (18-20 Å от поверхности), поверхность которой богата отрицательно заряженными аминокислотами.

Остатки, входящие в активный центр фермента ацетилхолинэстеразы (человеческая):

- Гидрофобный карман содержит: Тгу-337, Фе-338, Трг-86. Они необходимы для связывания фрагмента $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$ - ацетилхолина.
 - Каталитическая триада состоит из остатков Сер-203, Гис-447, Глу-334.
 - Взаимодействие с ацильной частью ацетилхолина осуществляется благодаря остаткам Фе-295, Фе-297. Если провести замену Phe295Ala, то происходит снятие стерических затруднений и фермент становится способным гидролизовать и BuCh (происходит увеличение $k_{\text{cat}}/\text{Км}$ в 130 раз).
 - Ацетилхолинэстреаза так же, как и трипсин и химотрипсин, содержит оксоанионную дырку, которая в данном случае образована остатками Гли-121 и Гли-122, которые стабилизируют переходное состояние.
 - Некоторое количество аминокислотных остатков участвует в образовании системы водородных связей: Тгу-133, Глу-202, Гли-448, Глу-450, кроме этого, участвуют две молекулы воды. Эта система позволяет переносить воду из активного центра и обратно.
 - Интересной особенностью активного центра ацетилхолинэстеразы является наличие анионного центра, образованного Трг-86. Именно этот остаток оказывает основное влияние на связывание положительного заряда в ацетилхолине (за счет пи-электронов в индольном кольце триптофана).

Активный центр АChE находится на дне глубокой щели. Внутреннюю полость в этой щели называют **горлом** (gorge), а вход в это горло, находящийся на поверхности, в англоязычной литературе называют *mouth* (рот). Активный центр ацетилхолинэстеразы состоит из нескольких подцентров:

1. Каталитического центра, ответственного за гидролиз эфирной связи
2. Периферического анионного центра (включает горло, которое состоит из из ароматических и отрицательно заряженных аминокислотных остатков – Asp-74, Тгу-72, Trp-286, и рот, содержащий семь отрицательно заряженных аминокислотных остатка).
3. Гидрофобного кармана, который связывает алкильные фрагменты уходящей группы $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$
4. Кармана для связывания ацильной части субстрата
5. Анионного центра, стабилизирующего положительный заряд на атоме азоте в $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ - группе ацетилхолина.

Сравним активные центры химотрипсина/трипсина/эластазы (Таблица 4.1.) и ацтилхолинэстераз (Таблица 4.2.)

Таблица 4.1. Каталитические остатки некоторых сериновых протеаз.

Роль остатков	Химотрипсин/трипсин/эластаза
Кatalитическая триада	Ser-195, His-57, Asp-102
Оксоанионная дырка	Ser-195 и Gly-193(химотрипсин) Asp-155 (субтилизин)
Связывание N-ацильной группы и ориентация субстрата	Ser-214
Удерживание гидрофобного кармана	Asp-194 и Ile-16
Вход в гидрофобный карман	Gly-216 и Gly-226 (у химотрипсина и трипсина) Val-216 и Thr-216 (у эластазы)
Субстратная специфичность (АК на дне кармана)	Ser-189 (химотрипсин) Asp-189 (трипсин)
Крышка гидрофобного кармана	Met-192

Таблица 4.2. Каталитические остатки ацтил- и бутирилхолинэстеразы.

Роль остатков	AChE		BuChE
	Человек	Скат <i>T.californicum</i>	
Кatalитическая триада	Ser-203, His-447,	Ser-200, His-440,	Ser-198, His-423,

	Glu-334	Glu-327	Glu-325
Вход в горло	Tyr-72, Trp-286	Tyr-70, Trp-279	Ala-277, Asp-68
Периферический анионный центр (PAS)	Asp-74, Tyr-337	Asp-72, Tyr-334	Asp-70, Tyr-332
Взаимодействие с ацильным фрагментом субстрата	Phe-295, Phe-297	Phe-288, Phe-290	Leu-246, Val-288
Анионный центр (AS)	Trp-86 ¹	Trp-84	Trp-82
Гидрофобный карман	Trp-86, Tyr-337, Phe-338	Trp-84 Phe-330	
Оксоанионная дырка (OAH)	Gly-121, Gly-122	Gly-118, Gly-114 Ala-201	Ala-199 (пока не до конца ясно)

Механизм катализа ацетилхолинэстеразой. Ацетилхолин приходит в активный центр так, что при этом положительный заряд на атоме азота субстрата стабилизируется пи-электронами индольного кольца Трп-86. Активированный гистидином атом кислорода серина атакует карбонильный атом углерода ацетилхолина с разрывом сложноэфирной связи. Отрицательный заряд на гидрокильной группе компенсируется протоном с гистидина и холин – первый продукт покидает активный центр, и кроме этого образуется ацилфермент, с ацилом на серине (Схема 4.3).

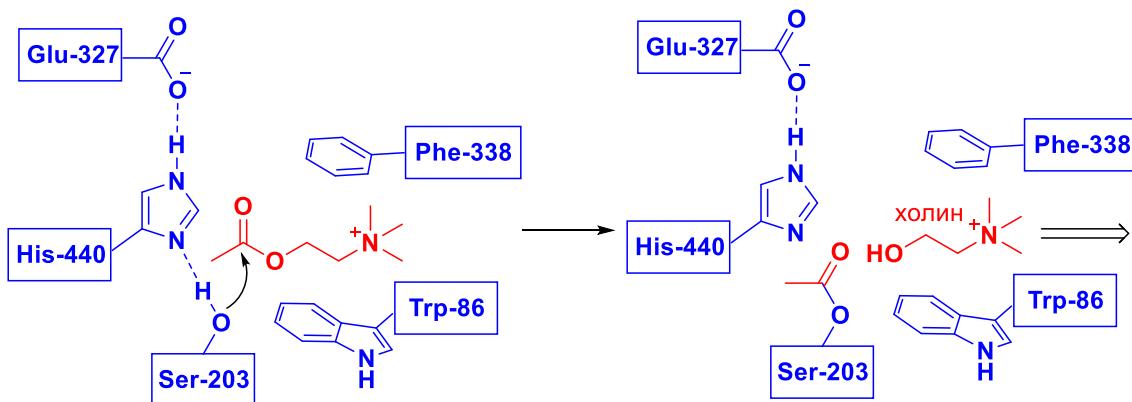


Схема 4.3. Гидролиз ацетилхолина и образование ацилфермента.

Далее следует стадия деацилирования, где в качестве нуклеофила выступает молекула воды (Схема 4.4). Вода диссоциирует в активном центре, при чем протон оттягивает на себя гистидин. Гидроксид-ион атакует ацилсерин с высвобождением серина и уксусной кислоты.

¹ Замена Трп86Ала приводит к снижению активности в 3000 раз

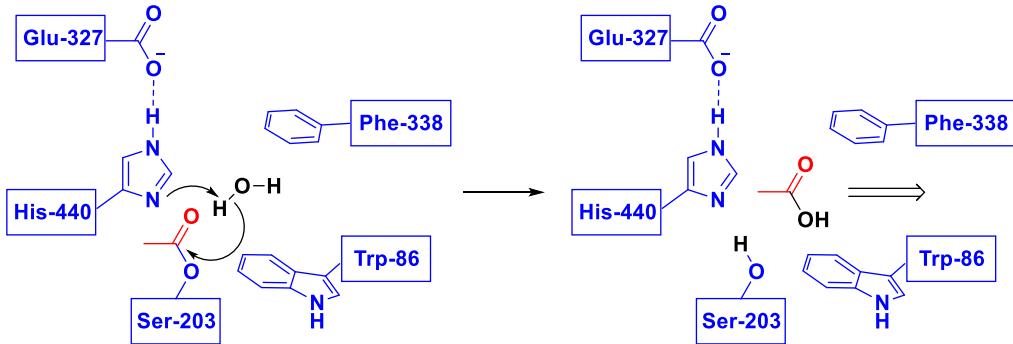


Схема 4.4. Гидролиз ацилфермента.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Теперь еще раз рассмотрим фосфорорганические соединения, которые являются необратимыми ингибиторами и их антидоты – вещества, способные вытеснить ингибиторы из активного центра фермента. Антидотов существует много, например, пралидоксимхлорид, являющийся антидотом при отравлении пестицидами и нервными газами (Схема 4.5). *Наибольшая эффективность достигается в случае, если антидот принят в течение нескольких часов после отравления* (или даже еще быстрей, поскольку ацетилхолинэстераза ингибируется почти мгновенно).

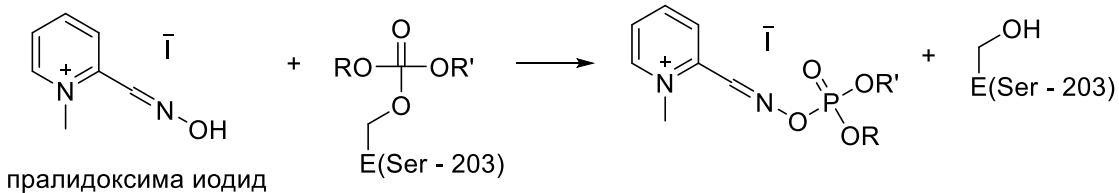


Схема 4.5. Действие антидота (пралидоксимхлорида) на ингибиованный фермент.

Здесь приведена схема регенерации ацетилхолинэстеразы (Схема 4.6)

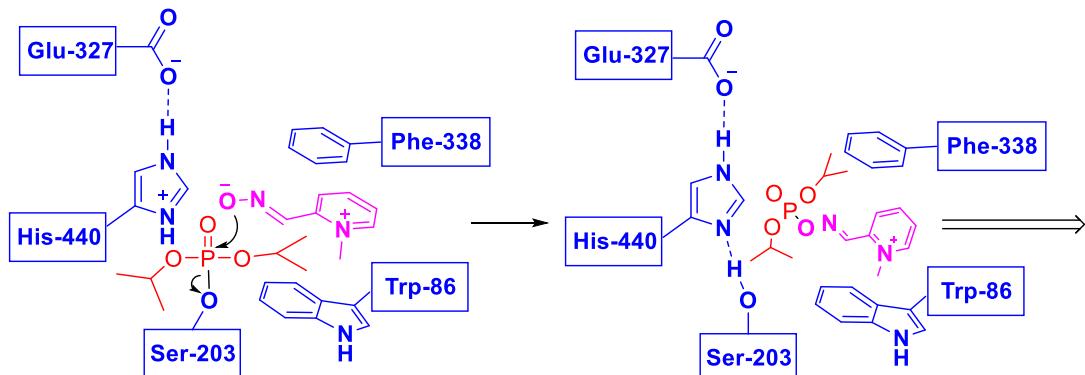


Схема 4.6. Регенерация активного центра ацетилхолинэстеразы пралидоксимхлоридом.

Довольно часто эти ингибиторы приводят к параличу и проч. Но иногда они оказываются важны как медицинские препараты. Например, такрин – обратимый конкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы (Рисунок 4.3). Он располагается в активном центре фермента таким образом, что ароматические кольца двух гидрофобных остатков фермента Phe-330 и Trp-84 располагаются параллельно плоскости

акридинового кольца такрина, за счет чего происходит ингибирование фермента. Физостигмин (Рисунок 4.3) активно используется в терапии болезни Альцгеймера, для поддержания конгитивной функции (когда у человека плохо проходит нервный импульс, ингибитор позволяет увеличить длительность нервного сигнала, благодаря чему состояние пациента значительно улучшается).

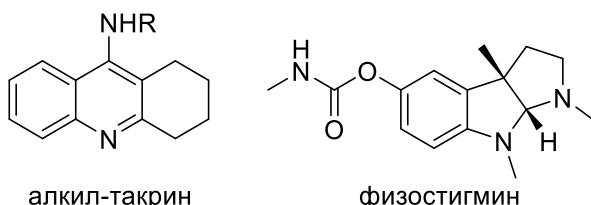


Рисунок 4.3. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы, используемые при расстройствах нервной системы.

Другой ингибитор, пиридостгмина бромид, используется в терапии аутоиммунного заболевания *Myastenia gravis* (мышечная слабость). Многие другие ингибиторы ацетилхолинэстеразы играют существенную роль в лекарственной терапии (Рисунок 4.4).

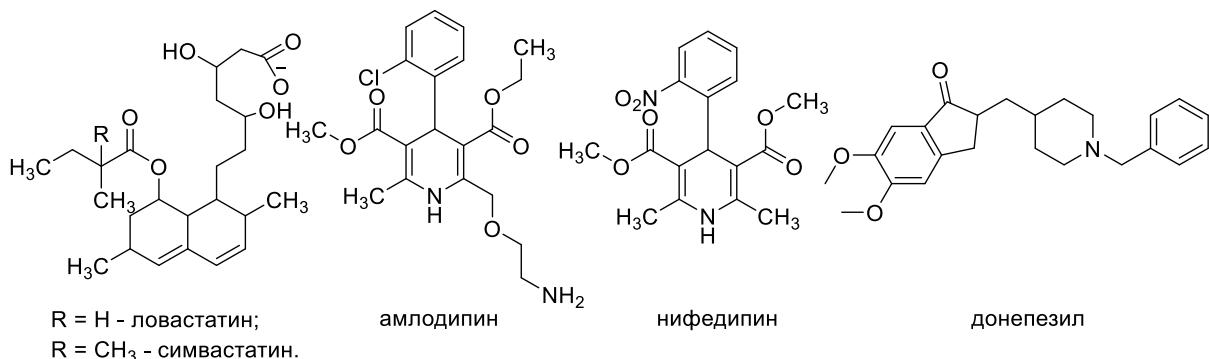


Рисунок 4.4. Другие ингибиторы ацетилхолинэстеразы – лекарственные препараты.

Здесь приведена Таблица 4.3, которая показывает, что некоторые ингибиторы имеют очень хорошие значения констант ингибирования.

Таблица 4.3. Свойства некоторых ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

Ингибитор (лекарственный препарат)	Молекулярная масса	K _I (AChE)	K _I (BChE)
Ловастатин	404.5	2.7±0.4	1.1±0.2
Симвастатин	418.6	1.8±0.3	0.75±0.08
Амлодипина безилат	567.1	0.19±0.04	0.11±0.04
Нифедипин	346.3	4±1	1.2±0.3
Гидralазина гидрохлорид	196.6	7±2	1.9±0.3
Диазепам	284.8	13±2	0.043±0.005
Хлордиазпоксида гидрохлорид	336.2	50±7	0.3±0.04

Так, донепезил располагается в горле фермента так, что он не полностью закрывает горло, а амлодипин практически полностью закрывает вход в активный центр фермента, не позволяя субстрату пройти туда.

Небольшой белок фасцикулин 2 (6.5 кДа), найденный в яде змей рода *Mamba*, ингибирует AChE, связываясь со вспомогательным активным центром. Каталитическая триада при этом сохраняет способность к катализу, но связывание ацетилхолина в активном центре затруднено из-за:

1. Перекрывания фасцикулином 2 входа в «горло»,
2. Изменения конформации Trp-86, который входит в состав петли, участвующей во взаимодействии с фасцикулином 2,
3. Изменения электростатического поля комплекса AChE-фасцикулин.

Ацетилхолинэстераза млекопитающих и ската *T.californicum* чувствительны к пикомолярным концентрациям фасцикулина 2. Укус змей из семейства *Mamba* смертелен!

Пенициллинацилаза: общие сведения. Второй фермент, с которым мы познакомимся сегодня – **пенициллинацилаза** – тоже относится к числу сериновых гидролаз. Флеминг открыл химиотерапевтическую активность пенициллина в 1940 году – антибиотика. Антибиотики нарушают один из метаболических процессов в жизни бактериальной клетки, и пенициллин, в частности, нарушает процесс образования клеточной стенки бактерий. Фактически, происходит нарушение образования поперечных пептидных связей между полисахаридными цепями, образующими клеточную стенку. Фермент, ответственный за образование этих связей (пептидных мостиков) – **трансацилаза**, относится к числу сериновых гидролаз. Связанный пентапептид и связанные пенициллин занимают одну и ту же нишу внутри активного центра трансацилазы. Фактически, *пенициллин является ингибитором трансацилазы*, хотя полипептид и пенициллин – совершенно разный класс соединений.

Общая структура пенициллинов представлена на Рисунке 4.5.

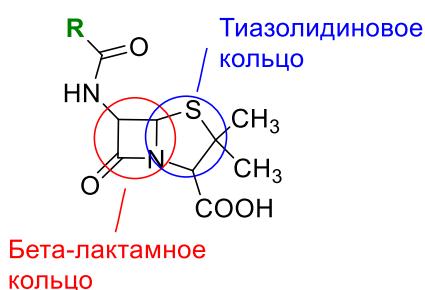


Рисунок 4.5. Строение циклического фрагмента пенициллинов.

У него есть **бета-лактамное** и **тиазолидиновое** кольца, а также амидная связь и вариабельная группа R. Чтобы получить полусинтетический пенициллин, нужна 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) в качестве полупродукта. Ее получают из бензилпенициллина, и для этого надо разорвать амидную связь C–N, не затронув при

этом более реакционноспособную связь C–N в бета-лактамном кольце. Это позволяет сделать фермент **пенициллинацилаза** (Схема 4.7).

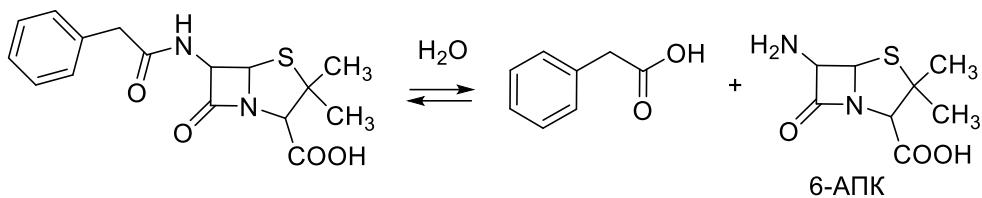


Схема 4.7 Образование 6-аминопенициллановой кислоты.

6-АПК используется затем в синтезе пенициллиновых антибиотиков (Схема 4.8)

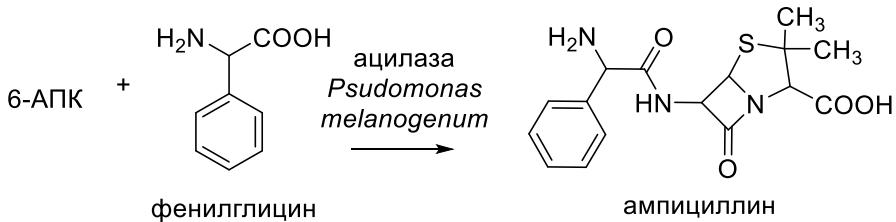


Схема 4.8. Получение синтетических пенициллинов.

Фермент пенициллинацилаза (EC 3.5.1.11, класс гидролазы, подкласс амидогидролазы) используется в производстве 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA) и 7-аминодеацетоксицеплазпориновой кислоты (7-ACA), которые являются ключевыми компонентами в производстве бета-лактамных антибиотиков. Это один из немногих ферментов, которые широко применяются в промышленности.

Впервые выделен из *Penicillium chrysogenum* и описан в 1950 году Сакагучи и Мурао (Sakaguchi, Murao). В 1960 году получил название пенициллинацилаза, поскольку тогда было установлено, что он гидролизует N-ацильные группы в N-ацил-L-аминокислотах (т.е. субстратная специфичность данного фермента довольно широка).

Существует несколько типов ацилаз:

1. Тип I (грибные ацилазы). Расщепляют феноксиметилпенициллин (пенициллин V). Оптимальные значения: pH = 10, температура T = 50°C. Вырабатывается у *Penicillium sp.*, *P. chrysogenum*, *Aspergillus ochraceus*, и др.
2. Тип II (бактериальные ацилазы). Расщепляют бензилпенициллин (пенициллин G). Оптимальные значения: pH = 8, температура T = 40°C. Вырабатывается у *Aerobacter*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, и др.

Структура пенициллинацилазы и пенициллинов. Периплазматический фермент, относится к семейству N-терминальных нуклеофильных гидролаз (Ntn). В структуре фермента присутствует 4 слоя $\alpha+\beta$ структур, состоящих из двух антипараллельных β -слоев и двух α -спиралей. Молекулярная масса фермента составляет 86.268 кДа, изоэлектрическая точка (pI) 6.07.

Пенициллинацилаза, о которой мы говорим, это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: α , содержащей 209 аминокислотных остатков, и β , содержащей 557 остатков. Считается, что обе цепи, образующие субъединицы, тесно переплетены и

формируют пирамидуальную структуру с глубокой чашеобразной выемкой в центре, на дне которой расположен активный центр. Синтез данного фермента происходит в цитоплазме клетки, в виде предшественника – одной полипептидной цепочки, содержащей как бы четыре последовательности:

1. Сигнальная последовательность, содержит 26 остатков, отвечает за транспорт из цитоплазмы в периплазму;
2. Последовательность, кодирующая непосредственно α -субъединицу (a1-a209);
3. Спейсерный участок, 54 остатка, отвечает за правильное сворачивание;
4. Последовательность, кодирующая β -субъединицу (b1-b557).

Зрелый фермент получается после отщепления сигнальной последовательности и спейсерного участка. Это происходит автокаталитически.

Ключевой аминокислотный остаток в активном центре пенициллинацилазы – серин (как и в химотрипсине). Однако, ингибиция пенициллинацилазы имеет одну особенность. Обычно, чтобы заингибировать фермент, требуется избыток ингибитора, но в случае пенициллинацилазы не требуется этот избыток, и ингибиторы (например, фенилметилсульфонилфторид или тозилфторид) дают *возможность оттитровать число активных центров фермента*.

Молекулы пенициллинов достаточно большие, и в них выделяют следующие фрагменты (Рисунок 4.6.): ацильная часть R ($R_1=H, OH; R_2=H, NH_2, OH, CH_3$) и амидная часть R_3 (ядра пенициллина и цефалоспорина, а также амино-, спиртовые группы и аминокислоты (Phe)).

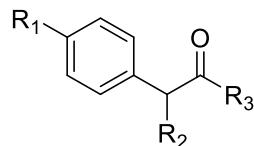


Рисунок 4.6. Основные фрагменты пенициллинов.

Пенициллинацилаза способна катализировать гидролиз ряда амидов с подобной структурой (Рисунок 4.7.).

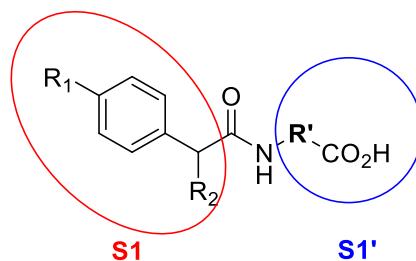


Рисунок 4.7. Фрагменты пенициллина, взаимодействующие с разными подцентрами пенициллинацилазы.

Субстратная специфичность определяется строением ацильной части, которая должна быть гидрофобной для продуктивного связывания (подцентр S1). Амидная часть

влияет гораздо меньше. Ядра R' β-лактамных антибиотиков имеют строение (1 – 6-аминопенициллановая кислота, 2 – 7-аминодезацетоксицефалоспорановая кислота):

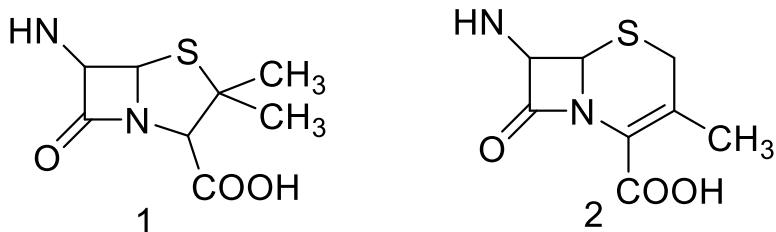


Рисунок 4.8. Ядра β-лактамных антибиотиков.

Теперь поговорим подробнее об активном центре пеницилланацелазы. *Вместо триады, содержащей гистидин и серин, в качестве кислотно-основного катализатора выступает только OH-группа и собственная аминогруппа серина.* Оксоанионная дырка, стабилизирующая переходное состояние, образована остатками bAsn241 (амидная группа) и bAla69 (-NH- остава). Важно, что замена Asn241Ala приводит к снижению активности фермента на несколько порядков! Связывание ацильной части субстрата происходит за счет остатков bPhe24, bPhe57 (на другой стороне на дне кармана), а-Phe146 (также, экранирует активный центр от растворителя), bIle177, aMet142. Связывание амидной части субстрата (подцентр S1', бета-лактамное кольцо и карбоксильная группа) происходит с помощью остатков aArg145, aPhe71, bArg263 (важен для процессинга, замена bArg263Leu приводит к тому, что фермент накапливается в виде предшественника и не сворачивается).

Механизм катализа пенициллинацелазой. В целом, он похож на механизм катализа другими сериновыми гидролазами (химотрипсин), но одна из главных особенностей – в качестве кислотно-основного катализатора выступает не триада серин-гистидин-аспарагин, а только серин. Стадии механизма следующие. Фермент и субстрат образуют нековалентный фермент-субстратный комплекс, далее происходит активация OH-группы βSer1 с помощью его же собственной аминогруппы. Атом кислорода этого остатка серина атакует карбонильный атом углерода субстрата, и происходит передача протона с OH-группы серина на собственную аминогруппу. Переходное состояние (тетраэдрическое) предположительно стабилизируется за счет водородных связей с аминогруппой остатка βAsn241 и NH-группой остава полипептидной цепи, принадлежащей остатку βAla69 (оксоанионная дырка). Далее, протон, акцептированный аминогруппой серина, передается на уходящую группу. Образуется первый продукт реакции (6-АПК в случае пенициллина G). Атом углерода субстрата, находящийся в тетраэдрической конфигурации, вновь возвращает себе статус карбонильного и происходит завершение стадии ацилирования (Схема 4.9).

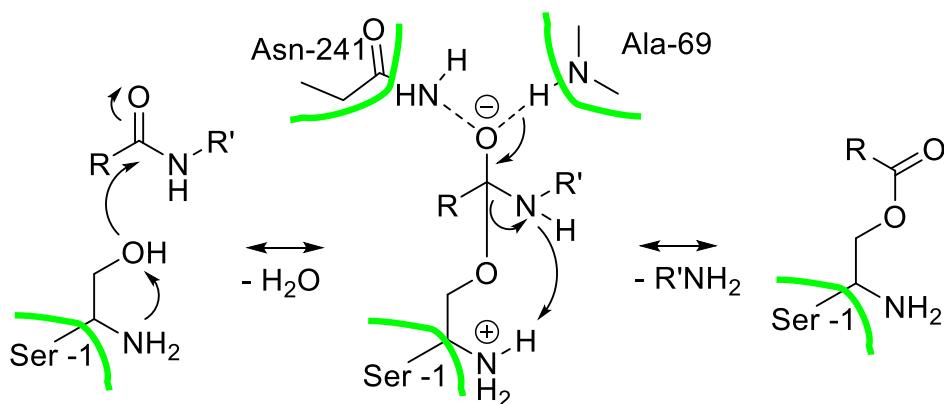


Схема 4.9. Первый этап катализической реакции пенициллиназы – образование ацилфермента.

Деацетилирование протекает по стандартному механизму с образованием второго тетраэдрического интермедиата и последующего образования второго продукта реакции – фенилуксусной кислоты в случае пенициллина G (Схема 4.10).

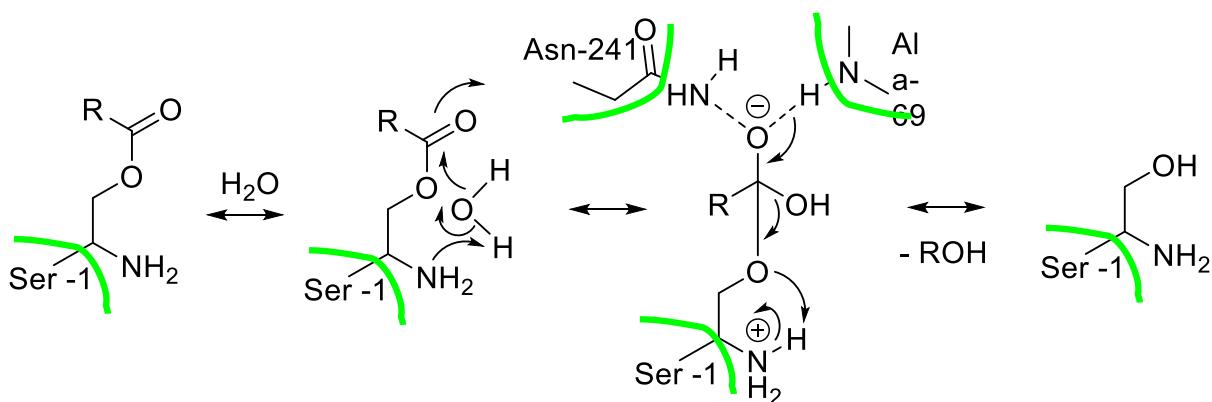


Схема 4.10. Деацетилирование фермента.

Добавим, что структурные и кинетические данные подтверждают, что в стабилизации переходного состояния принимает участие β Arg-263, положительный заряд которого увеличивает полярность оксоанионной дырки и необходим для катализа. Отметим также, что этот же остаток консервативен в пенициллинацилазах почти из всех известных источников (*E.coli*, *K.citrophila*, *A.faecalis*, *P.rettger*, *A.viscosus*, *B.megaterium*).

Следует отметить, что ранее был предложен альтернативный механизм катализа пенициллинацилазой, где вместо собственной аминогруппы серина участвует молекула воды, однако в настоящее время этот механизм отвергнут.

Лекция 5. Типы связывания фермента и субстрата.

Взаимодействия в фермент-субстратном комплексе. Какие взаимодействия возникают при образовании фермент-субстратного комплекса? Это гидрофобные, электростатические взаимодействия, водородные и ковалентные связи. *Вклад гидрофобных взаимодействий в энергию образования фермент-субстратного комплекса был уже оценен нами в конце Лекции 3.* Как можно оценить энергию электростатических взаимодействий в фермент-субстратном комплексе? Для этого нужно воспользоваться законом Кулона. Оценка величины кулоновского взаимодействия двух зарядов, расположенных в водной среде на расстоянии 10 \AA друг от друга, $\Delta G = -0.5$ ккал/моль. В активном центре фермента диэлектрическая проницаемость гораздо меньше (примерно в 10 раз), чем в воде, и соответственно, электростатические взаимодействия будут характеризоваться величиной $\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S} = -5$ ккал/моль.

Что касается энергии водородной связи внутри фермент-субстратного комплекса, она составляет примерно $\Delta G_{\text{внутр}}^{E-S} = 4 \div 8$ ккал/моль. Т.е. водородная связь может являться существенным фактором, вносящим значительный вклад в энергетический выигрыш при образовании фермент-субстратного комплекса. Внутри активного центра фермента есть много потенциальных центров для образования водородных связей (атомы кислорода, азота), и поэтому зачастую при образовании фермент-субстратного комплекса возникает более одной водородной связи; за счет этого энергетический выигрыш возрастает.

Наконец, рассмотрим ковалентные связи. Они достаточно редко образуются при формировании фермент-субстратного комплекса, но тем не менее, в случаях, когда это все-таки происходит, они имеют существенное значение. Средняя величина энергии ковалентной связи C–C составляет от -20 до -30 ккал/моль.

Таким образом, сила взаимодействия поверхности белка с субстратом вполне может скомпенсировать те энтропийные (уменьшение числа частиц в системе, снижение числа степеней свободы движения частиц) и энергетические (конформационные изменения) потери, которые возникают при образовании фермент-субстратного комплекса.

Оценка энергетического выигрыша образования фермент-субстратного комплекса. Общую величину энергетического выигрыша при образовании фермент-субстратного комплекса можно оценить как с помощью рассмотренных величин, так и с помощью константы Михаэлиса. Как правило, величина константы комплексообразования для фермент-субстратных комплексов в случае специфических субстратов составляет $K_{\text{ассоц.}} = 10^2 \div 10^5 \text{ M}^{-1}$. Этому соответствует величина свободной энергии $\Delta G = -3 \div -7$ ккал/моль. Вот это, собственно, и есть тот самый энергетический выигрыш, который достигается при образовании комплекса фермента и субстрата.

На что может быть использован этот энергетический выигрыш? Совершенно необязательно он будет использован для снижения энергии активации химической реакции, которую фермент должен потенциально катализировать. Давайте посмотрим, что нужно, чтобы этот выигрыш все-таки был использован именно для ускорения реакции. Для этого надо сравнить два пути реакции: путь через образование фермент-субстратного комплекса и путь без его образования (Рисунок 5.1).

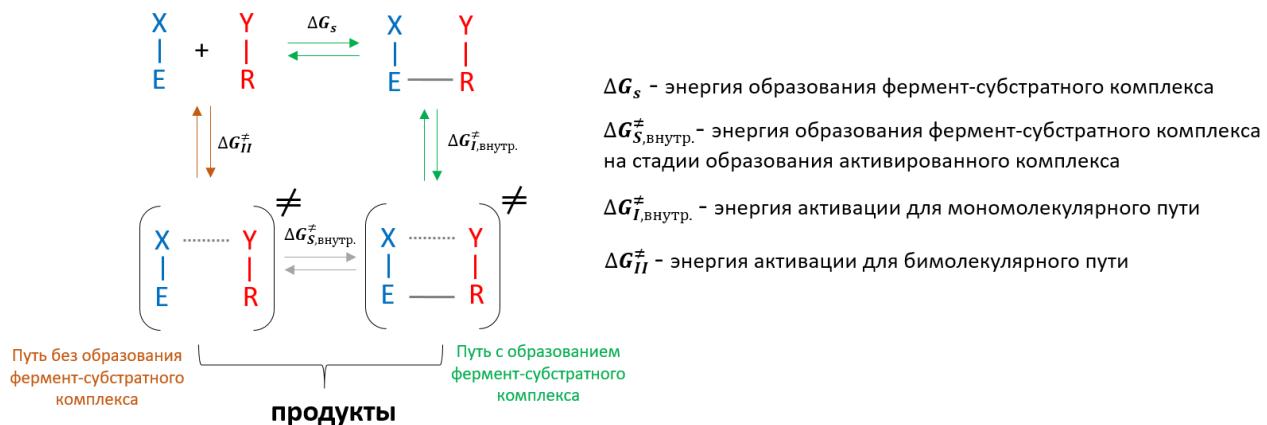


Рисунок 5.1. Пути ферментативной реакции.

С точки зрения свободной энергии получаем следующую энергетическую диаграмму для рассматриваемой схемы (Рисунок 5.2):

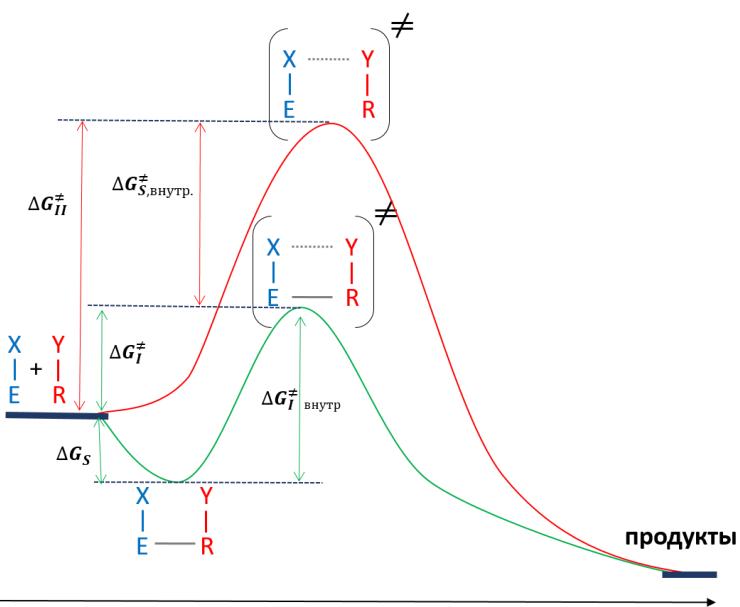


Рисунок 5.2. Энергетические профили ферментативной реакции. Зеленым цветом обозначен путь, протекающий с образованием фермент-субстратного комплекса, а красным – без образования.

Общая величина энергии Гиббса процесса не зависит от пути перехода от начального к конечному состоянию. Значит, в соответствии со схемой реакции, можно записать, что:

$$\Delta G_S + \Delta G_{I,\text{внутр}}^{\neq} = \Delta G_{II}^{\neq} + \Delta G_{S,\text{внутр}}^{\neq}$$

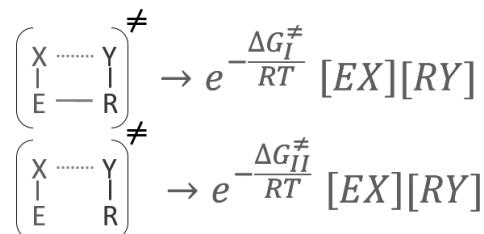
Получается, что разница в энергиях активации ферментативной и неферментативной реакций имеет вид:

$$\Delta G_{II}^{\neq} - \Delta G_I^{\neq} = \Delta G_{II}^{\neq} - (\Delta G_S + \Delta G_{I,\text{внутр}}^{\neq}) = -\Delta G_{S,\text{внутр}}^{\neq}$$

Теперь, чтобы наконец, понять, есть ли у нас выигрыш в энергии активации ферментативной реакции, нам нужно проанализировать величину $\Delta G_{S,\text{внутр}}^{\neq}$. Согласно теории активированного комплекса, скорости реакции, проходящей по рассматриваемым путям, имеют вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \vartheta_1 = \frac{kT}{h} \left(\begin{array}{c} X \cdots Y \\ | \quad | \\ E - R \end{array} \right)^{\neq} \\ \vartheta_2 = \frac{kT}{h} \left(\begin{array}{c} X \cdots Y \\ | \quad | \\ E \quad R \end{array} \right)^{\neq} \end{array} \right.$$

Соответственно, концентрации переходного состояния можно выразить через соответствующие энергии активации:



Теперь мы можем сравнить скорости двух рассматриваемых реакций. Возможно две ситуации, в зависимости от соотношения концентраций фермента и субстрата:

а) Фермент не насыщен субстратом, т.е. концентрация субстрата мала: $[RY] \ll K_S$. Это – наиболее распространенный на практике случай. Отношение скоростей в этом случае равно:

$$\frac{\vartheta_1}{\vartheta_2} = e^{\frac{-\Delta G_{S,\text{внутр}}^{\neq}}{RT}}$$

Фактически мы получили, что величина $\Delta G_{S,\text{внутр}}^{\neq}$, которая отражает взаимодействие фермента со субстратом, и определяет разницу в скоростях реакций, протекающих с и без промежуточного образования фермент-субстратного комплекса. Получается, что взаимодействие между Е и R (т.е. ферментом и субстратом) оказывается термодинамически выгодным, и значит, оно может привести к ускорению реакции. Ускорение происходит не просто за счет перевода реакции во внутримолекулярный режим, сближения активного центра со субстратом или правильной ориентации

субстрата, но и за счет того, что связывание субстрата в активном центре фермента приводит к стабилизации переходного состояния. Именно это последнее утверждение лежит в основе всех рассуждений об эффективности ферментативного катализа!

Б) Фермент насыщен субстратом, т.е. концентрация субстрата велика $[RY] \gg K_S$. Эта ситуация встречается не очень часто. В этом случае скорость реакции определяется внутримолекулярным превращением комплекса; концентрацию субстрата можно не учитывать, все определяется концентрацией субстрата:

$$\vartheta_1 = e^{\frac{-\Delta G_{I,\text{внутр.}}^\ddagger}{RT}} [EX]$$

Разница в скоростях имеет вид:

$$\frac{\vartheta_1}{\vartheta_2} = \frac{e^{\frac{\Delta G_S - \Delta G_{S,\text{внутр.}}^\ddagger}{RT}}}{[RY]}$$

То есть эффективность катализа определяется разницей свободной энергии образования межмолекулярной и внутримолекулярной связи между ферментом и субстратом (в нашей схеме это связь E–R). Если выгоднее оказывается внутримолекуляное образование этой связи, то возникает выигрыш в скорости для соответствующего пути ферментативной реакции.

Когда формирование внутримолекулярной связи оказывается выгоднее? Тогда, когда конформационные изменения в системе минимальны, т.е. когда фермент и субстрат геометрически подобны. На этом строится одна из первых теорий ферментативного катализа – теория ключа и замка – которая сводится к тому, что специфический субстрат геометрически абсолютно подобен центру связывания активного центра фермента, и при их взаимодействии сразу возникает многоточечное взаимодействие, для обеспечения которого не требуются никакие конформационные изменения в системе. Если субстрат не подобен геометрически активному центру, то требуются дополнительные конформационные изменения, разница $\Delta G_S - \Delta G_{S,\text{внутр.}}^\ddagger$ уменьшается, и энергия, которая может быть использована для стабилизации переходного состояния и дальнейшего протекания химической реакции, тоже снижается; соответственно, каталитический эффект ослабляется.

На первый взгляд, эта теория очень логична, но существует проблема – эта теория способна объяснить только различие энергий связывания субстратов с разной структурой. Да, константы Михаэлиса для разных субстратов разные, но ведь и каталитические константы тоже различаются, соответственно, эффективность катализа в результате тоже отличается для разных субстратов! Теоретически, если бы работала теория «ключ-замок», то константы Михаэлиса для химически подобных, но структурно разных субстратов были бы разными, а каталитические константы были бы одинаковы. Эффективность катализа определялась бы тонкой разницей в структуре субстратов. Но на самом деле это не так. Например, фермент гексокиназа, катализирующий перенос фосфатной группы на самые разные нуклеофилы – и на

специфический субстрат – OH группу глюкозы, и на молекулу воды. Но реакция с молекулой воды идет в 5 млн раз медленнее, чем с молекулой глюкозы, хоть вода и является более сильным нуклеофилом, чем глюкоза. Вода присутствует внутри гидрофобного активного центра фермента в достаточном количестве, т.е. нет проблемы с доступом воды к активному центру фермента, но скорость все равно очень мала, чего теория ключа и замка оказывается неспособной объяснить. На самом деле это объясняется эффектом микросреды в активном центре, т.е. физико-химические характеристики воды в активном центре совсем другие, и, соответственно, нуклеофильность воды тоже значительно снижается; в то же время нуклеофильность гидроксильной группы глюкозы внутри активного центра гексокиназы наоборот, увеличивается, и скорость реакции возрастает. Таким образом, теории «ключ-замок» оказывается недостаточно для объяснения этого эффекта.

Типы связывания. Как преодолеть недостатки теории ключа и замка? Для этого предлагается рассматривать разницу в типах связывания между ферментом и субстратом И фермент-субстратным комплексом. Прочности связывания субстрата оказывается недостаточной, чтобы обеспечить эффективность катализа. Различают несколько типов связывания, которые различаются по эффективности в переходном состоянии:

1. Специфическое взаимодействие.

Это такое связывание фермента с субстратом, эффективность которого возрастает при образовании переходного состояния в ферментативной реакции. Наличие этого типа взаимодействий приводит к тому, что энергия активации ферментативной реакции возрастает за счет усиления связывания в переходном состоянии. Например, рассмотрим взаимодействие химотрипсина с разными субстратами. Сравним субстраты, различающихся аминокислотным остатком, который связывается в активном центре химотрипсина, постепенно увеличивая гидрофобность остатка.

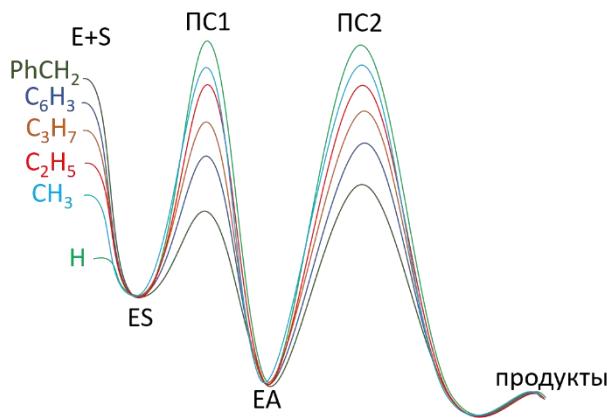


Рисунок 5.3. Влияние природы субстрата на энергетический профиль реакции.

Оказывается, что с увеличением гидрофобности субстрата увеличивается энергия взаимодействия фермента с субстратом при образовании фермент-субстратного комплекса (Рисунок 5.3). Одновременно с этим уменьшается энергия активации

соответствующей ферментативной реакции (примерно на 0.7 ккал на каждую CH_2 группу), что соответствует увеличению скорости в 3-4 раза. При этом энергии промежуточных соединений (фермент-субстратного комплекса и ацилфермента) остаются неизменными. Свободная энергия гидрофобных взаимодействий удваивается при образовании ПС за счет того, что там возникают конформационные изменения в активном центре фермента. И для стадии ацилирования, и деацилирования в случае специфического связывания остатка фенилаланина мы имеем дело со специфическими взаимодействиями, энергия которых равна удвоенной энергии переноса гидрофобного хвоста PhCH_2 из воды в неполярную среду. Таким образом, наблюдаемую схему можно объяснить в рамках экстракционно-конформационной модели (Рисунок 5.4).

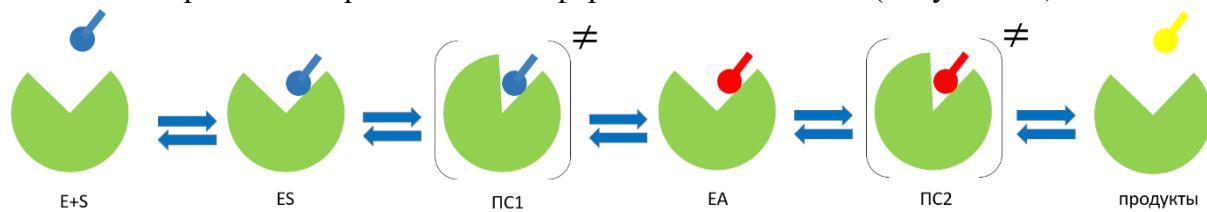


Рисунок 5.4. Экстракционно-конформационная модель реакции химотрипсина.

Значимые конформационные изменения происходят именно в момент образования переходного состояния (ПС)!

Довольно часто при специфическом связывании реализуется принцип: во сколько раз эффективнее связывание, во столько раз возрастает и эффективность катализа. Например, для альфа-химотрипсина зависимость связывания от величины параметра Ганша определяется как:

$$-\lg K_S = \pi - 0.5$$

зависимость константы ацилирования – как

$$-\lg k_1 = 1.1\pi - 0.2$$

И, наконец, зависимость константы деацилирования:

$$-\lg k_2 = 1.1\pi - 0.85$$

Т.е. во сколько раз возрастает гидрофобность субстрата, во столько же раз увеличиваются константы. Аналогичные зависимости наблюдаются и в случае ацетилхолинэстеразы:

$$K_S = 0.9\pi - 0.06$$

$$\lg k_{cat} = 0.8\pi + 3\sigma^* + 1.4$$

σ^* – параметр Гамметта, учитывающий наличие ароматических фрагментов.

В общем случае для осуществления специфических взаимодействий между субстратом и ферментом необходимо, чтобы в предпереходном состоянии ферментативной реакции происходили конформационные изменения активного центра; при этом сами по себе они не могут привести непосредственно к ускорению последующих стадий ферментативного процесса и не играют роли в каталитической специфичности ферментов. То есть при образовании комплекса Михаэлиса практически всегда происходят конформационные изменения (подстраивается как и белок под

субстрат, так и субстрат под белок), но они не связаны с каталитической эффективностью фермента. Важно то, что после того, как образовался комплекс Михаэлиса, в нем происходят дополнительные конформационные изменения, которые в случае специфического связывания это связывание улучшают и позволяют стабилизировать переходное состояние, что и снижает энергию активации и ускоряет реакцию.

2. Продуктивное взаимодействие.

Это взаимодействия, эффективность которых сохраняется в переходном состоянии. Другими словами, в ходе превращения субстрата в активном центре не происходит изменений во взаимодействии между активным центром фермента и не реагирующей частью субстрата, т.е. что было возникло при образовании фермент-субстратного комплекса, то при превращении субстрата и остается. Пример – альфа-химотрипсин как катализатор гидролиза паранитровиниловых эфиров карбоновых кислот. Если мы возьмем две разные кислоты, например, уксусную и фенилуксусную, то различие энергий взаимодействия фермента и субстрата составит 2.1 ккал/моль. Такая же разница будет в связывании в ацилферменте, а энергии активации не изменятся. То есть свободная энергия взаимодействия фермента с ацильной частью субстрата полностью сохраняется в переходном состоянии реакции ацилирования. Такую схему можно объяснить в рамках экстракционной модели, когда образование фермент-субстратного комплекса можно рассматривать как перенос гидрофобной части субстрата из воды в неполярную среду активного центра фермента, при этом конформационных изменений при образовании переходного состояния не происходит (Рисунок 5.5).

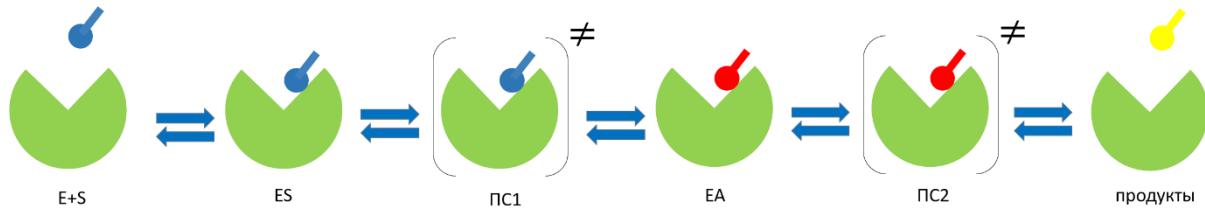


Рисунок 5.5. Экстракционно-конформационная модель реакции гидролиза паранитровиниловых эфиров карбоновых кислот альфа-химотрипсином.

Продуктивное взаимодействие тоже достаточно часто встречается в ферментативном катализе. Основное различие между специфическим и продуктивным взаимодействиями заключается в том, что в первом случае прямо во время химической стадии происходят конформационные изменения фермента, стабилизирующие ПС и улучшающие связывание, а во втором случае они не происходят. Другими словами, при специфическом взаимодействии переходное состояние связывается с ферментом лучше, чем исходный субстрат, а при продуктивном взаимодействии это связывание одинаково.

3. Непродуктивные взаимодействия.

Это взаимодействия в фермент-субстратном комплексе, которые нарушаются при образовании переходного состояния. Это происходит из-за того, что субстрат внутри активного центра занимает геометрически неправильное положение по отношению к каталитически активным группам фермента. Соответственно, придется разорвать

некоторые связи внутри фермент-субстратного комплекса, чтобы субстрат смог правильно ориентироваться в ферменте и вступить в химическую реакцию. Таким образом, непродуктивные взаимодействия есть в фермент-субстратном комплексе, но отсутствуют в переходном состоянии. Это приводит к тому, что *выигрыши в энергии, который возникает за счет образования комплекса, существенно снижается, и в результате реакция с субстратами, которые связываются непродуктивно, протекает существенно медленнее*. Это объясняет принципиально разную ферментативную активность разнообразных ферментов по отношению к субстратам, которые химически абсолютно идентичны, но являются, например, геометрическими или оптическими изомерами, как, например, производные D- и L-аминокислот. Так, химотрипсин катализирует гидролиз пептидной связи, расположенной у L-фенилаланина, с очень высокой эффективностью, но совершенно не активен по отношению к пептидной связи возле D-фенилаланина. D- и L-фенилаланин связываются химотрипсином таким образом, что конформационные изменения связывания L-фенилаланина благоприятствуют гидролизу пептидной связи, а D-фенилаланина – препятствуют.

Другой пример – рассмотрим гидролиз двух похожих субстратов: Ac-Tyr-OMe и Ac-Leu-Tyr-OMe. С точки зрения обычной органической химии, оба этих соединения, по сути, являются просто метиловыми эфирами тирозина, и должны гидролизоваться почти одинаково. Однако при гидролизе альфа-химотрипсином в первом случае в активном центре фермента связывается тирозин, а во втором – лейцин, за счет того, что в лейцине есть сильно гидрофобный хвост, и разница в связывании составляет 3.7 ккал/моль. Получается, что второй субстрат связывается лучше. Однако непосредственно на химической стадии гидролиза, в случае первого субстрата связанный в активном центре тирозиновый остаток находится близко к каталитически активной OH-группе серина фермента, и реакция идет быстро и хорошо, а когда связывается второй субстрат, карбонильный углерод тирозинового остатка оказывается далеко от серина, и энергия активации увеличивается на 1.6 ккал/моль по сравнению с первым субстратом, причем как на стадии ацилирования, так и на стадии деацилирования эта разница в энергии между двумя субстратами одинакова, что свидетельствует о том, что причина различия одна – геометрическая удаленность реакционного центра от каталитического во втором субстрате.

Если мы будем рассматривать гидролиз ряда метиловых эфиров (Рисунок 5.6) под действием сериновых протеаз (в частности, альфа-химотрипсина), то обнаружим, что увеличение объема и гидрофобности заместителя R₁ будет приводить к увеличению скорости ацилирования, а увеличение объема R₂ будет приводить к уменьшению скорости ацилирования.

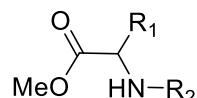


Рисунок 5.6. Общая формула метиловых эфиров (см. текст).

Это связано с тем, что когда R_1 более гидрофобен, чем R_2 , то связывание будет происходить возле R_1 , и субстрат будет правильно ориентироваться в активном центре фермента, а когда R_2 оказывается гидрофобнее, то и связывание будет происходить возле R_2 , и соответственно субстрат будет занимать неправильное положение в активном центре фермента. С этим связано и то, что в случае каталитического гидролиза сложноэфирных субстратов сериновыми протеазами скоростьлимитирующей будет стадия образования ацилфермента, а в случае амидных субстратов – стадия деацилирования (известно, что все сериновые имеют довольно широкую субстратную специфичность).

Лекция 6. Теории ферментативного катализа.

Теория сближения и ориентации. Мы говорили, что фермент насыщен субстратом, когда концентрация субстрата велика, если $[RY] \gg K_S$, и отношение скоростей имеет вид

$$\frac{\vartheta_1}{\vartheta_2} = \frac{e^{\frac{\Delta G_S - \Delta G_{S,\text{внутр.}}^\ddagger}{RT}}}{[RY]}$$

Активированный комплекс образуется в две стадии: сначала происходит сближение субстрата и фермента, а затем – физико-химическое взаимодействие между ними, то есть величина ΔG_{II}^\ddagger определяется величиной энергии сближения и ориентации $\Delta G_{\text{сближ.и ориент.}}$ и величиной энергии последующего взаимодействия $\Delta G_{II \text{ внутр.}}^\ddagger$:

$$\Delta G_{II}^\ddagger = \Delta G_{\text{сближ.и ориент.}} + \Delta G_{II \text{ внутр.}}^\ddagger$$

При образовании комплекса Михаэлиса возможно возникновение элементов переходного состояния последующей ферментативной реакции, поэтому разница в скоростях реакций ферментативного и неферментативного путей фактически будет определяться величиной энергии сближения и ориентации:

$$\Delta G_{II}^\ddagger - \Delta G_{II \text{ внутр.}}^\ddagger = \Delta G_{\text{сближ.и ориент.}}$$

Основной вопрос в рамках теории сближения и ориентации – может ли энергетический выигрыш за счет образования элементов переходного состояния в комплексе Михаэлиса скомпенсировать энтропийные потери, неизбежные при образовании комплекса Михаэлиса (за счет уменьшения частиц и замораживания части степеней свободы). Процесс сближения двух реакционных центров безусловно энергетически выгоден и приводит к ускорению реакции. Но за счет чего еще может быть выигрыш в энергии? Что имеется в виду под образованием элементов переходного состояния? Допустим, у нас есть два разных субстрата и некоторый фермент. Первый субстрат R-Y связывается ферментом так, что при этом субстрат может свободно колебаться внутри фермента, и в результате взаимодействие реакционного центра Y в субстрате с активным центром X фермента оказывается затруднено, и катализ будет малоэффективен (Рисунок 1.7, а). Второй субстрат RR'Y будет связываться так (Рисунок 1.7.,б), что эффективность катализа значительно возрастет, так как эффективное взаимодействие между реакционным центром субстрата и активным центром фермента реализовалось не на стадии химического превращения субстрата, а на стадии образования комплекса Михаэлиса. В целом, подобное различие в связывании субстрата объясняет и разницу в эффективности связывания субстрата (константы Михаэлиса), и в эффективности превращения (катализитической константы). *Образование фермент-субстратного комплекса обеспечивает не только пространственное сближение, но и образование элементов переходного состояния внутри комплекса.*

Теория индуцированного соответствия. Теория сближения-ориентации не может объяснить разную активность по отношению к малым субстратам либо геометрически подобным но химически несколько различным субстратам. Попытка создания более

общей теории была предпринята Кошландом в начале 50-х годов (Koshland, D.E., PNAS, v.44, p.98(1955)) в виде теории индуцированного соответствия. Предполагалось, что каталитические группы в ферменте в нативном состоянии находятся в положении, отличном от положения, в котором они осуществляют катализ (Рисунок 1.5). Если субстрат хороший, то происходит правильное связывание субстрата, в результате которого реакционноспособные группы активного центра оказываются правильно расположеными по отношению к субстрату. Если субстрат плохой, то он связывается таким образом, что конформационных изменений в ферменте либо не происходит, либо происходят неправильно, и каталитические группы оказываются далеко от реакционного центра субстрата, и в результате каталитической реакции не происходит. Плохой субстрат, конечно, может связываться ферментом даже лучше хорошего, но правильного ориентирования каталитически активных групп происходить не будет. Индуцированное соответствие обеспечивает контроль специфичности ферментативной реакции, но не позволяет объяснить использование энергии связывания для уменьшения энергии активации последующего ферментативного превращения.

Рассмотрим Схему 6.1:

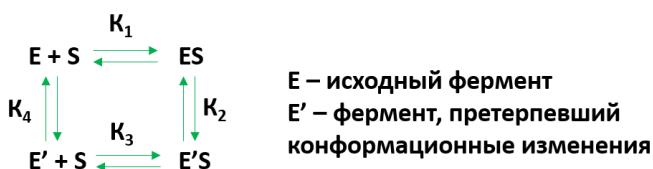


Схема 6.1. Возможные пути реакции фермента и субстрата.

Наблюдаемая энергия связывания субстрата, которая будет равна ($\Delta G_3 + \Delta G_4$), всегда будет меньше величины ΔG_3 , потому что ΔG_4 соответствует переходу фермента из нативного, т.е. наиболее энергетически выгодного состояния E в менее выгодное состояние E'; т.е. $\Delta G_3 + \Delta G_4 < \Delta G_3$. Таким образом, при индуцированном соответствии наблюдаемая константа связывания уменьшается по сравнению с той величиной, которая наблюдалась бы в отсутствие конформационных изменений. Максимальная скорость реакции оптимальна для специфических субстратов именно за счет использования энергии специфического связывания для создания более активной конформации фермента.

Важной особенностью теории индуцированного соответствия является то, что она объясняет неактивность ферментов по отношению к некоторым малым субстратам. Понятно, что связывание малого субстрата (вода, аммиак, углекислый газ) не приводит к конформационным изменениям в ферменте.

Теория индуцированного соответствия очень продуктивна в том плане, что позволяет устанавливать связь между геометрией и наличием определенных активных групп в активном центре фермента. Как правило, в активном центре фермента много разных реакционноспособных групп, но чтобы понять механизм действия фермента, нужно понять, какие именно из этих групп участвуют в ферментативной реакции. Как

правило, катализитические группы в нативном состоянии фермента находятся довольно далеко друг от друга, и может возникать несоответствие структурных данных о нативном ферменте (рентгеноструктурные данные) и кинетических данных., Объяснение этому можно предложить как раз на основе теории индуцированного соответствия, а подтвердить корректность этого объяснения можно с помощью рентгеноструктурных данных для комплекса фермента и ингибитора, структурно похожий на специфический субстрат к исследуемому ферменту. Если эти данные покажут наличие конформационных изменений в ферменте при образовании комплекса с ингибитором, значит, можно делать окончательные выводы о том, как устроен механизм катализа данным ферментом, опираясь на теорию индуцированного соответствия.

Теория напряжения и деформаций. Теория исходит из того, что связывание между субстратом и ферментом используется для создания напряжения или деформаций, которые обеспечивают ускорение реакций (Рисунок 1.6). Если вспомнить курс органической химии, напряженные структуры всегда гораздо более реакционноспособны (например, трехчленные циклы более активны чем шестичленные). Энергия связывания в данном случае используется для того, чтобы деформировать ту связь, которая в последующем химическом превращении должна быть разорвана. Если же конформационно лабилен фермент, то мы обратно возвращаемся к теории индуцированного соответствия.

На самом деле в реальной жизни конформационно подвижными в какой-то степени оказываются и фермент, и субстрат, и реализуется промежуточный между индуцированным соответствием и напряжениями-деформацией механизм. Эти теории достаточно абстрактны, и каждый раз приходится доказывать наличие напряжений в фермент-субстратном комплексе, что достаточно трудно экспериментально доказать – кинетические методы этого не позволяют увидеть, а прямых методов фактически не существует (например, рентгеноструктурный метод не может сказать, что происходит в растворе).

Таким образом, основной вывод, следующий из обзора основных теорий механизмов действия ферментов, таков: активный центр фермента должен быть комплементарен переходному состоянию реакции в том или ином виде (либо активный центр нативного фермента, либо конформационно измененного фермента), при этом комплементарность фермента исходному субстрату не обязательна для обеспечения высокой эффективности катализа.

Абзимы. Цель изучения механизмов ферментативных реакций – понять, как все это устроено в природе и попробовать применять принципы биологического катализа для создания искусственных катализаторов. В какой –то момент выделилась наука биомиметика – область науки, занимающаяся моделированием ферментов, и возникла идея научиться делать ферменты, которые бы катализировали важные органические реакции. По идее, для этого нужно синтезировать геометрический аналог переходного состояния требуемой органической реакции, и получить белок, который был бы ему

комплементарен. Как получить такой белок? Можно ввести синтетический геометрический аналог переходного состояния в какой-нибудь организм и получить антитела (это выполнимо, хотя не так и просто, получение антител к низкомолекулярным соединениям – отдельная сложная задача). А как быть с аналогом переходного состояния? Современные методы органического синтеза позволяют решить эту задачу, вполне можно найти и синтезировать соединения с заданной структурой, подобной требуемому переходному состоянию. Например, устойчивым аналогом интермедиата реакции нуклеофильного замещения в ароматическое ядро – комплекса Мейзенгеймера – может служить соединение

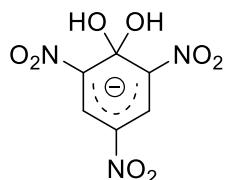


Рисунок 6.1. Пример комплекса Мейзенгеймера.

которое вполне можно синтезировать и выделить в индивидуальном состоянии. Также и для большого количества других типов органических реакций можно синтезировать и выделить устойчивые аналоги переходных состояний.

Для некоторых органических реакций, не имеющих отношения к биологическим системам, были получены аналоги переходного состояния и антитела к ним, и таким образом в результате удалось создать ферменты, которые катализировали эти реакции. Однако эффективности таких ферментов оказалась невысокой по сравнению с природными ферментами – скорости реакций удалось увеличить всего в 5-10 раз; сегодня активно продолжаются попытки повысить эффективность таких ферментов, например, за счет введения ионов металлов или дополнительной модификации белка. Такие искусственные ферменты называются **абзимы**. Очень вероятно, что удастся сделать такие абзимы, которые по своей эффективности и специфичности если не достигнут природных ферментов, но превзойдут низкомолекулярные синтетические катализаторы.

Химический катализ в ферментах. Эффективность ферментативного катализа обусловлена не только использованием энергии сорбции, но и химическим катализом, который реализуется в активном центре. С одной стороны, у белков не слишком много возможностей для реализации традиционных механизмов химического катализа. При физиологических значениях pH есть некоторый набор потенциально ионизируемых аминокислот, на которых при определенных условиях может возникнуть заряд – реакционноспособный центр (кислотно-основный катализ), и набор аминокислот – потенциальных нуклеофилов или электрофилов (серин, треонин, аспарагин, глутамин). *Если бы все реакции, происходящие в организме, протекали бы непосредственно в водной среде, то катализ этими группами был бы невозможен*, однако на самом деле диэлектрическая проницаемость среды в активном центре невелика, каталитически активные группы не имеют плотной гидратной оболочки, и катализ этими группами

реализуется более эффективно, чем в каталитических системах, существующих в водной среде.

В очень многих биологических реакциях определяющее значение для скорости имеет *перенос протона*. Это касается всех реакций гидролиза. Допустим, нам нужно гидролизовать ацетилимидазол (Схема 6.2).

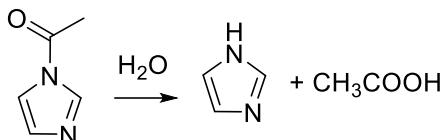


Схема 6.2. Гидролиз ацетимидазола.

Чтобы эта реакция прошла, нужно, с одной стороны, чтобы разорвалась связь C–N и образовалась связь C–O, а с другой стороны, чтобы два протона были бы удалены из воды, би присоединены к имидазолу и ацетату. Стадии переноса протона обычно имеют низкие значения энергии активации, но за счет того что при этом могут образовываться нестабильные промежуточные соединения, эти стадии могут существенно увеличивать энергию активации всего процесса в целом. Выход – традиционный основно-кислотный катализ, в данном случае – общеосновный катализ. Здесь в качестве катализатора может выступить сам имидазол, который будет атаковать воду и увеличивать ее нуклеофильность (Схема 6.3).

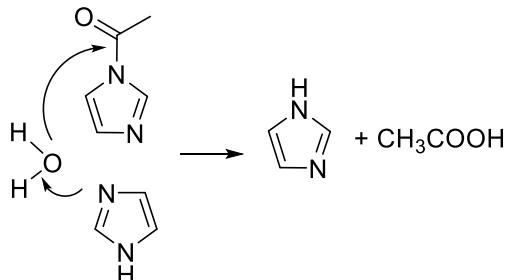


Схема 6.3. Общеосновный катализ в реакции гидролиза ацетимидазола.

Эта реакция автокатализическая – катализатор (имидазол) образуется в ходе реакции.

Возможен и другой механизм кислотно-основного катализа – специфический основный катализ, т.е. снятие протона основанием субстрата (Схема 6.4).

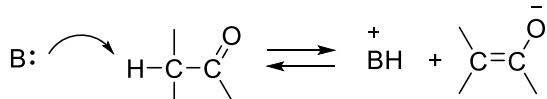


Схема 6.4. Специфический основный катализ.

Аналогично основному катализу происходит и кислотный катализ. Общекислотный катализ происходит следующим образом, как на Схеме 6.5.

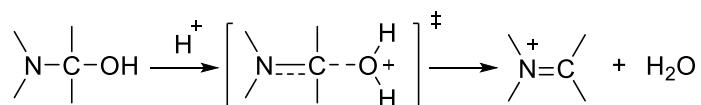


Схема 6.5. Общекислотный катализ.

Таким образом, при кислотно-основном катализе происходит стабилизация переходного состояния за счет более благоприятного перераспределения электронной плотности, т.е. удается избежать образования малоустойчивых промежуточных соединений при переносе протона, и это дает выигрыш в энтропии активации. Например, увеличение порядка реакции на единицу для реакции гидролиза снижает энтропию активации примерно 3.6 ккал/моль (ускорение в 10^2 - 10^4 раз).

Если в обычных органических реакциях при увеличении порядка реакции на единицу (т.е. за счет добавления дополнительных частиц в систему – H^+ или OH^-) выигрыш в энталпии активации почти полностью компенсируется проигрышем в энтропии активации, то в ферментативных реакциях такого не происходит, т.к. по сути дополнительного увеличения числа частиц не происходит (кислотно-основные группы и так уже входят в состав активного центра), и энтропийные проигрыши невелики. Другими словами, кислотно-основный катализ является малоэффективным в случае обычных неферментативных реакций, но оказывается чрезвычайно эффективен в ферментативных реакциях, обеспечивая ускорение реакции на 2-4 порядка.

Карбоксипептидаза А. Этот фермент «отрывает» от пептида один аминокислотный остаток с С-конца. В активном центре карбоксипептидазы есть аргинин-145, который взаимодействует с карбоксильной группой С-конца. Аргинин в данном случае обеспечивает связывание фермента с С-концом и не зависит от аминокислоты, занимающей этот конец, поскольку связывание происходит за счет электростатического взаимодействия. Кроме этого, там присутствует тирозин-248, который образует водородную связь с атомом азота разрываемой пептидной связью. Также в активном центре есть глутаминовая кислота-270, которая выступает в роли общего основания, активирующего воду, которая атакует карбонильный атом углерода (Схема 6.6).

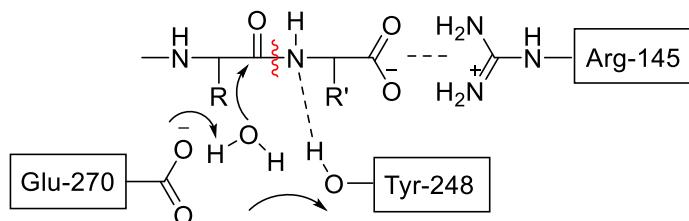


Схема 6.6. Общая схема действия карбоксипептидазы А.

Оба остатка – тирозиновой и глутаминовой кислоты – действуют как основные катализаторы. Карбоксипептидаза содержит в своем составе ион цинка, который взаимодействует с карбонильным кислородом, расположенным возле разрываемой пептидной связи, и тем самым увеличивает электрофильность карбонильного атома углерода. Таким образом, карбоксипептидаза А использует одновременно общесосновный и электрофильтный катализ, благодаря чему достигается высокая эффективность в реакции ферментативного гидролиза пептидной связи.

Папаин. Этот фермент расщепляет пептидные связи в белке. В активном центре этого фермента (Схема 6.7) присутствует глутамин-19, который взаимодействует с карбонильным атомом кислорода. Нуклеофилом выступает цистеин-25, нуклеофильность которого существенно усиливается благодаря гистидину-159 – общеосновному катализатору. Фактически, у нас есть два центра: один – общекислотный, взаимодействующий с кислородом субстрата, а другой – нуклеофильный – цистеин + гистидин.

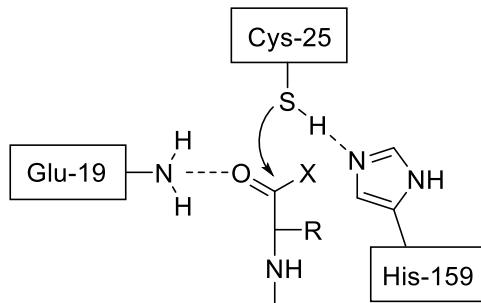


Схема 6.7. Общая схема действия папаина.

Лекция 7. Классы протеаз.

Субтилизин. Субтилизин – классический представитель сериновых гидролаз. Каталитическая триада в активном центре аналогична таковой в химотрипсине, различие лишь в нумерации аминокислотных остатков (Asp32-His64-Ser221, в то время как у химотрипсина Asp102-His57-Ser195). Субтилизин Карсберг (из *Bacillus subtilis*) производят тоннами, поскольку он используется в детергентах (стиральных порошках). Третичная структура субтилизина не похожа на аналогичные ферменты животного происхождения, однако принцип работы активного центра такой же. Активность субтилизина по отношению к самому «лучшему» синтетическому субстрату для химотрипсина – N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe п-нитроанилиду (см. Лекцию 2) также, как и у химотрипсина, достаточно высока (Таблица 7.1.)

Таблица 7.1. Сравнение активностей химотрипсина и субтилизина по субстрату N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe п-нитроанилиду.

Фермент	$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \mu\text{M}$
Химотрипсин	45	43
Субтилизин	59	200

Отличие субтилизина от химотрипсина и трипсина состоит в том, что *у него нет ярко выраженного гидрофобного кармана, погруженного в активный центр фермента, этот карман расположен на поверхности молекулы белка.* Также в структуре субтилизина нет дисульфидных мостиков, он состоит из одной полипептидной цепи и синтезируется из мембрально-связанного предшественника – препросубтилизина путем автопротеолитического расщепления. Кроме этого, есть различия и в оксоанионной дырке: в случае химотрипсина она образована аминогруппой серина остова и аминогруппой глицина-193, а у субтилизина ее образует аминогруппы серина-221 и аспарагина-155. Мутация остатка Asn155 приводит к потери энергии связи в переходном состоянии на 2.2 – 4.7 ккал/моль (в зависимости от конкретного мутанта), что согласуется с данными для потери водородной связи, как раз той самой, что важна для стабилизации переходного состояния. Этим подтверждается роль аспарагина-155 в стабилизации переходного состояния в субтилизине.

Субтилизин в больших количествах используется в биотехнологиях, и поэтому накоплено огромный объем данных о результатах экспериментов по введению мутаций в него. В частности, мутации в активном центре приводят к существенному снижению каталитической константы (мутация Asp32Ala снижает в $3 \cdot 10^4$ раз, His64Ala – в $2 \cdot 10^6$ раз, а Ser221Ala в $2 \cdot 10^6$ раз; константы Михаэлиса при этом уменьшаются в 2 раза), что доказывает участие именно этих групп в катализе. Замены остатка Asn155 на Thr, Gln, Asp, His оказывают малое влияние на связывание, но при этом снижают каталитическую константу в 1000 раз; это подтверждает важность данного остатка в катализе.

Подцентр S1 субтилизина, связывающий гидрофобные остатки, в целом имеет более широкую специфичность, чем у химотрипсина (потому что у субтилизина щель, а не углубленный карман, как у химотрипсина). Наибольшая специфичность: Тир>Phe>Met>Ala. Остаток Gly166 прикрывает вход в карман. Мутации, направленные на увеличение 166-го остатка, приводят к снижению активности по отношению к Тир (т.к. уменьшается размер входа в щель).

Двойная мутация Ser221Cys и Pro225Ala приводит к увеличению пептидлигазной активности в 10 раз, т.е. улучшается синтез пептидной связи, а гидролиз – ухудшается. Подобные мутанты используются для синтеза пептидных связей в органических реакциях.

Субтилизин часто используется в стиральных порошках, для чего устойчивость фермента при высоких температурах оказывается особенно важной. Кроме этого, фермент должен быть устойчив по отношению к окислителям (отбеливатели), чего удается достичь благодаря замене Met222 на другие остатки (природный субтилизин легко инактивируется из-за окисления Met222), однако активность фермента при этом немного снижается.

Другие классы протеаз. Цистeinовые протеазы. Кроме сериновых протеаз, существуют и другие гидролазы, например, цистeinовые, аспартильные, и металлопротеазы (Рисунок 7.1).

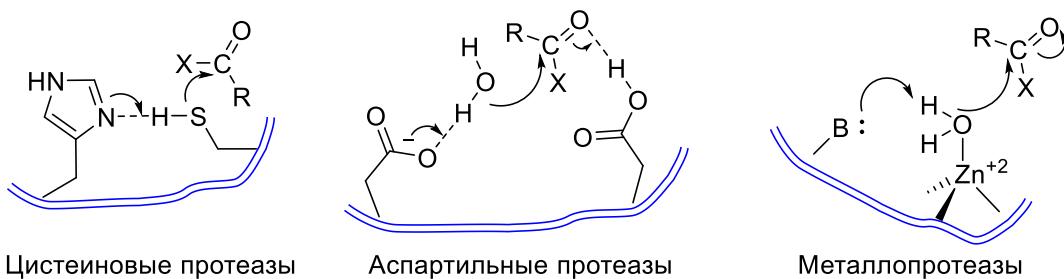


Рисунок 7.1. Некоторые классы протеаз.

Цистeinовые протеазы содержат в активном центре S-H группу, которая выступает в качестве нуклеофила, а аспартильные протеазы содержат два остатка аспартата в активном центре. Также существуют и металлопротеазы, например, карбоксипептидаза А. Все эти ферменты гидролизуют пептидные связи в полипептидной цепи.

Цистeinовые (или тиоловые) протеазы очень широко распространены в природе, встречаются у растений, животных и бактерий. Наиболее изученным представителем цистeinовых протеаз является папаин – фермент, выделенный из латекса папайи *Carica papaya* (EC 3.4.22.2). Однако папаин не рассматривается как прототип всех тиоловых протеаз, поскольку существуют разные цистeinовые протеазы.

Некоторые цистeinовые протеазы растений – например, папаин, актинилин (из киви и крыжовника, EC 3.4.22.14) и фицин (из фицового дерева, EC 3.4.22.3) являются гомологичными белками. В составе активного центра они содержат тиол-имидаольную

пару и остаток аспарагина, которые важны для катализа. Бактериальная цистеиновая протеаза - фермент гемолитических стрептококков, стрептококковая протеаза (EC 3.4.22.10) вместо аспарагина содержит глицин.

Молекулярная масса многих цистеиновых протеаз составляет 20-35 кДа, многие из них являются моносубъединичными белками. Некоторые цистеиновые протеазы (бромелайны (EC 3.2.33.32 и 3.4.22.33), химопапаины, некоторые фицины и многие катепсины) представляют собой гликопротеины, т.е. содержат на своей поверхности углеводные остатки. Такие ферменты, как калпайн (EC 3.4.22.52, мол. масса 108 кДа) и кластрипайн (EC 3.4.22.8, масса 55.5 кДа) являются гетеродимерами, т.е. содержат две субъединицы.

Тиоловые протеазы млекопитающих представлены большим количеством ферментов: катепсины В, Н, Л, С, которые характеризуются высоким уровнем гомологии. Участвуют во многих клеточных процессах, таких как протеолиз, синтез белков, гормональные процессы, перестройки костей и прочее. Полагают, что катепсины В и Л вовлечены в ряд заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, остеопороз и пролиферирующая опухоль.

Катепсины в зрелом состоянии локализуются в липосомах клетки. Проферменты синтезируются в виде гликозилированных предшественников, с более высоким молекулярным весом, и активируются протеолизом. Каталитически активные катепсины состоят из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидным мостиком.

Папаин – фермент, содержащий лишь одну полипептидную цепь (212 остатков, масса 23.4 кДа), но состоит он из двух явно выраженных доменов – R и L, которые разделены щелью, где происходит связывание субстрата. Каталитически активны остатки Cys25 и His159 расположены по разные стороны щели, причем Cys25 входит в α -спираль L-домена, а His-158 – в β -лист R-домена.

Боковая группа остатка аспарагина-175 важна – она образует водородную связь с имидазольным кольцом His-159, необходимую для сохранения правильной его ориентации в катализе. Аспарагин175 окружен гидрофобными остатками – Phe141, Val161, Trp177, Trp181, и считается, что такое окружение необходимо для защиты водородной связи между аспарагином и гистидином от растворителя. Замена Asn175Gln уменьшает величину k_{cat}/K_m в 3.4 раза, а замена Asn175Ala уменьшает в 150 раз, а также повышает подверженность протеолизу (поскольку при этом происходит неправильное сворачивание фермента) и сужается диапазон pH, при которых фермент активен.

Активный центр папаина связывает до семи аминокислотных остатков субстрата, т.е. фрагмент длиной 2.5 нм (Рисунок 7.2).

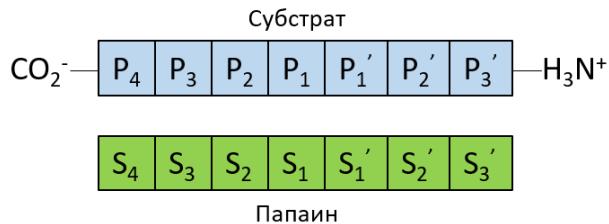


Рисунок 7.2. Схематичное изображение активного центра папаина со всеми подцентрами.

Подцентр S_{1'} связывает гидрофобные остатки (Ile, Trp). Участок P₁ субстрата слабо контактирует с растворителем, участок P₂ взаимодействует с ферментом только внутри полости гидрофобного кармана. Специфичность папаина определяется преимущественно взаимодействием P₂/S₂; так, если S₂ гидрофобный, то и P₂ тоже должен быть гидрофобным.

Так же, как и в сериновых протеазах, тетраэдрический атом углерода в фермент-субстратном комплексе и тетраэдрическом переходном состоянии папаина стабилизирован водородными связями в оксоанионной дырке. Отрицательно заряженный атом кислорода субстрата образует водородные связи с боковой аминогруппой Gln-19 и NH-группой Cys-25.

При связывании субстрата реализуется многоточечное взаимодействие между ферментом и субстратом (много водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий) (Рисунок 7.3.).

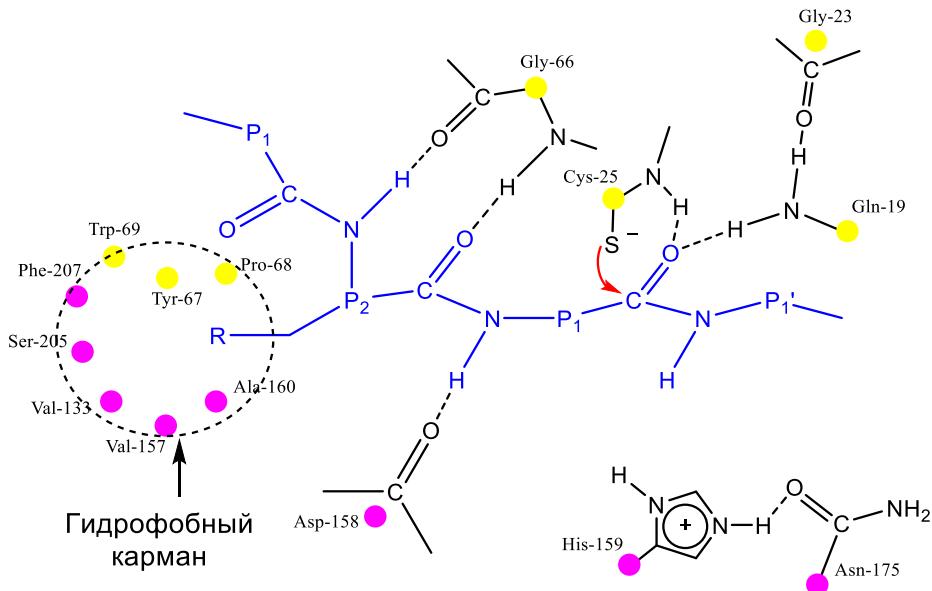


Рисунок 7.3. Активный центр папаина. Остатки, принадлежащие R-дому, обозначены на рисунке фиолетовыми кружочками, L-дому – желтыми).

Гидрофобный карман образован остатками Pro-68, Tug-67 и другими

В связывании субстрата участвуют группы обоих доменов. На дне кармана расположен серин205, что задает специфичность папаина к большим гидрофобным радикалам типа фенилаланина. Рентгеноструктурные данные свидетельствуют о том, что связывание субстрата слегка увеличивает щаль между доменами (механизм индуцированного соответствия).

Высокая нуклеофильность тиольной группы цистеина-25 обусловлена следующими факторами: в диапазоне оптимальных значений pH для фермента (нейтральные pH) тиольная группа депротонирована; боковые радикалы Cys-25 и His-159 имеют необычные значения pKa и образуют **тиол-имидазольную пару** (S^-/ImH^+ или SH/Im), которая протонируется при pH 3-4 с образованием RSH/ImH^+ и диссоциирует при pH 8-9 с образованием RS^-/Im (в то время как pKa свободного гистидина составляет 6.9, а цистеина 9.1) (Схема 7.1). Нуклеофильная атака тиолат-иона по карбонильному атому углерода субстрата приводит к образованию ацилфермента.

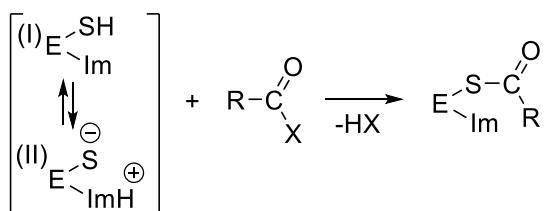


Схема 7.1. Тиол-имидазольная пара.

Для исследования активности папаина используют синтетические субстраты (Рисунок 7.4). Все они имеют фрагмент метилкумарины, и в качестве одного из продуктов ферментативной реакции образуется аминометилкумарин, который имеет длину волн возбуждения флюoresценции 390 нм, а испускания – 437 нм.

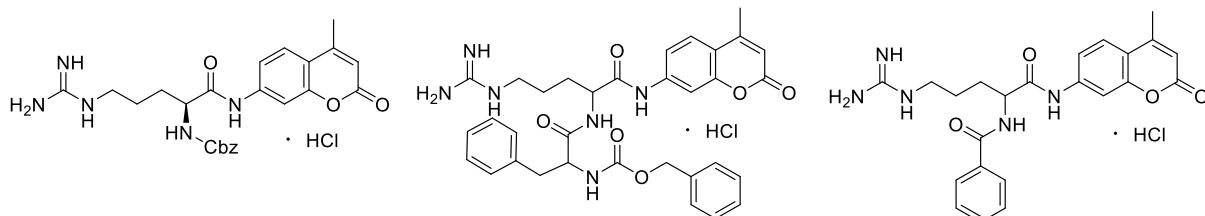


Рисунок 7.4. Синтетические субстраты для папаина.

Существуют хромогенный паранитроанилидный субстрат (Рисунок 7.5), который активно используется при работе с тиоловыми протеазами, поскольку имеет хорошие значения параметров.

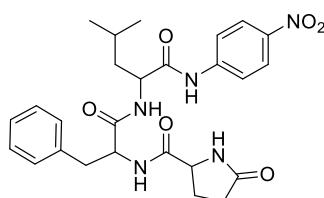


Рисунок 7.5. Паранитроанилидный субстрат папаина.

Папаин работает в диапазоне значений pH от 5 до 8.

Механизм действия цистеиновых гидролаз на примере папаина. Тиол-имидазольная пара в активном центре протонируется при Рн 3-4 с образованием соединения RSH/ImH^+ . При pKa 4-6 депротонируется карбоксильная группа Asp158, что необходимо для формирования диполя, стабилизирующего микросреду активного центра (Схема 7.2).

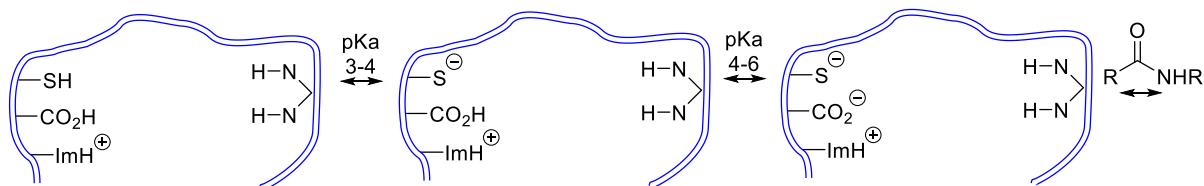


Схема 7.2. Активный центр папаина при разных значениях pH.

Гистидин расположен в активном центре таким образом, что его имидазольное кольцо может вращаться вокруг $\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$ связи вплоть до 30° без разрушения. В свободном состоянии фермента это кольцо копланарно к Cys-25, а в ацилированном состоянии фермента протонированное кольцо His-159 должно поворачиваться к атому азота уходящей группы субстрата для передачи протона.

Образуется нековалентный фермент-субстратный комплекс (за счет гидрофобных взаимодействий в гидрофобном кармане, водородных связей между карбонильным атомом кислорода субстрата и аминогруппами Gln-19 и NH-группой Cys-25) (Схема 7.3).

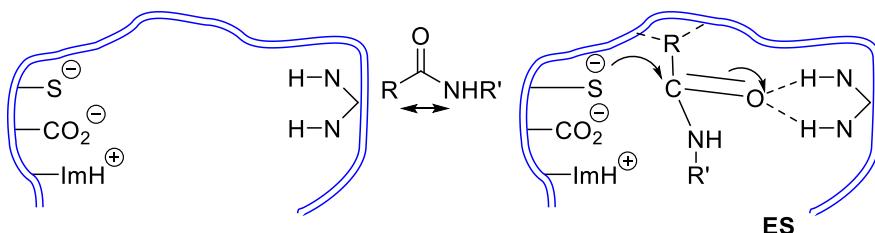


Схема 7.3. Образование фермент-субстратного комплекса папаина.

Далее следует нуклеофильная атака тиолат-иона, которая завершается образованием тетраэдрического интермедиата T11. Отрицательный заряд на карбонильном атоме кислорода стабилизируется в оксоанионной дырке за счет усиливающихся по сравнению с исходным фермент-субстратным комплексом водородных связей с Gln-19 и Cys-25. pKa гистидина-159 уменьшается до 4, поскольку гистидин находится в гидрофобном окружении, тиолат-ион, а стабилизирующий положительный заряд на гистидине, отсутствует. Поскольку имидазольное кольцо ImH^+ в T11 становится более слабым основанием, оно с легкостью отдает протон уходящей группе NHR' группе продукта. Тетраэдрический интермедиат разрушается и образуется ацилпапаин EA (Схема 7.4).

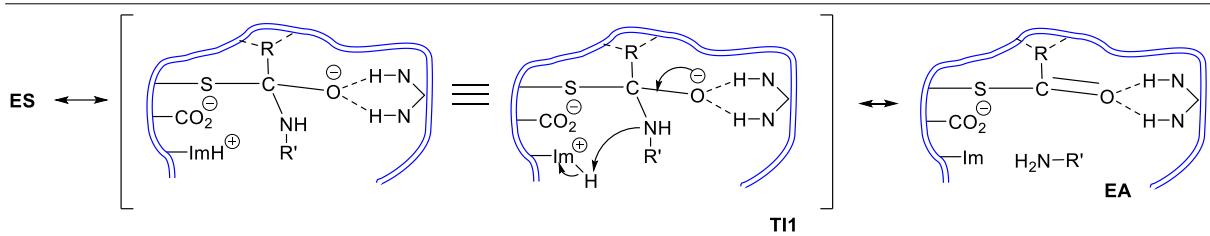


Схема 7.4. Образование ацилпапаина и первого продукта реакции.

Завершающий этап – деацетилирование ацилпапаина. Молекула воды атакует ацильный атом углерода, что приводит к образованию второго тетраэдрического интермедиата TI2. Протон из молекулы воды поступает на имидазольное кольцо His-159, положительный заряд на котором стабилизирован карбоксильной группой Asp-158 и карбонильной группой Asn-175. Затем тетраэдрический интермедиат разрушается, образуется тиол-имидазольная пара свободного папаина и второй продукт реакции (Схема 7.5).

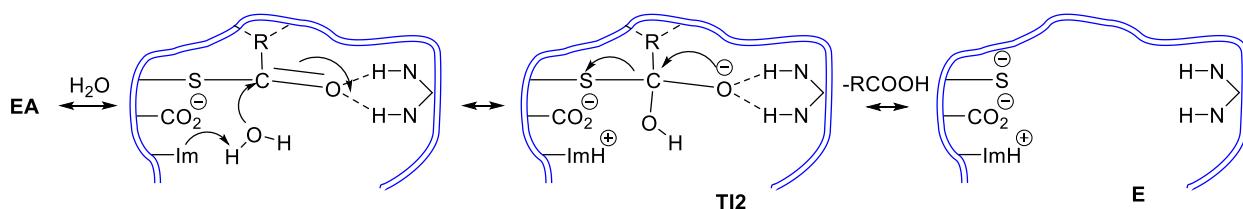


Схема 7.5. Деацетилирование ацилпапаина.

В целом, этот механизм *похож на механизм действия сериновых гидролаз*, разница заключается в том, что вместо катализитической триады серин-гистидин-аспарагин здесь работает тиол-имидазольная пара.

Аспартильные гидролазы. В активном центре ферментов этого типа содержатся карбоксильные группы двух аспарагиновых кислот. Функция фермента – гиролиз пептидной связи, однако механизм его действия значительно отличается от такового для сериновых гидролаз. Аспартильные протеазы встречаются в животных, грибах, высших растениях. Примеры ферментов представлены в Таблице 7.2.

Таблица 7.2. Некоторые аспартильные протеазы и их функции.

Фермент	Источник	Функция
Пепсин (EC 3.2.23.1)	Желудок животных	Пищеварение
Химозин (EC 3.2.23.4)	Желудок животных	Пищеварение
Катепсин D (EC 3.2.23.25)	Печень, селезенка и другие ткани животных	Лизосомальное расщепление белков
Ренин (EC 3.2.23.23)	Почки	Превращение ангиотензиногена в

		ангиотенсин L, регуляция кровяного давления
ВИЧ-протеаза (EC 3.2.23.16)	СПИД-инфицированные больные	Образование частиц вируса ВИЧ

Свиной пепсин первым из всех ферментов получил название (Schwann, T., 1825) и вторым из ферментов, после уреазы, был закристаллизован (Northrop, J.H., 1930). Пепсин – первый фермент в цепи ферментов пищеварительной системы, расщепляющих белки. В активной форме локализуется в желудке млекопитающих. Кроме гидролиза белков, пепсин катализирует реакцию образования пептидной связи (обладает транспептидазной активностью).

Катепсин D найден в лизосомах клеток печени и селезенки высших эукариот и участвует в катаболизме белков клетки. Зрелый катепсин D после посттрансляционной модификации состоит из двух цепей: легкой (остатки 1-97 первичной последовательности) и тяжелой (остатки 106-346). Содержит на N-конце фосфорилированные олигосахариды, с помощью которых через манноза-6-фосфатные рецепторы попадает в лизосомы. Фермент интересен с фармакологической точки зрения, поскольку вовлечен в ряд биохимических процессов: развитие рака груди, мышечной дистрофии, дегенеративные изменения мозга, и проч. Создание лекарств, включающих ингибиторы катепсина D – одно из направлений современной фармакологии.

Химозин синтезируется в желудке новорожденных млекопитающих, чтобы расщеплять единственную связь (Phe105 – Met-106) только в одном из белков молока – к-казеине. Расщепление к-казеина приводит к сворачиванию молока, что на протяжении веков использовалось в производстве сыров. Химозин обладает абсолютной специфичностью.

Ренин участвует в регуляции кровяного давления, отщепляя декапептид ангиотензин I от N-конца прогормона ангиотензиногена и обладает общей протеиназной активностью. Изучение ингибиторов ренина было направлено на разработку лекарств против повышенного давления (антигипертензивных средств).

Ретровирусная протеаза вируса иммунодефицита человека – новая аспартильная протеаза. Потеря активности этого фермента приводит к тому, что вирус ВИЧ не реплицируется в CD4 Т-лимфоцитах, то есть становится неинфекциональным. Поэтому разработка эффективных ингибиторов ВИЧ-протеаз является одним из перспективных направлений в терапии СПИДа.

Пепсин состоит из одной полипептидной цепи (327 а.к., 34.6 кДа), свернутой с образованием двух доменов. Домены разделены глубокой щелью (30 Å), в которой происходит связывание субстрата и катализ. Два каталитически важных остатка (Asp-32 и Asp-215) находятся на дне щели в поляризованном окружении. Пепсин главным образом

является β -белком (содержит много β -структур), содержит большой процент кислых остатков (43 из 327), что приводит к низкому значению рI фермента.

Для пепсина (Asp-32 и Asp-215), катепсина D(Asp-33 и Asp-231), химозина (Asp-32 и Asp-215) характерна очень высокая гомология. ВИЧ 1 протеаза - гетеродимер (Asp-25 и Asp-25', из двух разных субъединиц).

pH оптимум действия пепсина наблюдается при pH 2-3 и определяется двумя различными рKa карбоксильных групп аспарагиновой кислоты (рKa₁ = 1.1, рKa₂ = 4.5). Ингибиторный анализ позволил определить, какая аминокислота ионизирована в pH оптимуме, а какая – не ионизирована:

1. Соединения типа метилового или этилового эфира N-диазоацетил-аминокислот (например, N-диазоацетил-L-фенилаланина), взаимодействующие с неионизированной карбоксильной группой в присутствии ионов Cu²⁺, специфически реагируют с карбоксильной группой Asp-215 вплоть до pH 5 (Схема 7.6).

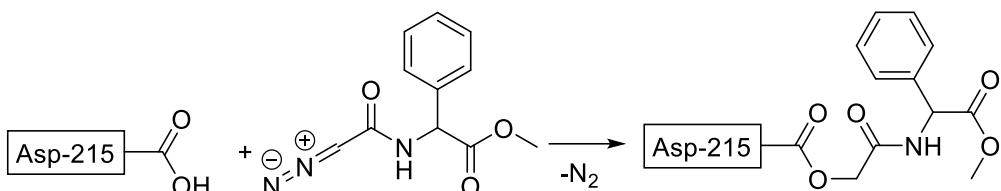


Схема 7.6. Взаимодействие N-диазоацетил-L-фенилаланина с Asp-215 пепсина.

2. Эпоксиды (например, 1,2-эпокси3(4-нитрофенокси)пропан) специфически взаимодействуют с ионизированными карбоксильными группами, реагируют с остатком Asp-32, pH-зависимость скорости модификации свидетельствует о том, что рKa этого остатка меньше 3 (Схема 7.7).

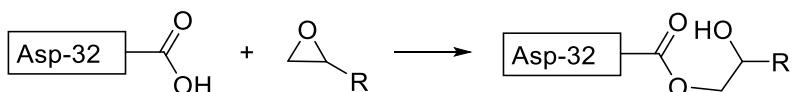


Схема 7.7. Взаимодействие 1,2-эпокси3(4-нитрофенокси)пропана с Asp-32 пепсина.

Карбоксильные группы аспарагиновых кислот находятся в окружении поляризуемых боковых групп: Thr-33, Thr-216, Thr-218, Asp-304 и др. Они необходимы для формирования системы водородных связей. Нуклеофильность карбоксильной групп Asp-32 в этой среде понижена, что говорит против прямой атаки COO⁻ на расщепляемую связь.

Три остатка петли Tug-75, Gly-76, Thr-77 образуют водородные связи с субстратом, и играют важную роль в субстратной специфичности аспартильных протеаз. Так, остаток Tug-75 участвует в «растягивании» субстрата. Связывающий участок активного центра аспартильных протеаз содержит от 4 до 7 подцентров, взаимодействующих с субстратом. Такое многоточечное взаимодействие «заставляет» субстрат в области активного центра принять растянутую конформацию β -листа (механизм напряжений). Вытягивание субстрата приводит к образованию «петли» в участке атакуемой связи. Составляющие энергетического выигрыша удерживания

субстрата в напряженной конформации трудно оценить, но каталитические преимущества подобного взаимодействия известны. Энергия связывания субстрата в каждом дополнительном подцентре приводит к увеличению k_{cat} на 3-4 порядка.

S_1' подцентр пепсина специфичен к остаткам Trp, Tyr, Ile, Phe, Ala, Leu, а подцентр S_1 – к остаткам Leu, Phe, Trp и Gln. С обеих сторон от расщепляемой связи, таким образом, предпочтительно расположение гидрофобных остатков.

Gly-76 консервативен во всех известных эукариотических аспартильных протеазах, кроме ренина. Участвует в катализе, образуя H-связь с субстратом и обеспечивая необходимую гибкость подвижной петли. Замены Gly-76 пепсина на аланин, валин или серин приводят к десятикратному понижению каталитической константы. Trp-77 также образует водородную связь с субстратом и опосредованым образом участвует в формировании правильной геометрии переходного состояния.

Дополнительным доказательством образования тетраэдрического переходного состояния в реакции, катализируемой аспартильными протеазами, является разрешенная кристаллическая структура этих ферментов с природным ингибитором –пепстатином (рисунок 7.6).

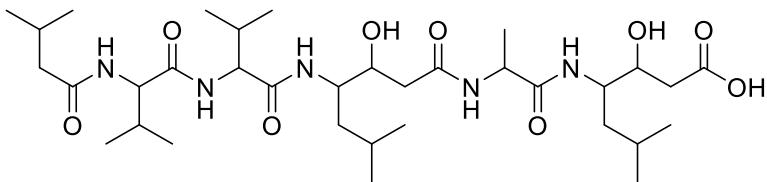


Рисунок 7.6. Пепстатин.

Он ингибирует большинство аспартильных протеаз с $K_I = 10^{12}$ М.

Главным отличием от сериновых и тиоловых протеаз в данном случае является то, что никакого ацилфермента не образуется, и не возникает ковалентных связей в переходном состоянии между субстратом и ферментом. Механизм действия аспартильных протеаз рассмотрим на примере ВИЧ-1 протеазы, содержащей в качестве карбоксильных групп активного центра Asp-25 (субъединица А) и Asp-25' (субъединица В). Asp-25' играет роль общеосновного катализатора, акцептируя протон от молекулы воды. Нуклеофильная атака по карбонильному атому углерода субстрата осуществляется молекулой воды. В результате образуется тетраэдрический интермедиат, где один протон поступает от карбоксильной группы Asp-25, выступающей в роли общей кислоты. Оба атома кислорода тетраэдрического интермедиата становятся протонированными (Схема 7.8). Такой интермедиат достаточно долгоживущий, что объясняет наблюдавшиеся реакции обмена с растворителем.

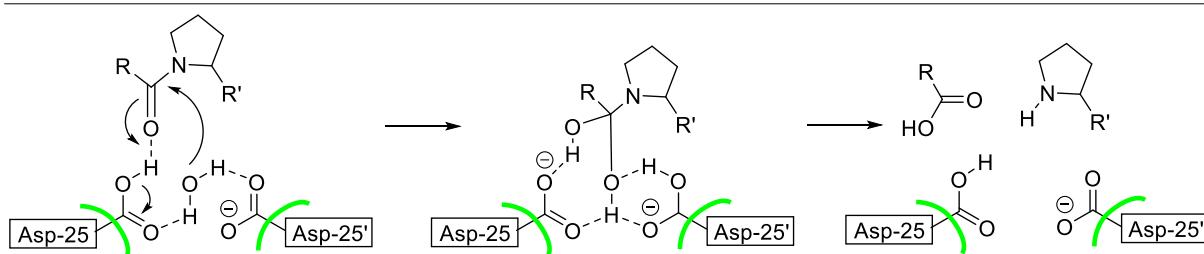


Схема 7.8. Механизм действия аспартильных протеаз на примере ВИЧ-1 протеазы.

При гидролизе субстрата $\text{HCOO-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH}_2$ в присутствии ВИЧ-1 протеазы наблюдался обратный $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ кинетический изотопный эффект (КИЭ), на основе чего была предложена дополнительная стадия механизма – изомеризация пептидной связи субстрата (КИЭ в данном случае возникает от того, что связь с атомом азота в переходном состоянии становится более жесткой, что затем приводит к образованию двойной связи на второй стадии). Затем происходит атака молекулой воды, активированной остатком Asp-25' как общим основанием, по карбонильной группе субстрата, что завершается образованием тетраэдрического интермедиата. Затем интермедиат распадается с образованием продуктов гидролиза (Схема 7.9).

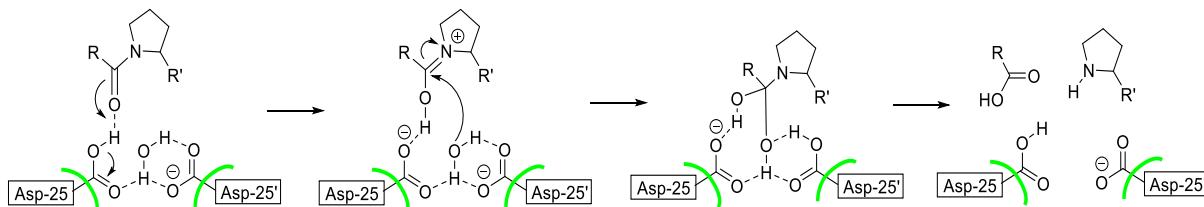


Схема 7.9. Механизм действия аспартильных протеаз на примере ВИЧ-1 протеазы с учетом стадии изомеризации пептидной связи субстрата.

Лекция 8. Эффекты микросреды.

Кислотно-основные катализаторы в ферментативных реакциях. Ферменты обладают высокой катализитической активностью и эффективностью. Это, во-первых, связано с тем, что среда активного центра, вообще говоря, неводная и близка по своим свойствам к неполярным растворителям, поэтому заряженные частицы в нем почти не гидратируются, из-за чего более эффективно проявляют себя в катализе, а во-вторых, с тем, что внутри активного центра может находиться сразу несколько катализически активных групп, действующих совместно. В качестве кислотно-основных катализаторов в активном центре могут выступать разные группы: карбоксильная группа, имидазол, аминогруппа, амидная группа.

Для карбоксильной группы возможно два механизма катализа:

1. Общеосновной катализ, где карбоксильная группа увеличивает нуклеофильность воды (Схема 8.1).

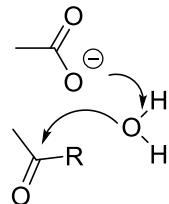


Схема 8.1. Общеосновный катализ карбоксильной группой.

2. Комбинация общекислотного и специфического основного катализа, где участвует протонированная карбоксильная группа, действующая как общая кислота, а также некоторое специфическое основание (Схема 8.2)

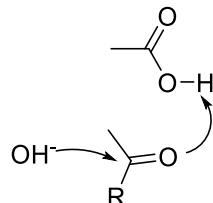


Схема 8.2. Общекислотный и специфический катализ карбоксильной группой.

Установить, какой именно из механизмов реализуется в том или ином случае, довольно сложно. Мы не всегда знаем, ионизирована ли карбоксильная группа в активном центре, или нет, поскольку внутри активного центра ее рKa может изменяться в очень широком диапазоне (5 единиц pH). Оба механизма кинетически эквивалентны, т.е зависимость скорости реакции от pH среды одинакова. Как же все-таки экспериментально различить эти механизмы? Можно добавить в систему дополнительный нуклеофил, и тогда если реализуется первый механизм, то продукт реакции не изменится, а если второй – появится новый продукт. Для ферментов предпочтительнее первый механизм, поскольку он не требует наличия гидроксид-ионов, а ферменты, как правило, не работают при высоких значениях pH. В принципе, возможен катализ и недиссоциированной карбоксильной группой, например, если взять полуамид

фталевой кислоты, то даже в недиссоциированном состоянии карбоксильная группа будет катализировать внутримолекулярный гидролиз амидной группы (Схема 8.3).

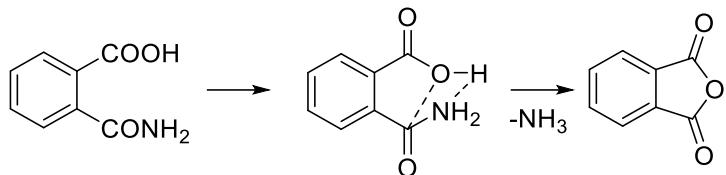


Схема 8.3. Внутримолекулярный гидролиз амида.

Кислород выступает в роли специфического основного, а протон – специфического кислотного катализатора по отношению к амидной группе. Откуда известно, что эта реакция протекает? Скорость этой реакции в миллион раз выше, чем скорость реакции гидролиза полуамида терефталевой кислоты. pK_a полуамида обоих соединений одинаково, но скорость гидролиза сильно различается, поскольку в случае полуамида фталевой кислоты реакция протекает внутримолекулярно.

Теперь перейдем к *амидной группе*. Число амидных групп в любом белке достаточно велико, и их минимальное количество может быть на единицу меньше числа аминокислотных остатков в белке. Амиды очень слабые кислоты и слабые основания (Схема 8.4).

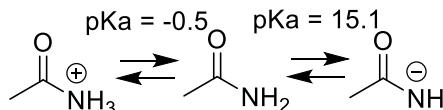


Схема 8.4. Кислотно-основное равновесие амидов.

В межмолекулярных реакциях амиды не активны как кислотно-основные катализаторы, но во внутримолекулярных реакциях могут быть активны (Схема 8.5).

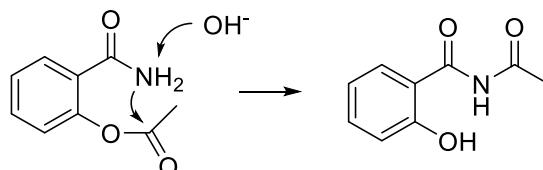


Схема 8.5. Амиды как кислотно-основные катализаторы.

Такой механизм следует из строения продукта гидролиза. Хоть реакция лучше протекает в присутствии основания, но атака карбонильного атома углерода происходит атомом азота амида, и он оказывается лучшим нуклеофилом, чем гидроксид-ион. В активном центре фермента нуклеофильность амидной группы будет значительной за счет того, что диэлектрическая проницаемость среды там высока (внутри белковой глобулы фермента находится всего несколько десятков молекул воды, и среда там совсем не водная!). Амиды могут выступать в качестве общеосновных и нуклеофильных катализаторов в ферментативных реакциях.

Аминогруппы могут быть общеосновным или нуклеофильным катализатором. Например, при $n = 3\text{-}4$ аминогруппа выступает в виде нуклеофильного катализатора (Схема 8.6).

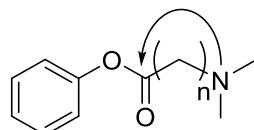


Схема 8.6. Аминогруппа как внутримолекулярный нуклеофильный катализатор.

Имидазол может выступать общеосновным катализатором; в принципе, может быть и нуклеофильным катализатором, но пока что это не было экспериментально установлено.

Гидроксильная группа практически никогда не бывает основным катализатором в межмолекулярных реакциях, но во внутримолекулярных реакциях может (особенно фенольная). Например, она может быть общеосновным катализатором (Схема 8.7).

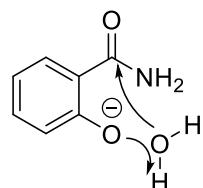


Схема 8.7. Гидроксильная группа как общеосновный катализатор.

Кроме этого, гидроксильная группа может выступать в качестве нуклеофила (Схема 8.8).

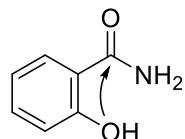


Схема 8.8. Гидроксильная группа как нуклеофильный катализатор

Внутри активного центра рядом могут находиться сразу несколько групп – потенциальных кислотно-основных/нуклеофильных катализаторов, и все они могут участвовать в катализическом процессе. Например, если в ферменте есть два нуклеофильных центра, может реализоваться следующий процесс (Схема 8.9).

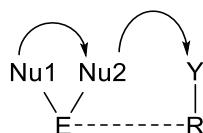


Схема 8.9. Эстафетная передача заряда.

Это – **механизм эстафетной передачи заряда**. Реализуется в сериновых протеазах – как раз в каталитической триаде. В активном центре может также одновременно находиться электрофил и нуклеофил, совместно действующие на субстрат (Схема 8.10).

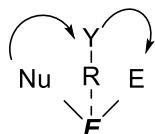


Схема 8.10. Пушпульный механизм.

Такая ситуация наблюдается в активном центре карбоксипептидазы А. Этот механизм описан в 1952 году и был назван **пушпульным механизмом** (англ. push-pull).

Одновременное наличие и действие многих групп на субстрат сопряжено с некоторыми проблемами. Во-первых, при таком количестве участвующих групп образуется сложное переходное состояние, состоящее из многих атомов, что энтропийно невыгодно. Во-вторых, очень мала вероятность того, что положение всех этих групп в свободном ферменте будет идеально соответствовать своему потенциальному положению в переходном состоянии. Все это очень сложно воспроизвести с низкомолекулярными катализаторами.

Гидролиз соединения а (Рисунок 8.1) в водной среде происходит крайне медленно, даже в щелочной среде. Однако введение в систему иона металла, например, цинка (Рисунок 8.1, б) приводит к ускорению реакции гидролиза почти в миллиард раз.

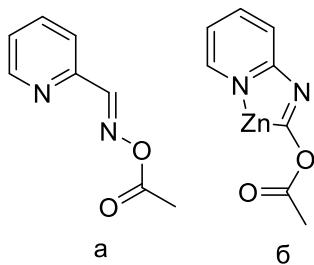


Рисунок 8.1. Структурные аналоги со значительной разности в скорости гидролиза.

В рамках этой катализитической системы симбатно действуют три фактора. Во-первых, у цинка всегда есть какой-нибудь лиганд и гидроксид-анион координационной сфере (из воды). Соответственно, реакция гидролиза переводится во внутримолекулярный режим (Рисунок 8.2).

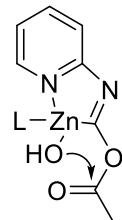


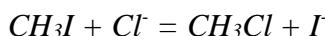
Рисунок 8.2. Атака гидроксид-аниона координационной сферы металла по гидролизуемой связи.

Образуется жесткая конструкция, в которой гидроксильный лиганд расположен в идеальном положении относительно атакуемого карбонильного атома углерода. Значит, отсутствуют серьезные энтропийные потери. Во-вторых, координация с ионами металлов приводит к увеличению кислотности воды на 6-8 порядков, соответственно,

эффективная концентрация гидроксид ионов тоже увеличивается на 6-8 порядков. Нуклеофильность гидроксид-иона снижается лишь на один порядок при этом. Другими словами, *при координации металлов происходит генерация сильного нуклеофила*. Наконец, при координации с цинком улучшается уходящая группа (комплекс оксима с цинком).

Таким образом, в ферментах не так много функциональных групп, которые могут выступать в качестве катализаторов, да и с точки зрения классического органического синтеза эти группы не очень эффективные катализаторы. Однако, за счет таких эффектов, как одновременное действие нескольких функциональных групп и внутримолекулярный режим реакции, каталитические эффекты от этих групп очень высоки.

Эффект микросреды в белках. Эффективность нуклеофила очень сильно зависит от степени его сольватации. Пример – реакция Финкельштейна:



Скорость этой реакции очень сильно зависит от растворителя (Таблица 8.1.).

Таблица 8.1. Скорости реакции Финкельштейна в разных растворителях.

Растворитель	$k_2 (M^{-1}s^{-1})$
Вода	$3 \cdot 10^{-6}$
Метанол	$3 \cdot 10^{-6}$
Формамид	$5 \cdot 10^{-5}$
Метилформамид	$2 \cdot 10^{-4}$
ДМФА	2.5
Диметилацетамид	8

С понижением сольватирующей способности растворителя скорость реакции существенно возрастает.

Сравним две реакции гидролиза (по $S_{N}1$ механизму, медленная стадия – образование карбокатиона), см. Схему 8.12.

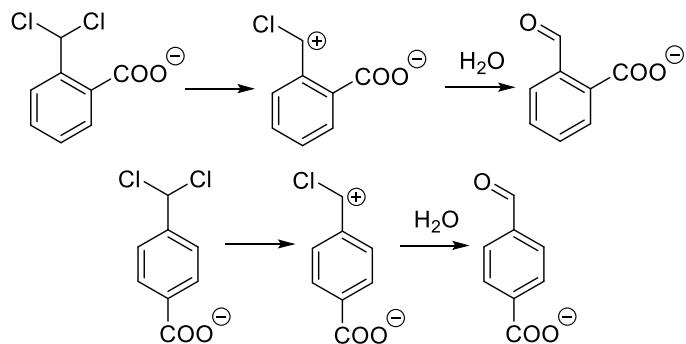


Схема 8.11. Гидролиз орто- и параизомеров.

Первая реакция протекает гораздо быстрее второй, так промежуточный карбокатион стабилизируется зарядом карбоксильной группы, расположенной в орто-положении. Соотношение констант гидролиза орто- и пара- изомеров в воде $k_o/k_p = 10$, в смеси диоксан-вода 1:1 это соотношение серьезно возрастает: $k_o/k_p = 1000$, поскольку степень гидратации ионов снижается.

Отсутствие водной среды в активном центре фермента не только приводит к ускорению химических реакций, но также и к изменению физико-химических характеристик самих каталитических групп. Среди аминокислот, входящие в состав белков, довольно мало соединений, которые способны ионизироваться при физиологических значениях pH. Рассмотрим, как решается эта проблема в белках.

Так, значения рKa карбоксильной и гидроксильной (Таблица 8.2) группы может очень сильно изменяться. Если посмотреть на рKa глутамина и тирозина в карбоксипептидазе A, то заметим, что для остатка Glu происходит существенное возрастание рKa по сравнению со свободной глутаминовой кислотой, а для тирозина – снижение. Наконец, рKa имидазола, входящий в состав гистидина, тоже сильно зависит от системы. Два остатка гистидина в рибонуклеазе находятся рядом друг с другом, но их кислотность различается почти в три раза!

Таблица 8.2. рKa каталитических групп в разных системах.

Группа	Система	рKa
COOH	Глутаминовая кислота	4.2-4.5
	Glu-35 (лизоцим)	6.3
	Glu-270 (карбоксипептидаза А)	7.2
OH	Тирозин	9.7–10.1
	Tyr-248 (Карбоксипептидаза А)	7.9
Im	Гистидин	6.7-7
	His-67 (Карбоксипептидаза А)	9.1
	His-159 (Папаин)	4.2
	His-12 (Рибонуклеаза)	5.8
	His-119	6.2

Все это иллюстрирует, насколько тонка регулировка микросреды и насколько сильно микросреда может изменяться на очень малых расстояниях. Активный центр, таким образом, характеризуется ярко выраженной микрогетерогенностью.

Ограниченнное число реакционноспособных групп у ферментов-белков обеспечивает химическую инертность белков; в противном случае, белковая жизнь была бы невозможна.

Металлокомплексы в ферментах: общие сведения. У белков-ферментов нет функциональных групп, которые могли бы переносить электроны и позволяли бы белкам

участвовать в разнообразных окислительно-восстановительных процессах (например, дыхание). Это большая проблема, но для нее существует решение – **включение в белок кофакторов** (низкомолекулярные соединения и ионы металлов, работающие вместе с белками), а также **пострансляционная модификация**, которая приводит к появлению у ферментов небелковых фрагментов – **простетических групп**.

Очень часто встречается ситуация, когда комплексы металлов ковалентно связываются с ферментом, и далее такая конструкция работает как единое целое. Подобными комплексами являются гемы – комплексы железа с порфиринаами (гемоглобин, пероксидазы).

Значительное число биологических реакций протекает с участием оптически активных соединений, и поэтому при рассмотрении координационного окружения металлокомплексов в белках важно помнить, что в *тетраэдре отсутствует хиральная плоскость, а в плоскоквадратной геометрии она есть*. В связи с этим металлопорфириновые комплексы в гемах имеют плоскоквадратную геометрию, что позволяет организовать в ферментативной структуре хиральную плоскость. Порфириновые фрагменты встречаются, например, в хлорофилле (комплекс с магнием) и в витамине В12 (кобальт).

Металлокомплексы характеризуются различной устойчивостью: бывают очень устойчивые, либо не очень устойчивые, могут легко диссоциировать и проч. Это широко используется в ферментативном катализе: иногда для фермента требуется наличие очень устойчивого комплекса, который бы служил неизменяемым фрагментом активного центра; иногда требуется, чтобы комплексы были лабильны, например, чтобы комплекс иона с продуктом мог бы легко диссоциировать, не приводя к ингибированию фермента. Устойчивость комплексов определяется зарядом и размером иона металла (чем выше заряд и меньше радиус иона, тем устойчивее комплекс), а также жесткостью – устойчивы комплексы жестких металлов с жесткими лигандами, и мягких металлов с мягкими лигандами; жесткие металлы – щелочные, щелочноземельные и высокозаряженные алюминий, хром, кобальт, железо и т.д.; мягкие металлы – почти все тяжелые металлы, особенно платина, палладий, ртуть, серебро, медь,, а также железо, кобальт никель в степенях окисления +2; жесткие лиганда – вода, гидроксид-ион, хлорид, фосфат; мягкие лиганда – все лиганда, содержащие серу, иодид, фосфит, цианид, и др. *Кроме этого, на устойчивость комплекса оказывает влияние основность лиганда*, и в самом простом приближении можно считать, что константа устойчивости комплекса пропорциональна его рKa:

$$\lg K_f = a^* pK_a + b$$

Хелатирующие лиганда образуют более устойчивые комплексы. В частности, равновесие на Схеме 8.13 сильно сдвинуто вправо, в сторону образования этилендиаминного комплекса.

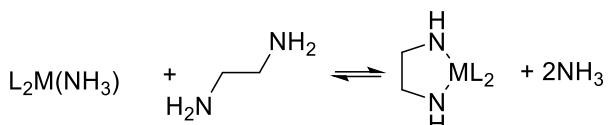


Схема 8.12. Образование комплекса металла с этидениамином.

Это связано с энтропийным выигрышем (было две молекулы, стало три), а также с энталпийным выигрышем, так как в комплексах всегда есть отталкивание разных лигандов, а в случае бидентатного лиганда говорить о нем не приходится.

Следует помнить о **макроциклическом эффекте**. **Макроциклы** – это циклические полидентатные лиганды, содержащие много донорных атомов (например, краунэфиры, порфирины). Рассмотрим суть макроциклического эффекта на конкретном примере (Рисунок 8.2).

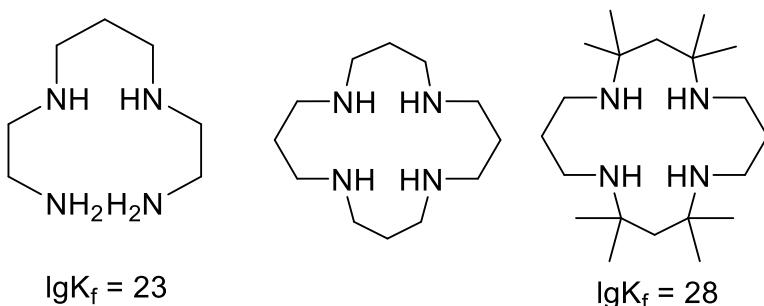


Рисунок 8.3. Макроцикли, на примере которых обсуждается макроциклический эффект (см. в тексте).

Будет ли первый лиганд образовывать прочные комплексы с ионами металлов? Да, конечно, у него большое значение константы комплексообразования, и он содержит 4 донорных атома, способных координировать металл, например, медь, образуя при этом плоскоквадратные комплексы (в тетраэдрической геометрии донорным атомам тяжелее расположиться). Однако при координировании затормозится вращение вокруг некоторых связей лиганда, и возникнут серьезные энтропийные потери. Однако, если синтезировать лиганд, в котором уже ограничено вращение вокруг связей (второй лиганд) либо практически подавлен (третий лиганд, за счет введения метильных групп), то прочность образуемых комплексов серьезно возрастет, поскольку энтропийные потери существенно уменьшаются. Отметим, что цинк будет координироваться в основном лишь первым лигандом, поскольку он позволяет реализовать более предпочтительную для цинка тетраэдрическую геометрию. Два остальных лиганда жестко фиксируют плоскоквадратную геометрию комплексов и будут преимущественно координировать медь. В принципе, с помощью этих лигандов можно разделять ионы меди и цинка. Кроме этого, специфичность связывания ионов лигандом можно регулировать, изменяя объем координирующей сферы.

Комплексообразование ионов металлов с белками. Потенциальные центры координации в белках, способные связывать ионы металлов – способные к ионизации боковые цепи аминокислот (CO – из пептидной связи, COOH, NH, NH₂, N), гетероатомы

боковых цепей серина, треонина, цистеина, метионина. Центров координации, таким образом, очень и очень много, и то, с какими донорными атомами будет происходить связывание, будет определяться конформацией белка, сродством металла к гетероатому и кислотностью среды pH. Металл может распределяться между несколькими связывающими центрами с различными величинами кислотности. Сравним связывание ионов Zn^{2+} и Cu^{2+} . Эти ионы предпочитают разную координационную геометрию; медь является мягким металлом, а цинк – скорее промежуточным, ближе к жестким металлам. Все это позволяет судить, как данный конкретный белок будет образовывать комплексы с различными ионами металлами. Благодаря этому открывается гигантское количество возможностей, чтобы под каждую химическую реакцию подобрать такую комбинацию белка с ионами металлов, которая бы оптимальным образом катализировала ее.

Таблица 8.3. Показатели, характеризующие связывание ионов меди и цинка с разными функциональными группами фермента.

Группа	pKa	lgKf (Cu^{2+})	lgKf (Zn^{2+})
α -COOH	3.3	-	-
β, γ -COOH	4.4	1.8	1.0
Имидазол	6.9	3.1-4.1	2.5
α -NH ₂	7.9	4.5-5.5	-
ϵ -NH ₂	10	4.3	2.6
-SH	9	7	-

Лекция 9. Рибонуклеазы. Лизоцим.

Рибонуклеазы – один из наиболее изучаемых ферментов XX века. Рибонуклеазы (или РНК деполимеразы) катализируют деградацию РНК.

Рибонуклеаза А, выделенная из панкреаса быка служит в качестве модельного фермента во многих исследованиях: изучение белковой структуры и функции, молекулярная эволюция, ферментативный катализ, сворачивание белков, химический синтез белка, ЯМР спектроскопия белков, олигомеризация белков. Столь широкий спектр исследований связан с тем, что для фермента характерна высокая стабильность, обусловленная тем, что он состоит из одной полипептидной цепи, содержащей четыре дисульфидных мостика, малый размер белка (13.7 кДа, 124 аминокислотных остатка, не содержит остатков триптофана, и, наконец, тем, что третичная структура белка полностью определяется его аминокислотной последовательностью.

Реакция гидролиза РНК рибонуклеазой характеризуется очень высокой скоростью. Этот фермент токсичен для клеток, и поэтому в цитозоле клеток содержится ингибитор, предохраняющий РНК от деградации. Этот ингибитор имеет белковую природу, его масса составляет 50 кДа. Он состоит из 16 субъединиц, и по форме напоминает подкову. Интересно, что ингибитор оказывается гораздо больше фермента по размеру, и при связывании он как бы обволакивает фермент. Аффинность ингибитора к рибонуклеазе – наиболее высокая из известных, константа диссоциации $K_d = 5.8 \cdot 10^{-14}$ М почти для всех типов рибонуклеаз. Наиболее важную роль для связывания с ингибитором играют Lys7, Gln11 и Lys41, входящие в состав фермента. Замена этих остатков на незаряженные приводит к отсутствию связывания фермента с ингибитором.

Исследования рибонуклеазы А были удостоены нескольких Нобелевских премий:

- 1972 год – за исследования фолдинга и стабильности, Кристиан Анфинсен (экспериментально доказал, что третичная структура определяется аминокислотной последовательностью, сначала денатурировав рибонуклеазу, а затем убрав денатурирующую среду и восстановив структуру и активность фермента);
- 1972 год – за исследования структуры панкреатической рибонуклеазы и деоксирибонуклеазы, Стейн и Мур (фактически они разработали современную методологию определения первичной структуры белков);
- 1984 год – за твердофазный синтез с использованием рибонуклеазы А, Меррифилд (провел полный химический синтез фермента).

Рибонуклеаза А – это первый фермент и третий белок с корректно определенной аминокислотной последовательностью; третий фермент и четвертый белок, для которого проведено определение третичной структуры с помощью рентгеноструктурного анализа. Кроме этого, с помощью рибонуклеазы А были развиты методы ЯМР и ИК спектроскопии для определения структуры и путей сворачивания белка.

В 1958 году Ф. Ричардс показал, что в определенных условиях субтилизин расщепляет в рибонуклеазе А пептидную связь Ala20 – Ser21, образуя S-пептид (остатки 1-20) и S-белок (остатки 21-124), в изолированном друг от друга состоянии они неактивны. Однако при смешении этих фрагментов между ними возникают нековалентные взаимодействия, и образуется рибонуклеаза S, которая демонстрирует почти *полную катализическую активность нативного фермента*.

Строение рибонуклеазы. Аминокислотные остатки активного центра были определены еще до проведения сайт-направленного мутагенеза и установления кристаллической структуры фермента. На основе pH-зависимости величины k_{cat}/K_m нашли значения рKa свободного фермента: 5.2 (основание) и 6.8 (кислота). Из pH зависимости величины k_{cat} нашли значения рKa для фермент-субстратного комплекса, которые отличаются от свободного фермента: 6.3 и 8.1. Из этого предположили, что в активном центре содержится гистидин, и стали проводить специфические реакции на гистидин, в частности, взаимодействие с иодацетатом при pH 5.5 (при данном pH ацилируется в основном только гистидин), и показали, что после этого происходит полная потеря каталитической активности, причем оказалось, что на 1 моль белка приходится 1 моль карбоксиметилированных групп, то есть не оба остатка одновременно ацилируются. Потом установили, что преимущественно ацилируется His119, а не His12.

Один из атомов азота (пиридинового типа) имидазольного колца гистидина-119 находится на расстоянии, равной длине водородной связи, от уходящей на первой стадии группы (РНК-ОН), а атом азота (пиррольного типа) имидазольного колца гистидина-12 расположен на расстоянии, равном длине водородной связи, от 2'ОН группы рибозы пиримидинового основания. Боковые группы Lys7, Lys41 и Lys66 в фермент-субстратном комплексе расположены рядом с фосфатной группой РНК. Активный центр фермента расположен в небольшом углублении молекулы белка, имеющей форму почки (Рисунок 9.1).

Подсайты активного центра важны для связывания одноцепочечной РНК. Они содержат *много положительно заряженных остатков* (Lys7, Arg10, Arg39, Lys41, Lys66), которые образуют связь с *отрицательно заряженной фосфатной группой в РНК*. Остатки лизина необходимы для катализа, при их ацилировании фермент теряет активность, и они консервативны во всех двадцати рибонуклеазах этого класса, для которых установлена первичная структура. Лизин-41 непосредственно взаимодействует с фосфатом, и как полагают, стабилизирует переходное состояние. Лизин-7 и лизин-66, предположительно нужны для стабилизации отрицательного заряда фосфатной группы субстрата.

Аналогом переходного состояния комплекса рибонуклеазы А с пятикоординированным атомом фосфора служит уридинванадат (Рисунок 9.2).

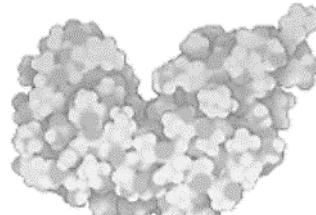


Рисунок 9.1.
Рибонуклеаза.

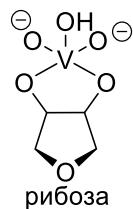


Рисунок 9.2. Уридинванадат.

Квантовохимические расчеты показывают, что гистидин-12 также участвует в стабилизации переходного состояния.

Специфичность рибонуклеаз. Рибонуклеаза А специфична к пиримидинам (урацил и цитозин), с пуринами она не будет работать, поскольку более крупное *пуриновое основание не поместится в активный центр фермента*. Пурин-специфичными являются некоторые микробные рибонуклеазы – рибонуклеаза Т₁ (из *Aspergillus oryzae*, EC 3.1.27.3, гуанин), барназа (из *Bacillus amyloliquefaciens*, EC 3.1.27.-). Они имеют меньший размер, и вместо одного гистидина содержат остаток глутаминовой кислоты.

Активный центр рибонуклеазы А, хотя не специфичный, но имеет некоторую специфичность к центрам РНК. Тирозин-45 образует водородную связь с пиримидином оси (стерически не может связать пурины на 5' цепи) и значительно снижает скорость гидролиза полимерных пуринов – в 1000 раз по сравнению с пиримидином.

Другие консервативные в эволюции рибонуклеаз остатки – это тирозин-45 и серин-123. Остаток тирозина ответственен за специфичность фермента к пиримидинам. Гидроксильная группа тирозина-45 и его NH-группа образуют две водородные связи с урацилом или цитозином (Рисунок 9.3).

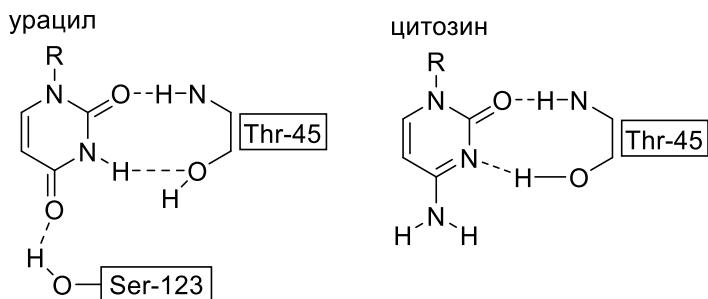


Рисунок 9.3. Образование водородных связей тирозина-45 с пиримидиновыми основаниями.

Механизм действия рибонуклеазы. Уравнение реакции, катализируемой рибонуклеазой А, показано на Схеме 9.1.

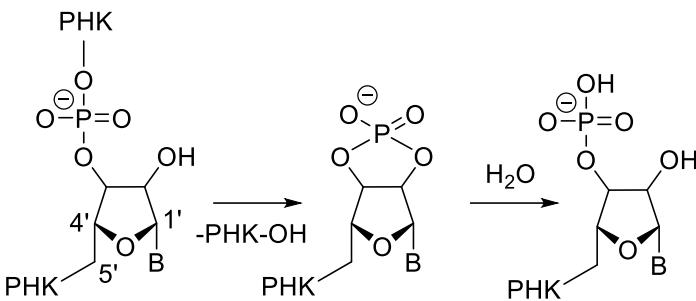


Схема 9.1. Гидролиз РНК в присутствии рибонуклеазы А.

На первой (быстрой) стадии гидролиза образуется 2',3'-циклический фосфат. На второй происходит гидролиз этого промежуточного соединения с образованием 3'-фосфата гидролизованной РНК. Гидролиз протекает в результате согласованного действия двух остатков гистидина (12 и 119), осуществляющих общий кислотно-основный катализ.

Предполагаемый механизм действия рибонуклеазы представлен ниже (Схема 9.2).

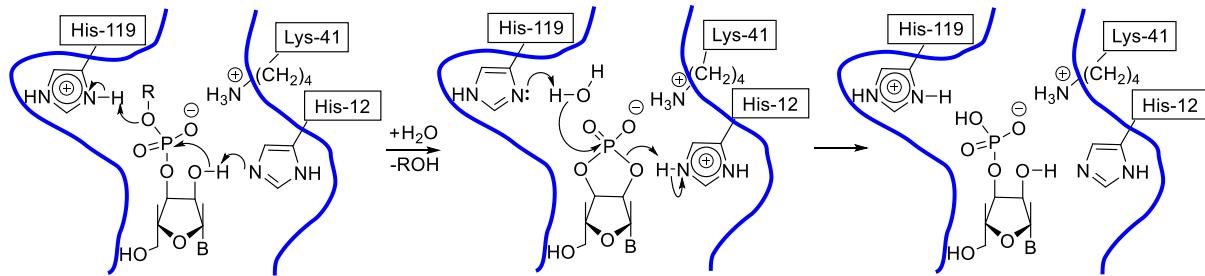


Схема 9.2. Механизм действия рибонуклеазы.

На первой стадии субстрат связывается в активном центре фермента. Затем гистидин-12 действует как основание, акцептирующее протон от 2'-ОН группы рибозы, а гистидин-119 работает как кислота, отдающая протон атому кислорода фосфата, образуется сначала промежуточный комплекс, а затем циклический фосфат. На место ушедшего продукта (ROH) поступает молекула воды, которая отдает протон гистидину-119, и гидроксид-ион – фосфату, одновременно с этим протон от гистидина-12 переходит к кислородному атому рибозы. Образуется второй продукт гидролиза РНК, а фермент возвращается в исходное состояние.

Активный центр барназы аналогичен таковому для рибонуклеазы A, отличаются номера каталитически активных остатков – Lys27 вместо Lys41, His 102 вместо His119 (протонирует уходящую группу), Glu73 (общее основание на стадии циклизации) вместо His12. Замены активных остатков в барназе приводили к снижению активности фермента: Lys27Ala приводит к снижению активности в 70 раз, His102Ala полностью исключает активность, Glu73Ala – снижает активность в 500 раз.

Лизоцим: общие сведения. Лизоцим катализирует реакцию гидролиза полисахаридного остава клеточной стенки бактерий. Лизоцим был открыт Флемингом в 1923 году.

Лизоцим относится к подподклассу гликозидаз – ферментов, гидролизующих О-гликозидные связи. В состав активного центра гликозидаз входят один или два остатка глутаминовой или аспарагиновой кислоты. Известны металл-содержащие гликозидазы (α -амилаза млекопитающих, изомальтаза из *Psuedomonas amyloferamosa*). Гликозидазы встречаются у животных, растений, дрожжей, бактерий и грибов. Гены гликозидаз содержатся в геноме бактериофагов. К гликозидазам относятся целлюлазы грибов и бактерий – ферменты, гидролизующие β -1,4-гликозидные связи целлюлозы. Существует две группы целлюлаз: эндоглюконазы (EC 3.2.1.4) и целлобиогидролазы (EC 3.2.1.91). Ферменты, гидролизующие другой полисахарид – хитин, также относятся к гликозидам и называются хитиназы (EC 3.2.1.14).

Гликозидазы млекопитающих участвуют в гидролизе еще одного полисахарида – крахмала. α -амилаза (слюнная и панкреатическая; EC 3.2.1.1) расщепляет α -1,4-гликозидные связи и гидролизует α -1,6-гликозидные связи крахмала. Конечный гидролиз ди- и олигосахаридов до моносахаридов происходит гликозидазами, локализованными на эпителиальных клетках тонкого кишечника. К этим ферментам относятся экзо-1,4- α -глюкозидаза (глюкоамилаза, EC 3.2.1.3), олиго-1,6-глюкозидаза (изомальтаза, EC 3.2.1.10), α -глюкозидаза (мальтаза, EC 3.2.1.20), сахароза- α -глюкозидаза (сахараза, EC 3.2.1.48), β -глюкозидаза (EC 3.2.1.21), β -галактозидаза (EC 3.2.1.23), α,α -трегалаза (EC 3.2.1.28), α -амилаза (EC 3.2.1.1) и другие. Классическим ферментом для изучения особенностей катализа гликозидаз является лизоцим (EC 3.2.1.17). Лизоцим обнаружен в различных тканях животных, яичном белке птиц, гены лизоцима существуют у бактериофагов T4 и λ . У человека лизоцим функционирует в слезной и слюнной жидкостях, а также в крови. *Лизоцим действует как антибактериальный агент, катализируя гидролиз полисахарида, входящего в состав клеточных стенок грамположительных бактерий.* Два сахара, которые составляют данный полисахарид – N-ацетилглюказамин (NAG) и N-ацетилмурамовая кислота (NAM) (Рисунок 9.4).

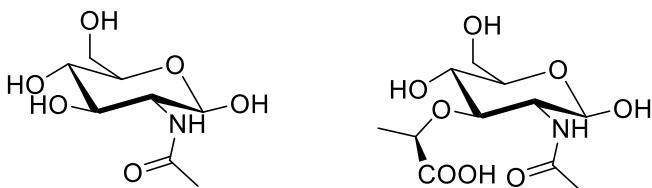


Рисунок 9.4. N-ацетилглюказамин (слева) и N-ацетилмурамовая кислота (справа).

Связь, которую разрывает лизоцим, показана на Рисунке 9.5.

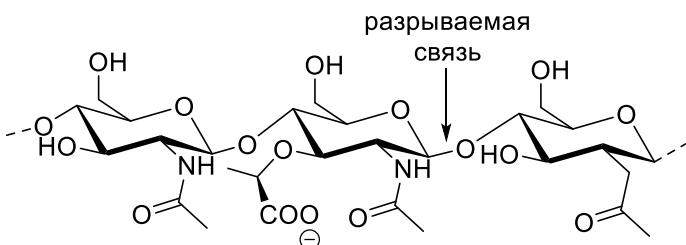


Рисунок 9.5. Связь субстрата, атакуемая в реакции с лизоцимом.

Лизоцим является маленьким белком, состоящим из одной полипептидной цепи и 129 аминокислотных остатков, масса 14.3 кДа. В структуре содержится четыре дисульфидных мостика. Этот фермент стал первым, для которого была установлена трехмерная структура методом рентгеноструктурного анализа в 1965 году Филлипсом.

Каталитически активными являются два остатка – Glu-35 и Asp-52. Остаток глутаминовой кислоты-35 окружена неполярными остатками (серин-36, изолейцин-55, лейцин-56, глутамин-57, триптофан-108, аланин-110), и в pH-оптимуме фермента (pH 5.0) его карбоксильная группа незаряжена. Карбоксильная группа аспарагиновой кислоты-52 участвует в системе водородных связей между остатками треонина-43, аспарагина-44 и 46, аспарагиновой кислоты-48, серина-50, треонина-51 и аспарагина-59. Это окружение очень полярное, поэтому карбоксильная группа Asp-52 функционирует в ионизированном состоянии. pKa карбоксильных групп Glu-35 и Asp-52, измеренные с помощью двумерного ¹H ЯМР, составляют 6.2 и 3.7. Сайт-направленный мутагенез этих остатков приводит к потере каталитической активности лизоцима.

Как располагается субстрат-полисахарид внутри фермента? Во-первых, это *многоточечное взаимодействие*. Фермент имеет форму вытянутого эллипсоида, и в середине молекулы имеется бороздка (щель), где связывается олигосахарид и

происходит его расщепление. Стенки бороздки сформированы в основном боковыми цепями неполярных аминокислот, обеспечивающих связывание неполярных частей субстрата, и боковыми цепями полярных аминокислот, способных образовывать водородные связи с ациламинными и гидроксильными группами субстрата. Оптимальная активность фермента наблюдается, если в щель помещен гексасахарид, например, фрагмент молекулы пептидогликана или хитина. У фермента есть несколько подцентров (Рисунок 9.6), и разрыв связи происходит между подцентрами D и E.

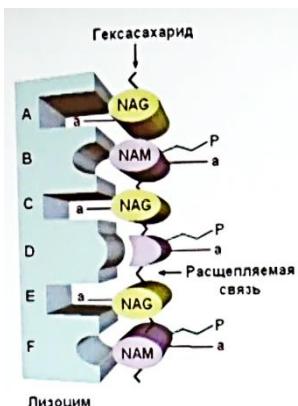


Рисунок 9.6. Связывание субстрата с активным центром лизоцима.

Как связываются более короткие олигосахариды? Они могут выступать в качестве ингибиторов (так как могут связываться не на тех подцентрах). Может происходить непродуктивное связывание, и гидролиза не будет происходить. Для субстратов,

состоящих из 6 и более остатков скорость гидролиза остается максимальной и почти не зависит от размера субстрата (Таблица 9.1).

Таблица 9.1. Скорость гидролиза разных олигосахаридов лизоцимом.

Субстрат	Относительная скорость гидролиза
NAG ₂	0
NAG ₃	1
NAG ₄	8
NAG ₅	4000
NAG ₆	30000
NAG ₈	30000

Остаток Trp-62 играет важную роль во взаимодействии с ингибитором и субстратом. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, помимо водородной связи с C-6 OH-группой сахара в подцентре C, этот остаток образует обширный ван-дер-ваальсов контакт с неполярной поверхностью сахара в позиции В. Именно триптофан в позиции 62 оптимален с точки зрения пространственной конформации субстрат-связывающего центра: любая аминокислотная замена этого остатка приводит к небольшим изменениям конформации субстрат-связывающего центра и к существенному ухудшению связывания субстратов. Так, замена этого остатка на неароматические незаряженные аминокислоты лейцин, изолейцин, валин, аланин, глицин уменьшает константы связывания ингибитора NAG₃ на порядок. Замена на тирозин и фенилаланин тоже приводит к уменьшению константы ассоциации.

На всех подцентрах фермента, кроме подцентра D, происходит связывание субстрата, о чем свидетельствуют отрицательные значения энергии взаимодействия. Но на подцентре D не просто не происходит связывания, а возникает разупорядочение. И здесь мы можем говорить о том, что в случае лизоцима реализуется механизм напряжений – в самом ферменте практически не происходит изменений, зато в субстрате происходят существенные конформационные изменения в ходе катализа. При связывании некоторых ингибитором лизоцимом белка куриного яйца или лизоцимом T4 происходит изменение конформации пиранозного кольца NAM (или NAG) в подцентре D из ненапряженной конформации кресла в напряженную – полукресло.

Изменение конформации субстрата при связывании связано с тем, что в процессе катализа образуется, как полагают, интермедиат – **оксокарбоний-ион**, который тоже имеет конформацию полукресла. Экспериментально этот интермедиат не зафиксирован, и данные о его существовании несколько противоречивы. Согласно теоретическим расчетам, он является энергетически более выгодным интермедиатом, чем интермедиат с ковалентной связью. Согласно данным рентгеноструктурного анализа для комплекса лизоцима с трисахарид-лактоном, между карбонильным атомом лактона и

карбоксильной группой Asp-52 образуется дополнительная водородная связь, влияющая на увеличение константы связывания. Расчеты показывают, что за счёт электростатической стабилизации оксокарбоний-иона энергия активации реакции понижается на 8 ккал/моль. Были получены аналоги переходного состояния, и показано, что они связываются с ферментом в активном центре в 3600 раз лучше, чем NAG₄, который находится в конформации кресло (Рисунок 9.7).

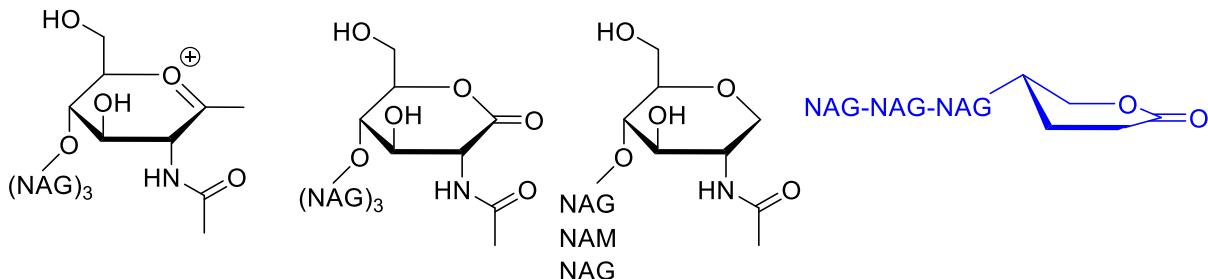


Рисунок 9.7. Синтетические аналоги оксокарбоний-иона.

Все гликозидазы делятся на две большие группы. В первую группу входят ферменты, которые гидролизуют гликозидную связь с обращением конфигурации атома углерода (Схема 9.3). В этом случае неионизированная карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислоты активного центра активирует субстрат путем переноса протона и создает дефицит электронной плотности на углеродном атоме расщепляемой связи, а вторая ионизованная карбоксильная группа активирует молекулу воды, атакующую субстрат. Расстояние между карбоксильными группами у этих ферментов обычно составляет 7-13 Å, что достаточно для одновременного размещения между ними двух молекул – пиранозного кольца субстрата и воды. По этому механизму (S_N2) действуют многие целлюлазы, лизоцим бактериофага T4 и другие.

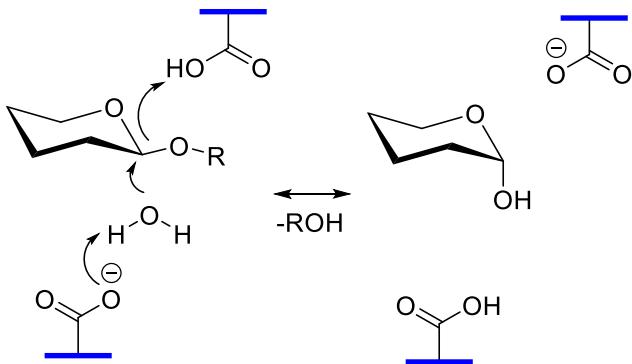


Схема 9.3. Механизм гидролиза гликозидной связи с обращением конфигурации атома углерода.

Вторая группа ферментов включает в себя ферменты, которые гидролизуют гликозидную связь с сохранением конфигурации атома углерода (Схема 9.4). В этом случае происходит нуклеофильная атака ионизированной карбоксильной группы на гликозидную связь, в результате чего образуется ковалентный интермедиат – гликозилфермент. Образование и гидролиз гликозилфермента происходит через

переходные состояния, подобные оксокарбоний-иону. Расстояние между карбоксильными группами у этих ферментов обычно составляет примерно 5-6 Å, то есть каталитический механизм диктуется локализацией функциональных групп активного центра. По такому механизму (двум последовательным стадиям S_N2) действуют хитиназы, lacZ β-галактозидаза *E.coli*, β-глюкозидаза A₃ *Aspergillus wentii* и др.

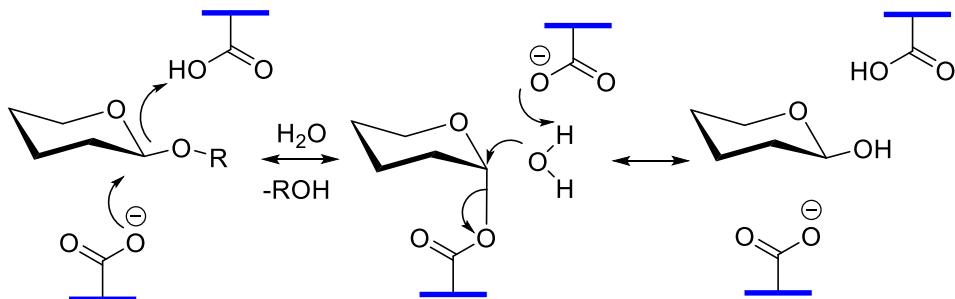


Схема 9.4. Механизм гидролиза гликозидной связи с сохранением конфигурации атома углерода.

Лизоцим белка куриного яйца гидролизует сахара с сохранением конфигурации углеродного атома гликозидной связи. Но реакция, как полагают, протекает по S_N1 механизму. То есть в реакции, катализируемой лизоцимом, не происходит образования ковалентного гликозилфермента, в качестве интермедиата обычно рассматривают оксокарбоний-ион. Механизм (Схема 9.5) был предложен Филлипсом, и протекает следующим образом. На первой стадии неионизованная карбоксильная группа Glu-35 выступает в роли донора протона, отдавая его гликозидному атому кислорода между атомом C1 сахара D и C4 сахара E (стадия общего кислотного катализа), что приводит к разрыву гликозидной связи. Затем остаток сахара D переходит в состояние оксокарбоний-иона и принимает конформацию полукресла. Отрицательный заряд карбоксильной группы Asp-52 стабилизирует положительный заряд оксокарбоний-иона. Дисахарид из подцентров D и E диффундирует из области активного центра.

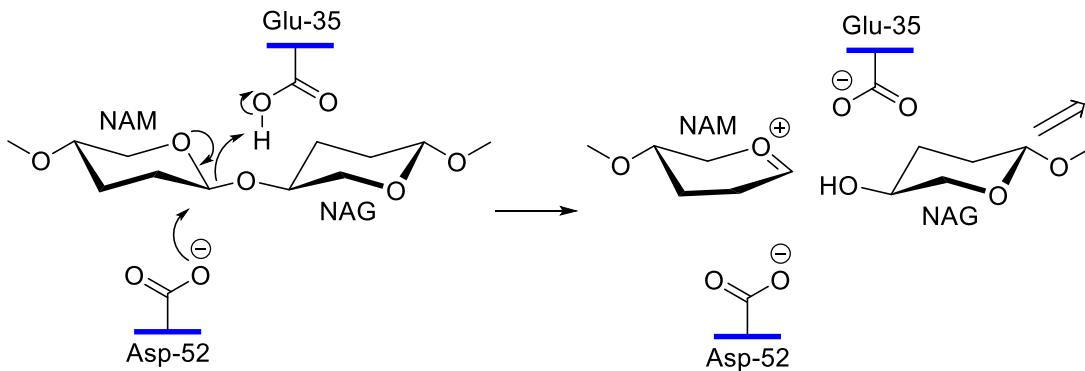


Схема 9.5 Первая стадия механизма Филлипса.

Далее в реакцию вступает молекула воды (Схема 9.6). Её протон переходит к карбоксильной группе Glu-35, гидроксильная группа – к атому C1 сахара D (стадия общего основного катализа). Тетрасахарид из подцентров D, C, B, A уходит из области активного центра, и фермент возвращается в исходное состояние.

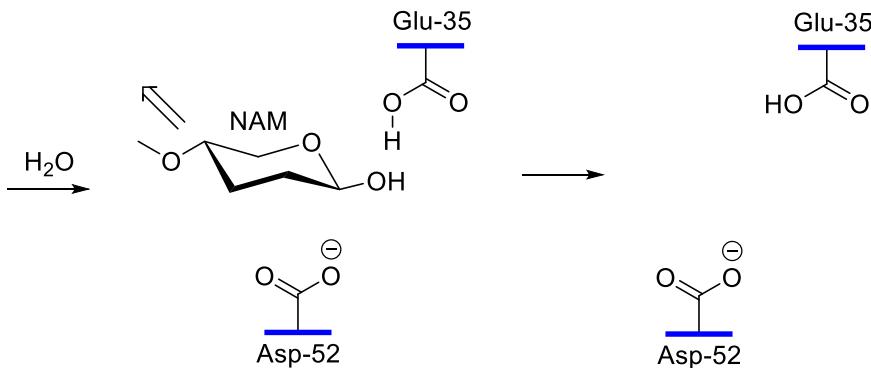


Схема 9.6. Вторая стадия механизма Филлипса.

В 2001 году была предложена альтернативная версия данного механизма, где в качестве интермедиата образуется гликозилфермент. Подробно механизм (Механизм Витерса) рассмотрен в работе *Nature Structural Biology*, **8**, 737-739 (2001).

Лекция 10. Неорганические элементы в составе ферментов.

Роль неорганических элементов в организме. Различные элементы должны поступать в организм ежедневно в разных количествах. Какие-то элементы требуются в больших количествах, как, например, калий, натрий, кальций, какие-то – в совсем малых дозах, сотые доли милиграмма, в частности, селен, фтор или иод. Дефицит этих элементов может приводить к серьезным нарушениям в работе организма и заболеваниям (Таблица 10.1).

Таблица 10.1. Последствия дефицита ряда элементов в организме.

Элемент	Последствия дефицита в организме
Ca	Замедленный рост скелета
Mg	Мышечные спазмы
Fe	Анемия, иммунные расстройства
Zn	Задержка роста и созревания, повреждение кожи
Cu	Заболевания печени, вторичная анемия
Mn	Бесплодие, нарушение роста скелета
Mo	Замедленный рост клеток
Co	Злокачественная анемия
Ni	Подавленный рост, дерматит
Cr	Симптомы диабета
Si	Нарушения роста скелета
F	Стоматологические расстройства
I	Заболевания щитовидной железы
Se	Сердечная мышечная слабость
As	Нарушения роста (у животных)

Неорганические ионы входят в состав многих ферментов. Например, пероксидаза содержит ионы железа (3+) и кальция, карбоангидраза и алкогольдегидрогеназа содержат ион цинка, тирозиназа и лакказа содержат ионы меди, гексокиназа и глюкозо-б-фосфатаза – магний, в состав аргиназы входит марганец(+2), в состав пируваткиназы – калий, а глутатионпероксидаза содержит селен. Глутатионпероксидаза осуществляет окислительно-восстановительную защиту организма и катализирует реакцию трансформации пероксида водорода (Схема 10.1).

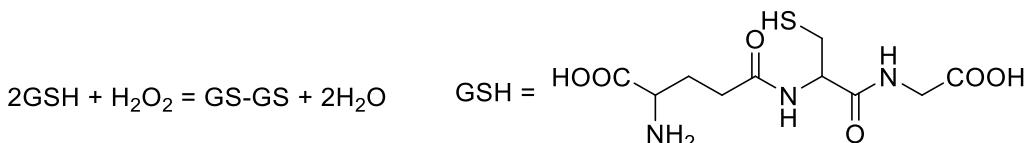
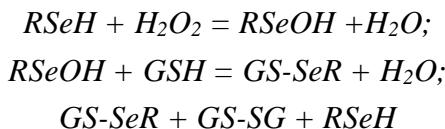


Схема 10.1. Реакция, катализируемая глутатионпероксидазой.

В активном центре фермента содержится селен, непосредственно взаимодействующий с пероксидом:



Глутатионпероксидаза – единственный известный фермент, содержащий селен.

Биологическая роль металлов очень велика. Можно выделить следующие роли:

1. Структурная (биоминерализация) – Ca, Mg
2. Нейтрализация заряда – Mg²⁺ и Ca²⁺ нейтрализуют заряд ДНК;
3. Переносчики заряда – Na⁺, K⁺, Ca²⁺, создают трансмембранные концентрационные градиенты (ионные каналы), участвуют в передаче электрических импульсов в нервах и др.
4. Гидролитические катализаторы – Zn²⁺ и Mg²⁺
5. Окислительно-восстановительные катализаторы, Cu(I)/Cu(II), Fe(II)/Fe(III)/Fe(IV), Co(I)/Co(II)/Co(III) и проч., участвуют в переносе протона.
6. Активаторы малых молекул – Fe (перенос кислорода); Mo, Fe, V (фиксация азота); Ni, Fe (восстановление углекислого газа).
7. Металлоорганические трансформации – кобаламины, коэнзимы, аконитаза и др.

Часто бывает так, что в состав фермента входит несколько ионов металла, при этом часть из них выполняет каталитическую, а другая – структурную функцию, например, как в пероксидазе: ион железа непосредственно участвует в катализе, а кальций (два иона) необходим для поддержания структуры белка; другой пример – супероксиддисмутаза, где ион меди +2 участвует в катализе, а цинк выполняет структурную роль.

Некоторые ферменты активируются ионами металлов, например, ион марганца активирует изоцитратдегидрогеназу. Другие ферменты требуют присутствия ионов металлов для проявления полной каталитической активности. **Металлы играют разную роль в катализе ферментами:**

1. Положительный заряд иона может стабилизировать переходное состояние за счет электростатических взаимодействий;
2. Участие в ковалентном катализе (электрофил, нуклеофил);
3. Способствование взаимодействию фермента и субстрата путем координации связей (возможно вызывают напряжение связей в субстрате в ходе процесса);
4. Удержание реагирующих групп в требуемой трехмерной ориентации;
5. Стабилизация каталитически активной конформации фермента. Тройные комплексы с металлами могут быть мостиковыми: M-E-S, E-S-M, E-M-S.

Металлоферменты часто содержат прочно связанные ионы металла (железо, медь, цинк или марганец), а металл-активируемые ферменты могут содержать слабо связанные и легко удаляемые ионы (натрий, калий, магний, кальций).

Роль цинка(II) в белках достаточно разнообразна. Например, он может выполнять катализическую функцию, будучи непосредственно вовлеченным в каталитические стадии, как в карбоангидразе. Может играть также и структурную роль, поддерживая стабильность белковой структуры или активного центра (супероксиддисмутаза). Наконец, цинк может играть регуляторную роль, т.е. когда добавление ионов цинка приводит к повышению или наоборот, ингибированию активности (семейство белков цинковые пальцы). Цинковые пальцы – тип белковой структуры, стабилизированный одним или двумя ионами цинка, связанными координационными связями с аминокислотными остатками белка. Они являются белковыми модулями, взаимодействующими с ДНК, РНК, другими белками или небольшими молекулами. Основными группами белков с цинковыми пальцами являются ДНК-связывающие факторы транскрипции, а также искусственные ферменты рестрикции, получаемы слиянием ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-разрезающим доменом нуклеазы.

Ион цинка может находиться в разном геометрическом окружении: тетраэдрическом, тригональнобипирамидальном или октаэдрическом. Диаграммы расщепления d-орбиталей цинка зависят от геометрии комплекса (Рисунок 10.1.)

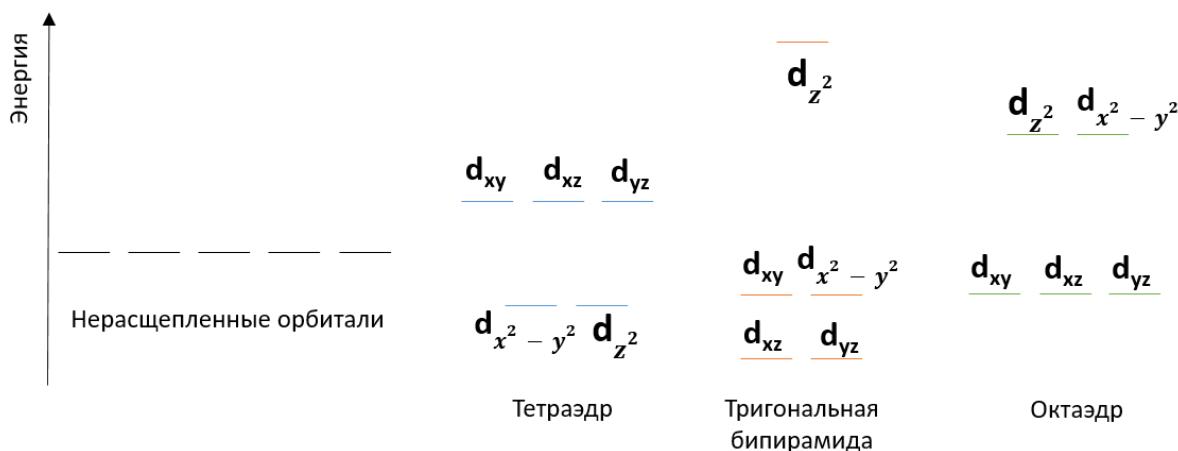


Рисунок 10.1. Расщепление d-орбиталей.

Все эти типы геометрии встречаются в разных белках.

Карбоангидраза. У людей существует не менее 13 разных карбоангидраз. Эти ферменты участвуют в различных биологических процессах, в том числе дыхании, кальцификации, поддержании кислотно-щелочного баланса, резорбции костей, формировании внутрглазной и спинномозговой жидкостей, слюны и желудочной кислоты. Карбоангидразы катализируют реакцию взаимодействия углекислого газа с водой и относятся к классу лиаз:



Карбоангидраза (EC 4.2.1.1) содержит от 0.31 до 0.34% цинка (*это первая известная биологическая функция цинка*). Интересно, что при удалении цинка активность фермента исчезает, но третичная структура сохраняется. При возвращении цинка активность восстанавливается; можно поместить и другие ионы (например, кобальт), и активность также будет наблюдаться, но не в полной мере.

Фермент локализован в красных клетках крови (эритроцитах), а также клетках слизистой оболочки желудка, коре надпочечников, почек, и в незначительных количествах – в центральной нервной системе, поджелудочной железе и других органах. Роль карбоангидразы в организме связана с поддержанием кислотно-щелочного равновесия, транспортом углекислого газа, образованием соляной кислоты в желудке. Активность фермента в крови в норме постоянна, но при некоторых патологических состояниях она резко меняется. Повышение активности фермента в крови происходит при анемиях различного генеза, нарушениях кровообращение II-III степени, некоторых заболеваниях легких (бронхэкстазах, пневмосклерозе), а также при беременности. Снижение активности происходит при ацидозе почечного генеза, гипертриеозе.

В тканях, где содержание CO₂ велико, реакция гидратации углекислого газа при участии карбоангидразы идет в сторону образования угольной кислоты. В легких это соединение распадается, будучи нестабильным, т.е. реакция протекает в обратную сторону. Угольная кислота распадается в 2000 раз медленнее, чем это нужно для отдачи углекислого газа кровью, быстро проносящейся мимо альвеол. Ускорению этого процесса отдачи способствует карбоангидраза.

Молярная масса карбоангидразы составляет примерно 30 кДа, фермент состоит из 260 аминокислот, представляет собой мономер, по форме напоминает мяч для регби с глубокой конической расщелиной (16 Å), на дне которой расположен ион цинка с окружающими его лигандами His94, His96, His119, координация цинка – тригональная бипирамидальная, дополнена водородной связью с молекулой растворителя (вода при pH 4.8 или ацетат при кристаллизации при низком pH). В комплексе цинк образует связь с атомом кислорода, а также водородные связи с молекулой воды и с боковой аминогруппой треонина-119 (имитирует связывание бикарбоната). Консервативный остаток вокруг активного центра, играющий важную роль для переноса протона из активного центра (скоростьлимитирующая стадия ферментативной реакции) – гистидин-64.

Роль цинка в катализе карбоангидразой заключается в том, что цинк генерирует гидроксид-ион из молекулы воды, которая является четвертым лигандом (из-за чего рРа_в воды смещается с 15.7 до 7), а также стабилизирует интермедиаты (Схема 10.2). На первой стадии происходит депротонирование, затем карбоксилирование, когда анионный атом кислорода атакует атом углерода в молекуле углекислого газа. Затем образуется циклическая структура, из которой на последней стадии образуется бикарбонат. Добавление воды замещает бикарбонат.

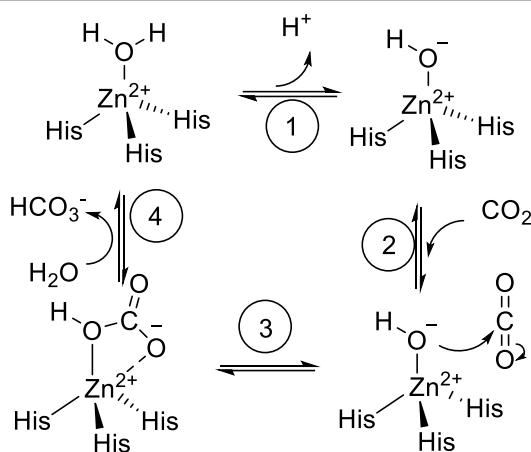


Схема 10.2. Участие цинка в каталитическом процессе карбоангидразы.

Остатки треонина199 и треонина200 вместе со своими боковыми цепями образуют гидрофильную область в активном центре карбоангидразы. Это необходимо для поддержания энергетического баланса связанного лиганда. Позади в полости активного центра образована гидрофобная область остатками валина143, лейцина198 и триптофана209.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, в каталитическом кармане фермента существует сетка из 5 молекул воды (Рисунок 10.2). Полагают, что связанная молекула воды образует водородную связь с OH-группой треонина199, которая связана водородной связью с карбоксильной группой остатка Glu-106. Передача протона и снятие гидроксила – синхронный процесс. Гидроксильная группа – пятый лиганд и не вытесняет воду или OH⁻.

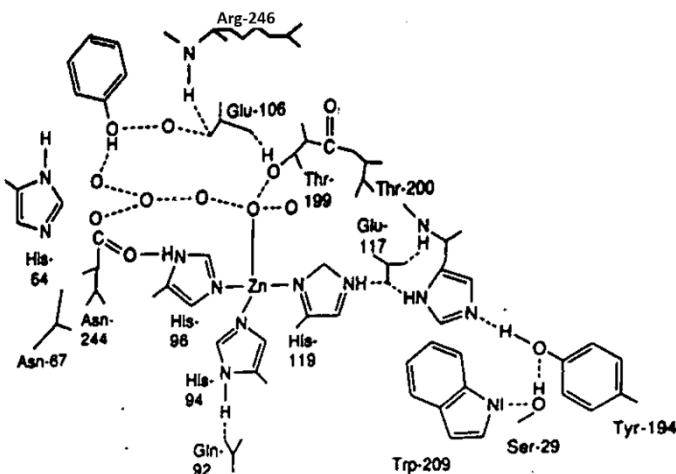


Рисунок 10.2. Строение активного центра карбоангидразы. Показана сетка из молекул воды, атомы водорода опущены для упрощения.

Ингибиторы карбоангидразы. Карбоангидраза может быть ингибирована ароматическими сульфанамидами, например, ацетазоламидом (Рисунок 10.3).

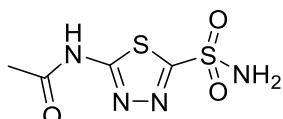


Рисунок 10.3. Ацетазоламид.

1 мкмоль этого соединения снижает на 85% активность карбоангидразы в фибробластподобных клетках почек зеленой обезьяны. Ионизированная сульфонамидная NH-группа координируется ионом цинка и образует водородную связь с треонином-199. Образуются дополнительные контакты – водородные связи между атомом азота основной цепи треонина-199 и атома кислорода сульфонамида, и между OH⁻-группой треонина-200 и атомом азота в 1,3,4-тиадиазолиновом кольце. Ингибиторы карбоангидразы быстро снижают внутриглазное давление и используются при лечении глаукомы.

Остаток гистидина-64 осуществляет перенос протона между каталитическим центром (связь между Zn и молекулой воды) и буфером. При низкой концентрации буфера стационарная скорость зависит от концентрации буфера (буферные молекулы забирают или отдают протон через одну или более молекул воды, действующих как мостик с группой H⁺ гистидина). При высоких концентрациях буфера высокая скорость гидратации молекулы CO₂ определяется внутримолекулярным переносом протона между связью Zn–молекула воды и гистидином-64. Гистидин-64 может поворачиваться на 180 градусов, что необходимо для передачи протона (Схема 10.3).

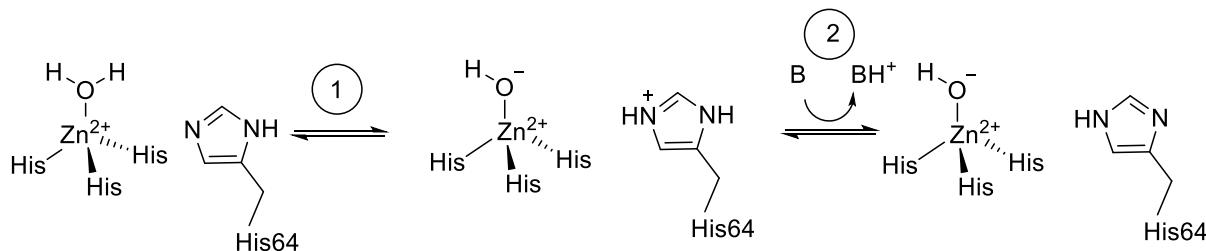
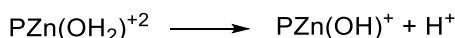


Схема 10.3. Роль гистидина в катализе карбоангидразой.

Активный центр фермента содержит 50 аминокислотных остатков, 25 из которых лежат на поверхности активного центра. Предполагают, что молекула CO₂ входит в активный центр через гидрофобную область, а HCO₃⁻ покидает его через гидрофильную область.

Для реакции гидратации CO₂ в присутствии карбоангидразой существует следующих парадокс. Константа равновесия реакции



составляет K_{eq} = k_f/k_r = 10⁻⁷ М, причем для обратной реакции, которая является диффузионно-контролируемой, k_r = 10¹¹ М⁻¹с⁻¹, следовательно, k_f = 10⁴ с⁻¹. Однако на практике k_f = 10⁶ с⁻¹ при pH = 7! Почему? Потому что на самом деле на диффузию протонов оказывает буфер, который акцептирует протон из цинк-связанной воды.

В работе *PNAS* 2009, 106 (26) 10609-10613 рассмотрено строение активного центра карбоангидразы II.

В случае карбоангидразы конформация свободного фермента почти не отличается от конформации фермента, связанного с CO₂ или бикарбонатом. При связывании субстрата основные изменения затрагивают положение ключевых молекул в активном центре.

Карбоксипептидазы. Металлопротеазы – ферменты, катализирующие реакцию гидролиза пептидной связи, активный центр которых содержит связанный ион металла, часто цинк, который активирует молекулу воды, которая действует как нуклеофил. Примерами служат термолизин (бактериальный фермент), карбоксипептидаза А (пищеварительный фермент).

Карбоксипептидаза А образуется из зимогена – прокарбоксипептидазы А, которая активируется трипсином при отщеплении 64 аминокислотных остатков с N-конца. В отличие от трипсина и химотрипсина, зимогены которых имеют несформированный активный центр, прокарбоксипептидаза А обладает довольно высокой активностью. Для сравнения, значения каталитической константы и константы Михаэлиса для гидролиза бензоил-глицин-L-фенилаланина в присутствии карбоксипептидазы А составляют 120 с⁻¹ и 1.9 ммоль, а в присутствии прокарбоксипептидазы А – 3 с⁻¹ и 2.7 ммоль, соответственно.

Карбоксипептидаза А – панкреатический фермент, обладает массой 34.5 кДа, содержит один ион Zn²⁺ и состоит из одной полипептидной цепи. Этот фермент является экзопептидазой, в отличие от химотрипсина, т.е. отщепляет аминокислотный остаток от C-конца, а не из середины цепочки. Активный центр расположен в небольшой выемке на поверхности фермента, которая ведет к глубокому карману, сформированному алифатическими и полярными боковыми цепями аминокислотных остатков. Ион цинка локализован в щели недалеко от поверхности белка, координирован с двумя остатками гистидина, одним остатком глутаминовой кислоты и 1 молекулой воды. Металл прочно связан с ферментом ($K_{дисс} = 4.7 \cdot 10^{-9}$ М при pH 8). Удаление металла (диализом против разбавленной кислоты или экстракцией 1,10-фенантролином при нейтральном pH) приводит к полной потере активности фермента с сохранением физико-химических свойств. При возвращении металла в активный центр активность полностью восстанавливается.

Связывание карбоксипептидазы А с субстратом приводит к существенным конформационным изменениям в ферменте (механизм индуцированного соответствия). Субстраты-дипептиды гидролизуются очень медленно, при этом происходит непродуктивное связывание. Продуктивное связывание реализуется только для субстратов длиной от пяти аминокислотных остатков.

Механизм катализа карбоксипептидазой. В активном центре фермента есть гидрофобный карман, где связываются неполярные остатки тирозина и фенилаланина (специфичность карбоксипептидазы А; у карбоксипептидазы В это лизин и аргинин).

Рядом с разрываемой пептидной связью образуется NH водородная связь с OH группой тирозина-248. Этот остаток уникален – при связывании субстрата он смещается на расстояние 12 Å в структуре. Карбонильный атом кислорода разрываемой пептидной связи координирован с ионом цинка. Концевая карбоксильная группа субстрата дополнительно фиксируется с помощью аргинина-145 посредством электростатических взаимодействий. При связывании пептидов-ингибиторов концевая аминогруппа пептида связана водородной связью через молекулу воды с Glu-270.

Чтобы связывание субстрата было продуктивным, задействуется как минимум 5 подцентров активного центра фермента. Боковые группы аргинина-145 и глутамата-270 при связывании смещаются на 2 Å, при этом молекула воды выходит из неполярного кармана, а PhOH группа остатка Тир-248 смещается на 12 Å. Эти структурные перестройки приводят к закрыванию кармана активного центра, вытеснению молекулы воды, и окружение становится более гидрофобным. Карбонильная группа пептидной связи координирована с ионом цинка, из-за чего она поляризуется. Ион цинка стабилизирует отрицательный заряд, появляющийся на атоме кислорода в ходе реакции.

Скорость расщепления зависит от строения субстрата, а именно от заместителей R и R' в субстрате –NH–CHR–CO–NH–CHR'–COO– (Таблица 10.2).

Таблица 10.2. Влияние структуры субстрата на эффективность ферментативной реакции.

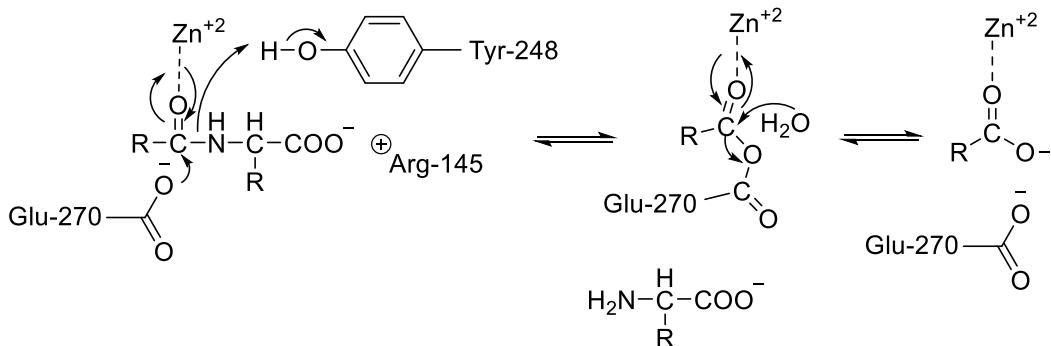
R	R'	k _{cat} , с ⁻¹	K _M , мМ
PhCH ₂ OCO	Phe	83	2
PhCO	Phe	100	1
H	Tyr	0.015	0.7
PhCH=CH	Phe	0.003	0.6
(Ala) ₃	CH ₃	100	80
(Gly) ₅	Tyr	17	3.5
Cbz-(Gly) ₂	Phe	131	0.172

Хорошая активность наблюдается, когда R' содержит фенильное кольцо. R не очень сильно влияет на активность. Простые амиды не расщепляются, только пептиды.

Модификация остатка Тир248 приводит к подавлению пептидазной активности и усилинию эстеразной активности. Замена металла с цинка на кадмий или ртуть приводит к подавлению пептидазной активности без изменения эстеразной.

Значение рKa фермента составляют 6 и 9.1.

Glu-270 играет важную роль в катализе. Является он нуклеофилом или общеосновным катализатором? Ранее предлагался *нуклеофильный механизм катализа* (Схема 10.4).



В качестве интермедиата образуется ангидрид, но его не удавалось экспериментально зафиксировать даже при -40°C.

Модификация тирозина-248 изменяет активность фермента. В частности, ацетилирование этого остатка подавляет пептидазную активность, но эстеразная сохраняется. Нитрование тетранитрометаном оставляет 10% от исходной пептидазной активности.

Другой механизм, который обсуждается в литературе – это *общий кислотно-основный механизм* (Схема 10.5).

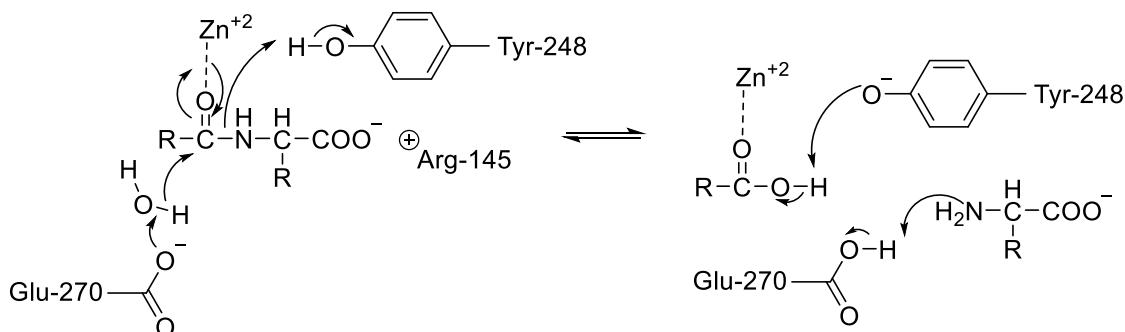


Схема 10.5. Общий кислотно-основный механизм катализа карбоксипептидазой.

Карбоксильная группа глутамата никогда не дотягивается до карбонильной группы субстрата, значит, должна быть молекула воды. Это подтверждается неспособностью метанола заменить воду. Связывание субстрата приводит к конформационным изменениям структуры (механизм индуцированного соответствия). Остатки Arg145, Glu270, Tyr248 располагаются при этом ближе к субстрату, и молекула воды уходит из активного центра, делая его более гидрофобным.

Существуют и другие аминокислотные остатки, участвующие в связывании. Так, Asn144 и три остатка аргинина находятся в пептид-связывающем домене. Asn144 и Arg145 могут взаимодействовать через водородные связи. Arg127 образует водородную связь с карбонильным атомом кислорода субстрата. Tyr248, Tyr198, Arg вовлечены в катализ, но несущественно – например, замена Tyr248Phe лишь в 3-5 раз ухудшает связывание субстрата.

Как ранее было сказано, карбоксипептидаза имеет два значения рKa. рKa 6 по всей видимости, соответствует ионизации глутаминовой кислоты-270, координирующей воду, а для рKa 9 есть три кандидата – Тир248, координированная вода и Меткоординированный His196. Рентгеноструктурный анализ при разных pH показывает укорочение Zn-O связи с ростом pH, что говорит в пользу гипотезы о координированной воде.

Связывание субстрата происходит по его концевой COO⁻ группой путем замещения воды в свободном ферменте. Остатки Asn144, Arg145 (центр узнавания C-концевой группы субстрата) и Тир248 – консервативны, образуют водородную связь с C-концом (COO-группой). Тирозин248 подвижен (ароматическое кольцо вращается вокруг C_α-C_β и C_β-C_γ связей). При связывании субстрата образуется система водородных связей, в этом участвуют также остатки Asn144, Glu270, Ser197, Glu72, и 8 молекул воды в гидрофобном кармане (Схема 10.6). Карман образован остатками Leu202-Gly207, Ile243, Тир268. Четыре молекулы воды покидают карман с помощью остатков Gly207, Gly252, Asp256. Роль цинка – активация координированной воды, которая является подходящим кандидатом для атаки пептидной связи. На следующем шаге кислород карбонильной группы подходит к иону цинка, замещая воду, и протон движется к Glu270. Arg127 движется ближе к металлу в течение катализа и в конечном итоге стабилизирует переходное состояние. Затем Glu270 движется от металла, предостав员я карбоксильную группу во взаимодействие с уходящими группами. Аминокислота, которая должна выделиться, берет протон от глутамата-270. Аргинин-127 возвращается в исходное положение, как в свободном ферменте, что открывает канал для воды, которая направляется в активный центр. Положительный заряд аргинина помогает удалить продукт, несущий положительный заряд. Переходное состояние –гем-диолят анион, стабилизированный координированным ионом цинка и электростатическим взаимодействием с Glu270.

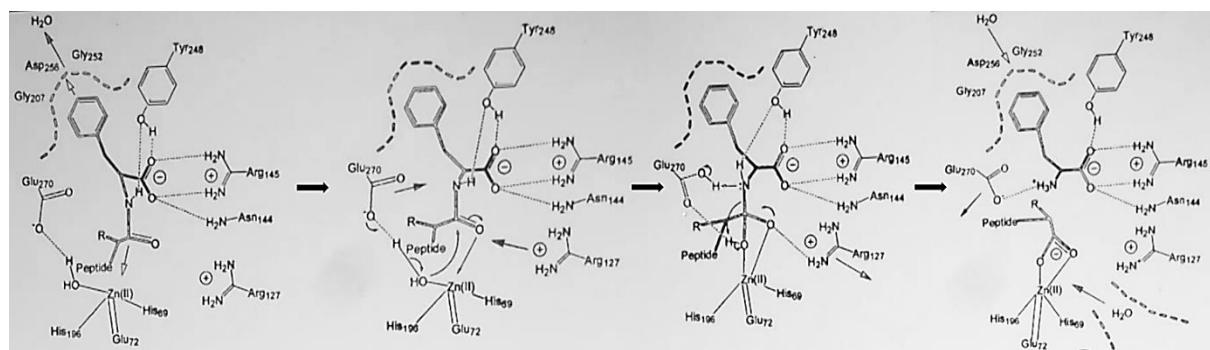


Схема 10.6. Механизм действия карбоксипептидазы.

Продукты реакции покидают активный центр и фермент возвращается в исходное состояние.

Предполагают, что структура активного центра карбоксипептидазы A сходна с таковой для ангиотензина и термолизина.

Лакказа. Лакказа, или п-дифенол кислород оксиредуктаза – фермент (масса около 60кДа), который встречается в самых различных микроорганизмах, впервые был выделен из японского лакового дерева. В активном центре содержит четыре атома меди: один атом t1 и трехатомный кластер, состоящий из атомов t2 и t3. На одном атоме меди происходит окисление фенольного субстрата, а на кластере – восстановление молекулярного кислорода до воды, причем процесс протекает без образования пероксидного интермедиата.

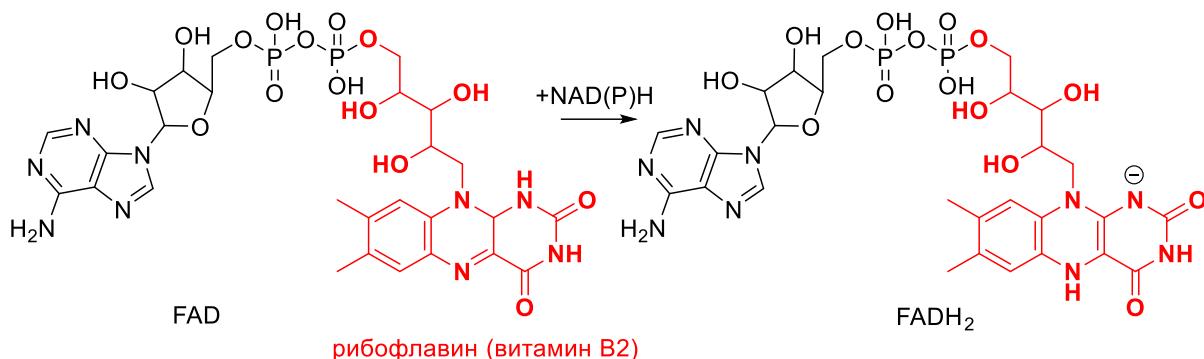
Фермент важен для расщепления и синтеза лигнина – сложного полифенольного полимера, который очень сложно переработать. Для лакказы характерна очень широкая субстратная специфичность (например, самые разные полифенолы и ароматические соединения, ферроцианид калия).

Механизм катализа лакказой следующий. На первой стадии происходит окисление субстрата на атоме меди – t1 центре, где образуется водородная связь с остатками гистидина и аксиальным лигандом (Asp/Glu и иные полярные аминокислоты). Изменяется геометрия кармана для увеличения гидрофобности. Кислая группа субстрата отдает свой протон, одновременно с этим происходит перенос электрона к t1 атому меди через остаток гистидина. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал этого центра T1 является характеристикой, которая различна для разных лакказ. На трехатомном кластере из ионов меди происходит восстановление O₂ до H₂O. Механизм переноса электрона точно не установлен.

Лакказа, как фермент, катализирующий окислительные процессы, нашел широкое применение. Он используется в целлюлозно-бумажной промышленности для переработки лигнинсодержащего сырья, в текстильной промышленности для обесцвечивания и окраски тканей, в пищевой промышленности (производство пива), в аналитической химии (ИФА), и т.д.

Лекция 11. Флавин- и гем-содержащие белки.

ФАД-зависимые ферменты. Флавинадениндинуклеотид FAD выступает в роли простетической группы для ряда ферментов и участвует в окислительно-восстановительных реакциях (Схема 11.1).



Флавины – более сильные окисляющие агенты, чем NAD⁺ или NADP⁺. Они могут быть восстановлены через одно- или двухэлектронные пути, могут быть реокислены молекулярным кислородом. Для флавинов возможно три различных состояния (Рисунок 11.1): окисленная форма, семихинон и восстановленная форма, которые сильно отличаются окраской и могут быть зафиксированы с помощью спектрофотометрии.

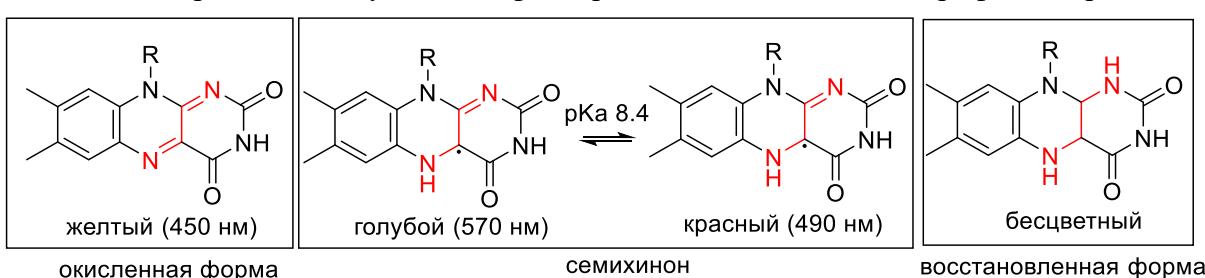


Рисунок 11.1. Различные формы флавинов.

Флавопротеины катализируют огромное количество самых разных реакций. Примерами флавопротеинов служат глутатионредуктаза, различные дегидрогеназы, оксидазы, и другие.

ФАД-зависимые тиоловые оксиредуктазы. Эти ферменты относятся к подподклассу 1.6.4.X. Примеры – глутатионредуктаза (EC 1.6.4.2), тиоредоксинредуктаза (1.6.4.5).

1.6. в номере ферmenta отражает то, что донором электронов выступает НАДН или НАДФН, 1.6.4. – что акцептором электронов является дисульфидная связь.

Другой пример ферmenta – липоамиддегидрогеназа (EC 1.8.1.4), где 1.8 отражает, что донором электронов является тиольная группа, а 1.8.4. обозначает, что акцептор электронов это НАД⁺. Субстратом является липоамид.

Субстратом глутатионредуктазы является глутатиондисульфид, который восстанавливается в ходе ферментативного процесса до глутатиона. Глутатионредуктаза катализирует процесс, обратный процессу, катализируемому глутатионпероксидазой. Восстановление дисульфида – двухстадийный процесс:

- 1) $E + NADPH + H^+ = EH_2 + NADPH^+$, E – полностью окисленный фермент (за счет ФАД-группы), EH₂ – полностью восстановленный интермедиат;
- 2) $EH_2 + GSSG = E + 2GSH$, GSSG – глутатиондисульфид, GSH – глутатион

Фермент представляет собой димер (Рисунок 11.2), содержит две субъединицы массой по 50 кДа и по 478 аминокислотных остатков каждая, связанные дисульфидной связью. В ферменте есть несколько важных доменов: ФАД-связывающий домен, НАДФ-связывающий домен, промежуточный домен. Каталитических центров в ферменте два, и они находятся между доменами, причем в каждом центре содержатся аминокислотные остатки из обеих субъединиц.

Фермент использует ФАД для передачи восстановительных эквивалентов от НАДФН к цистеину с образованием дисульфидного мостика. Два электрона одновременно переносятся к ФАД, семихинон не образуется. На последней стадии субстрат восстанавливается дисульфидом (Схема 11.2).

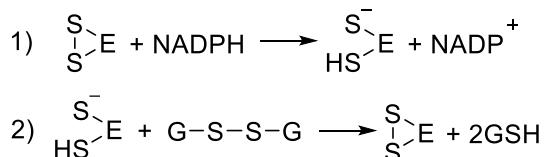


Схема 11.2. Общая схема катализа глутатионредуктазой.

Благодаря глутатионредуктазе соотношение глутатиона и глутатиондисульфида $\text{GSH:GSSG} > 20:1$, что позволяет глутатиону действовать в качестве внутриклеточного восстанавливающего агента. НАДФН вместе с глутатионредуктазой являются основной защитного механизма, который в среде с сильными окислительными свойствами поддерживает функционально важные SH-группы в восстановленном состоянии.

Механизм катализа глутатионредуктазой. Связывающий центр для ФАД и НАДФН расположен в глубоком кармане. Для катализа необходимы остатки Cys58, Cys63, Tyr197 из одной субъединицы, и Glu472⁻, His467⁺ из другой субъединицы. В окисленном ферменте в отсутствие НАДФН тирозин197 закрывает от растворителя НАДФН-связывающий центр и кольцо ФАД. Кольцо НАДФН параллельно и близко к ФАД. С другой стороны ФАД расположен остаток цистеина-63. Ориентация этого остатка такова, что только один из двух атомов водорода никотинамидного кольца находится в позиции для переноса гидрид-иона на ФАД – образуется FADH^- анион, т.е. ФАД принимает протон и два электрона и полностью восстанавливается. Затем электрон

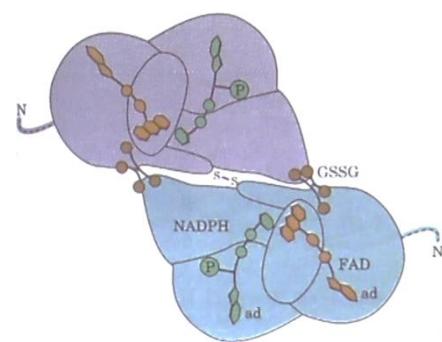


Рисунок 11.2.
Глутатионредуктаза.

переходит от FADH⁻ к Cys63, что сопровождается распадом дисульфидной связи с цистеином-58 (Схема 11.3). Цистеин-58 берет протон из растворителя через Glu472' и His467' и образует SH-группу. Одновременно с этим цистеин-63 образует ковалентную связь с флавиновым кольцом; образованный ковалентный аддукт затем переходит в нековалентный. Процесс завершается уходом НАДФ⁺ из активного центра, образуется фермент в восстановленной форме, а остаток тирозина197 блокирует кофермент-связывающий центр, чтобы предохранить фермент от реокисления растворителем без субстрата.

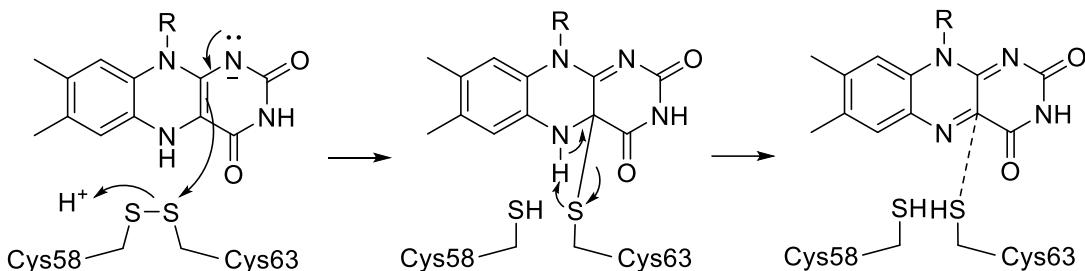


Схема 11.3. Первая стадия механизма катализа глутатионредуктазой.

Вторая стадия (Схема 11.4) начинается со связывания глутатиондисульфида GSSG. Важные для этого процесса остатки – Cys58 из одной субъединицы и Glu472', His467' из другой субъединицы (подобно триаде в сериновых гидролазах). His467' берет протон от Cys58, делая его более сильным нуклеофилом. Один атом серы в субстрате атакуется Cys58, второй атом серы субстрата берет протон от His467', при этом выделяется первый продукт – GSH. Затем происходит нуклеофильная атака Cys63 по Cys58, выделяется вторая молекула GSH, а фермент возвращается в исходную окисленную форму.

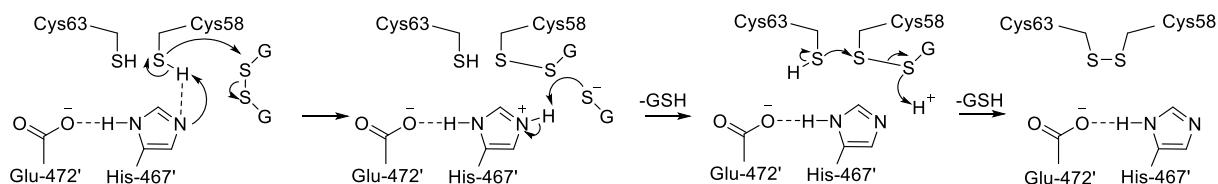


Схема 11.4. Вторая стадия механизма катализа глутатионредуктазой.

В центре связывания НАДФН имеется солевой мостик Lys66–Glu201, он расположен на дне связывающего кармана. Рентгеноструктурные исследования показали, что этот мостик разрывается в момент, когда приходит НАДФН, а когда он уходит, мостик замыкается, тирозин-197 поворачивается и замыкает карман.

Таким образом, ФАД-содержащие ферменты обычно используют кольцо ФАД как переносчик электронов в окислительно-восстановительных реакциях. Кольцо ФАД погружено в гидрофобное окружение, где принимает и отдает электроны. Поскольку ФАД не диссоциирует из фермента, требуется ассоциация фермента с другими донорами и акцепторами электронов, приходящих в активный центр. Большинство НАДФН-зависимых ФАД-содержащих ферментов имеют структуру, аналогичную редокс-активному дисульфиду.

Гем-содержащие ферменты. Гем-содержащих ферментов существует огромное количество, и все они выполняют самые разные функции. Примеры ферментов и белков – это цитохромы, гемоглобин, каталаза, пероксидазы. **Гем** – это комплекс протопорфирина с двухвалентным железом (Рисунок 11.3). Позвоночные синтезируют гем из более простых азотистых соединений – глицина и сукцинатов, а также из резервного железобелкового комплекса – ферритина.

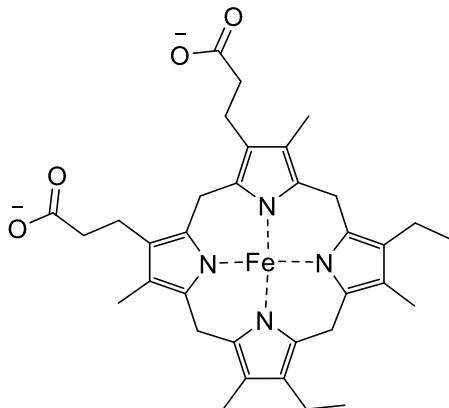


Рисунок 11.3. Пример гема.

Пик поглощения порфирина довольно размытый, с максимумом на 385 нм. При образовании комплекса с октаэдрической координацией атома железа появляется полоса Соре в диапазоне 400-410 нм, интенсивность и длина волны зависят от лигандов. При этом коэффициенты экстинкции бывают порядка 10^5 , и это один из самых высоких коэффициентов экстинкции для белков.

Функции гемсодержащих белков и ферментов разнообразны. Это может быть и транспорт кислорода (гемоглобин, миоглобин, нейроглобин, цитоглобин), и мембранный транспорт (цитохромы), перенос электрона (цитохром С и другие цитохромы, каталаза), катализ (оксидазы и пероксидазы – цитохром С оксидаза, лигнинпероксидаза), сенсоры (FixL – O₂ сенсор, sGC – NO сенсор, CooA – CO сенсор). На разнообразие функций влияет структура белка, при этом порфириновые системы имеют близкие особенности во всех этих белках.

Порфирины – это высокоспиновые молекулы. В их электронных спектрах много линий, и спектры зависят от природы заместителей в кольце. Природа заместителя важна для стабилизации или взаимодействия гема с белком (например, гем в цитохроме С связан с белком тиоэфирными связями). В молекуле порфирина два протона у атомов азота легко замещаются на металлы. Молекула порфирина плоская, два пиррольных кольца отклонены вверх, два – вниз, и в результате атомы азота выступают из плоскости кольца. Для железосодержащих порфиринов существенна природа лигандов в 5 и 6 положениях (обозначены L, Рисунок 11.4)), это влияет на окислительно-восстановительные потенциалы и физиологические свойства порфирина.

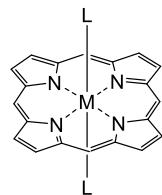


Рисунок 11.4. Лиганды в порфириных комплексах.

Так, у цитохрома P450 в качестве лиганда находится $\text{CH}_2\text{S-Cys}$, у каталазы $\text{OH}(\text{Tyr})$.

Гемоглобин А, или HbA – нормальный гемоглобин взрослого человека. В эритроцитах содержится 750г гемоглобина, 2.6 г составляет железо (3/4 от всего железа в организме). Гемоглобин присутствует в организме в виде тетрамера Гемоглобин А ($\alpha_2 \beta_2$) является основным вариантом гемоглобина, составляет 97% от всего гемоглобина. Около 3% гемоглобина приходится на гемоглобин А₂ ($\alpha_2 \delta_2$). В структуре гемоглобина А содержится 574 аминокислоты. Полипептидные цепи гемоглобина на 80% спирализованы.

Главная функция гемоглобина – транспорт дыхательных газов. Это необходимо, поскольку растворимость молекулярного кислорода в воде слишком низка для обеспечения дыхания. У животных в составе гема содержится ион железа, что придает крови красную окраску. У моллюсков и членистоногих – два атома меди, благодаря чему кровь имеет голубой цвет (гемоцианин). Мелкие беспозвоночные имеют два атома железа в гемоглобине, и кровь имеет вишневый цвет.

Гемоглобин обратимо связывает кислород в условиях высокого его парциального давления (в легких). С током крови эритроциты, содержащие молекулы гемоглобина, обогащенные кислородом, доставляются к органам и тканям с малым содержанием кислорода и высвобождают в них кислород, необходимый для окислительных процессов. Угарный газ CO связывается с гемоглобином крови прочнее, чем кислород (сродство в 250 раз выше), образуя карбоксигемоглобин (HbCO). Карбоксигемоглобин в 3000 раз медленнее диссоциирует, чем оксигемоглобин, и поэтому накапливается в крови. При содержании 0.07% CO и 21% O_2 в воздухе содержание карбокси- и оксигемоглобина в крови оказывается одинаковым, и отравление угарным газом происходит довольно легко, при низких концентрациях. Кроме этого, некоторые процессы приводят к окислению иона железа до степени окисления +3, в результате чего образуется форма гемоглобина, известная как метгемоглобин (HbOH).

Миоглобин (Mb), в отличие от гемоглобина – мономерный белок. И в гемоглобине, и в миоглобине гем прочно связан с белком – 80 гидрофобных взаимодействий и одна координационная связь с проксимальным гистидином. У миоглобина и гемоглобина схожие третичные структуры, имеется 8 спиральных участков, гем вклинивается в щель между двумя спиральными участками, в свободном белке железо находится немного под плоскостью гема (0.7 \AA) и связано с имидазолом гистидина белка. Кислород связывается по другую сторону от плоскости, при этом атом железа смещается в плоскость кольца, что влечет за собой значительные

конформационные изменения в белке. F-Альфа-спираль движется ближе к порфирину, из-за чего SH-группа одного из цистеинов, встроенного в эту спираль, встраивается в щель между спиралами F и H. Это, в свою очередь, приводит к смещению тирозина, из-за чего меняется число солевых мостиков и водородных связей – их становится гораздо меньше. То есть небольшое смещение иона железа приводит к очень большим изменениям в белке.

В случае гемоглобина следует упомянуть такое понятие, как положительная кооперативность в связывании кислорода. В ферменте имеется четыре субъединицы и четыре гема, связывающие кислород. Константа скорости связывания кислорода с каждой последующей субъединицей возрастает. Кривая степени оксигенации гемоглобина имеет несколько другой вид по сравнению с кривой для миоглобина. У миоглобина это классическая кривая насыщения с выраженным пределом насыщения, а у гемоглобина это S-образная кривая (Рисунок 11.5). Это есть следствие положительной кооперативности, которая обеспечивает резкое изменение степени сродства в очень узком диапазоне давлений кислорода.

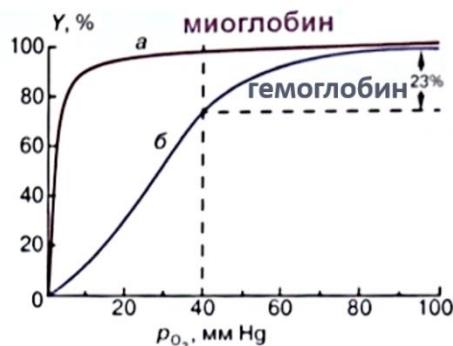


Рисунок 11.5. Кривая степени оксигенации для миоглобина и гемоглобина.

Другими словами, в очень узком диапазоне содержания кислорода может происходить и связывание, и отщепление кислорода: в легких парциальное давление кислорода лишь ненамного выше, чем в тканях, но такой небольшой разницы достаточно для того, чтобы в ткани можно было отщепить кислород от гемоглобина.

Взаимодействие гемоглобина с кислородом может привести к окислению иона железа. Поэтому при дыхании в эритроцитах непрерывно образуется метгемоглобин. У эритроцитов есть *специальная ферментативная система для восстановления метгемоглобина до дезоксигемоглобина.*

Функция гемоглобина как переносчика углекислоты не менее важна, чем его функция переноса кислорода. Присоединение кислорода меняет кислотно-основные свойства гемоглобина. Оксигемоглобин – более сильная кислота, чем дезоксигемоглобин. Поэтому в тканях, где значительная часть гемоглобина теряет кислород и становится более сильным основанием, гемоглобин связывает образующуюся в ходе метаболических процессов углекислоту. В альвеолах легких

дезоксигемоглобин становится снова оксигемоглобином, становится более сильной кислотой и отщепляет CO_2 .

Каталаза. В 1818 году Луи Жак Тенар открыл пероксид водорода, и первым выдвинул предположение о том, что пероксид разлагается под действием некоего вещества, которому позднее – в 1900 году – дали название каталаза.

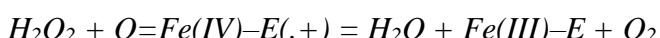
Каталаза (EC 1.11.1.6) – фермент, катализирующий реакцию расщепления пероксида водорода. Присутствует почти во всех организмах, находящихся в контакте с кислородом. В растениях предположительно участвует в фотореспирации и разложении молекулярного азота, а в патогенных бактериях – для защиты своих клеток от токсинов хозяина. У млекопитающих, как полагают, роль этого фермента минимальна. Эксперименты с трансгенными мышами и изучение людей с генетическими отклонениями не выявляют серьезных патологий. Полагают, что в процессе нейтрализации пероксидов у млекопитающих преимущественно задействованы пероксидредоксины. В организме существует в виде тетрамера, находится в пероксисомах, также как оксидаза D-аминокислот или оксидаза мочевой кислоты.

У каталазы одна из самых высоких катализитических констант – одна молекула фермента способна превратить в воду миллионы молекул пероксида водорода в секунду.

pH оптимум человеческой каталазы составляет 6.8–7.5. Остальные каталазы – от 4 до 11 в зависимости от вида организма. Температурный оптимум тоже зависит от вида организма – например, каталаза из *Pyrobaculum calidifontis* имеет оптимум при 90 градусах. Каталаза способная окислять различные соединения типа формальдегида, фенолов и спиртов, т.е. имеет пероксидазную активность. Классическим неконкурентным ингибитором данного фермента являются ионы тяжелых металлов, а конкурентным – цианид.

Каталаза находит применение в текстильной и пищевой промышленности как антиоксидант, в микробиологии в качестве основы каталазного теста на стафилококки или туберкулез.

Реакция, катализируемая каталазой, имеет вид



На первой стадии фермент выступает в качестве окислителя, а на второй – восстановителя.

Пероксидаза. Функции пероксидаз очень разнообразны: это и синтез лигнина, и нейтрализация пероксида, и расщепление гормона роста растений. Пероксидаза хрена нашла широкое применение в разных областях аналитической химии.

Данфорд (Dunford) писал, что аэробная жизнь нуждается в том, чтобы ее системы поддерживались в частично восстановленном состоянии, хоть они сами существуют в окисляющем окружении. Утилизация молекулярного кислорода для получения необходимой энергии означает, что организмы живут на пороге катастрофы. Окисление

требуется для жизни и также существует в смерти. Во всем этом пероксидазы занимают уникальную нишу, так как по определению они вовлечены в окислительно-восстановительные реакции, утилизируя пероксид водорода и другие гидропероксиды.

Железо (и пероксидазы) может существовать в *пяти окислительных состояниях* (Схема 11.5). Основное состояние – это ферри-фермент, с Fe(III). При взаимодействии с пероксидом водорода железо отдает два эквивалента электронов, но в случае каталазы не переходит в железо(V), а превращается в феррильное Fe(IV), образуя к тому же п-катион радикал (он может локализоваться либо на белке, либо на порфириновом кольце). На следующей стадии, когда приходит органический субстрат, катион-радикал уходит, остается просто феррильное железо. Затем приходит еще один донор водорода, и система возвращается обратно к ферри-ферменту. Пероксидаза может быть восстановлена сильными восстановителями типа дитионата натрия и перейти в форму ферро-фермента с железом(II). Она может быть окислена кислородом до перокси формы с железом(III). Все промежуточные соединения в пероксидазном и оксидазном цикле могут быть зафиксированы, и носят свои номера (в соответствии со Схемой 11.5.).

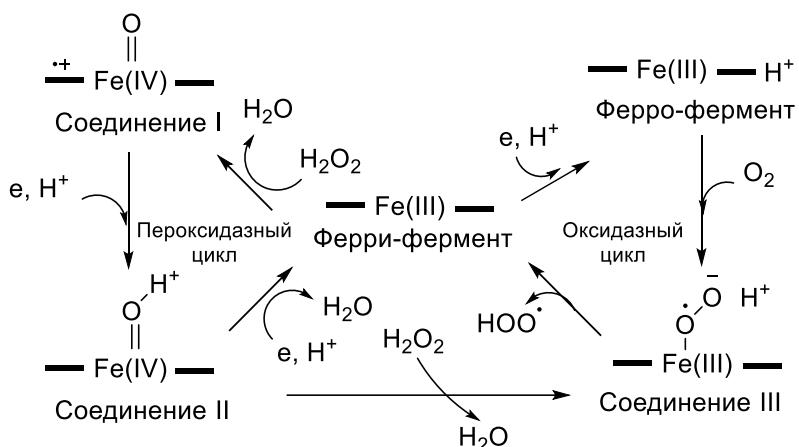


Схема 11.5. Общая схема катализа пероксидазами.

Спектры поглощения всех этих соединений отличаются – нативный фермент, соединения I и II имеют разные максимумы поглощения).

Механизм действия пероксидаз был впервые показан на примере цитохром С пероксидазе, которую удалось кристаллизовать (поскольку у нее мало углеводных фрагментов, в отличии от большинства пероксидаз, например, пероксидаза хрена на 20% по массе состоит из углеводных остатков) и исследовать методом рентгеноструктурного анализа. Катион-радикал локализуется на триптофане-51, т.е. на белке, а не на порфириновом кольце. В то же время на основе рентгеноструктурных данных для рекомбинантного белка (не содержащей углеводов) установлено, что в случае пероксидазы хрена катион-радикал локализуется на порфириновом кольце. Кроме этого, в проксимальной и дистальной областях пероксидазы хрена содержатся ионы кальция. Они не участвуют в катализе, а поддерживают структуру белка.

Субстраты пероксидаз. Специфичность пероксидаз очень широка. Субстратами могут быть двухэлектронные доноры электронов, для которых принципиальным является связывание вблизи активного центра (например, иодид-ион) или даже проникновение внутрь (тиоанизол, стирол – прямой перенос с железа гема). Субстратами могут быть и простые одноэлектронные ароматические субстраты (они связываются вблизи активного центра, например, ферруловая кислота), окисляющиеся по цепи переноса электронов (например, феррицианид, вератровый спирт и другие). Пероксид водорода проникает в активный центр по каналу, размер и гидрофобность которого контролируют доступ к железу гема. В случае пероксидазы хрена канал образуют множественные остатки фенилаланина (41, 68, 142, 143, 179). Методом направленного мутагенеза был идентифицирован остаток, связывающий ароматические молекулы – Phe179.

Роль кальция в пероксидазе, как было уже сказано, – структурная. Проксимальный кальций важен для структуры фермента и седлообразной конформации гема, обеспечивающей выполнение им катализических функций. Дистальный кальций в большей степени важен для стабильности структуры дистального домена фермента, и его подвижность приводит к инактивации при хранении или в экстремальных значениях pH. В обоих случаях присутствие в растворе пероксидазы 1 mM кальция предохраняет фермент от инактивации. У пероксидаз растений при высокой гомологии и практически одинаковом фолдинге глобулы подвижность дистального кальция может изменяться в широких пределах. У пероксидаз грибов диссоциация кальция из дистального центра имеет серьезные последствия: принципиальное различие между пероксидазами растений и грибов состоит в различном расположении дисульфидной связи (Cys49–Cys44 в пероксидазе хрена). У пероксидаз растений дисульфидная связь поддерживает структуру дистальной области и в отсутствие кальция, в то время как у пероксидаз грибов дисульфидная связь не компенсирует отсутствие кальция в дистальном центре и не в состоянии поддерживать структуру белка. Результатом этой структурной особенности является значительно меньшая стабильность грибных ферментов, у которых потеря кальция приводит к сильным структурным изменениям и полной потере активности.

Пероксидаза хрена имеет много катализически важных аминокислотных остатков в активном центре. Например, при замене Asn70Val разрушается водородная связь с гистидином-42 и фермент демонстрирует очень низкую катализическую активность. При замене гистидина-42 на аланин, лейцин или валин константы скорости первой стадии реакции падают на многие порядки. Дистальный остаток Arg38 играет важную роль: замена его на лизин уменьшает скорость образования Соединения I в 500 раз, а замена на лейцин – в 1200 раз. Он участвует в стабилизации Соединения I, образуя водородную связь с кислородом феррила. По данным мутагенеза Arg38, в отличие от гистидина-42, принимает участие в связывании ароматических субстратов. Молекула воды, обнаруженная также в активном центре пероксидазы хрена, также присутствует в кристаллических структурах других пероксидаз растений, в отличие от грибных и

микробиальных пероксидаз. Остаток пролина139, кислород которого образует водородную связь с молекулой воды активного центра, присутствует во всех пероксидазах суперсемейства растений.

В дистальной области пероксидазы хрена находятся остатки Arg38, Phe41, His42 и Fe³⁺ (в пятикоординированном высокоспиновом состоянии). Ближайшая к иону железа молекула воды расположена на расстоянии 3.2 Å. Железо координировано гистидином-179 (проксимальным), но не координировано гистидином-42. Несколько молекул воды образует дополнительные водородные связи с аргинином-38 и гистидином-42. Дистальный каталитический гистидин-42 отвечает за расщепление молекулы пероксида водорода. Аспарагин-70 важен для поддержания основности гистидина-42 и является высококонсервативным остатком всех растительных пероксидаз. Остаток Glu64 образует водородную связь с молекулой воды, которая является лигандом дистального иона кальция. Мутация этого остатка Glu64, обеспечивающего фиксацию дистального иона кальция в пероксидазе хрена, приводит почти к полному исчезновению активности по фенолу, но существенному увеличению активности по ABTS. Объяснением этого факта является разрушение системы водородных связей в области дистального кальция и каталитического гистидина, приводящее к образованию шестикоординированного состояния атома железа в активном центре, что ведет к стерическим затруднениям для проникновения молекулы фенола в активный центр и для участия гистидина в протонировании молекулы субстрата. Разрушение водородных связей приводит к увеличению окислительного потенциала окисленных соединений пероксидазы хрена, что выражается в повышенной активности по ABTS, осуществление которой не требует протонирования или депротонирования субстрата каталитическим гистидином.

Механизм катализа пероксидазой. Как уже было сказано, дистальный гистидин-42 отвечает за расщепление молекулы H₂O₂. Механизм образования Соединения I включает переходное образование комплекса Fe(III) и перокси-аниона при протонировании гистидина-42. Перенос протона с His-42 на гидроксильную группу и образование молекулы воды генерирует оксиферрил-гем и катион-радикал на порфириевом кольце –Соединение I

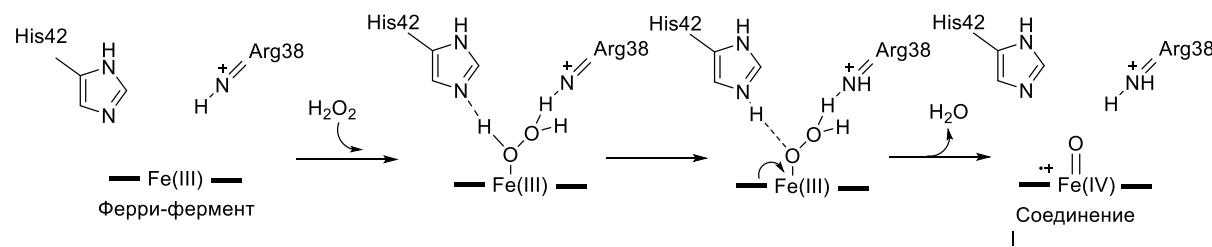


Схема 11.6. Механизм образования Соединения I.

Затем происходит окисление субстрата. Сначала остаток аргинина-38 образует водородную связь с фенольным кислородом субстрата-восстановителя, что помогает переносу протона с фенольного кислорода на гистидин-42 посредством участия молекулы воды активного центра, удерживаемой в нужном положении водородной

связью с пролином-139. Перенос электрона происходит на порфириновое кольцо гема и образуется Соединение II (Схема 11.7).

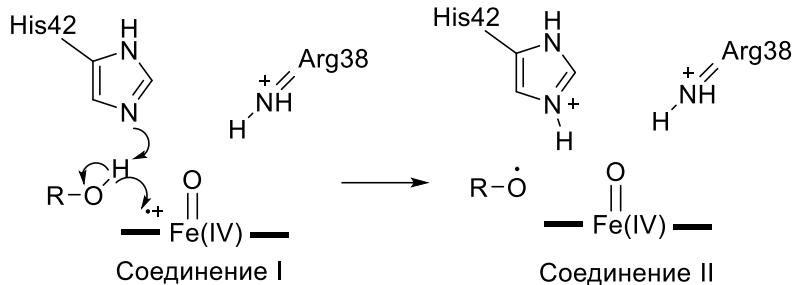


Схема 11.7. Механизм образования Соединения II.

При восстановлении Соединения II перенос протона (Схема 11.8), синхронный переносу электрона, может происходить через молекулу воды активного центра.

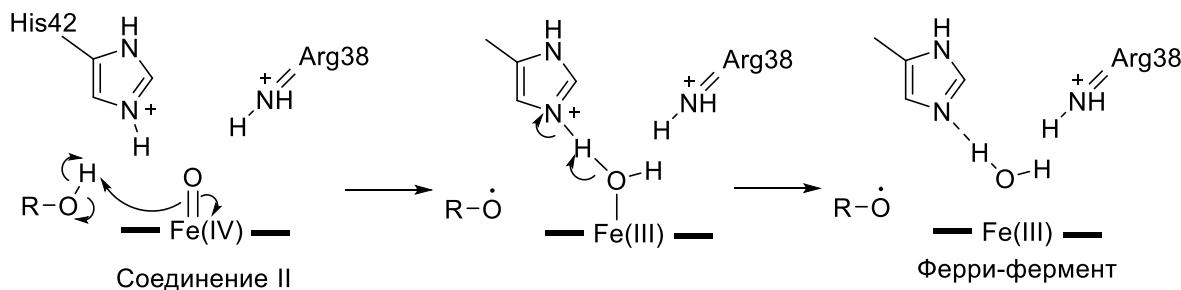


Схема 11.8. Завершающая стадия механизма катализа пероксидазой.

Проксимальный гистидин170 удерживает железо от образования шестикоординированного состояния с дистальным гистидином-42. Проксимальный гистидин связан с проксимальным кальцием через боковой остаток Thr171 (лиганд кальция) и водородные связи с аспартатом-247.

Лекция 12. Специфичность ферментов.

Основные характеристики ферментов. Ферментативные реакции характеризуются огромными значениями констант скорости и чисел оборотов (Таблица 1.4.). Однако следует обращать внимание на ускорение реакции ферментами, т.е. разницу между катализируемой и некатализируемой реакцией (Таблица 12.1).

Таблица 12.1. Ускорение некоторых ферментативных реакций.

Фермент	k_{cat}/k_{uncat}
β-амилаза	$7.2 \cdot 10^{17}$
Ортоидин 5'-фосфат декарбоксилаза	$1.4 \cdot 10^{17}$
Фумараза	$3.5 \cdot 10^{15}$
Карбоксипептидаза В	$1.3 \cdot 10^{13}$
Фосфотриэстераза	$2.8 \cdot 10^{11}$
Карбоангидраза	$7.7 \cdot 10^6$

При таком рассмотрении карбоангидраза вовсе не относится к «чемпионам» по ускорению реакции.

Существуют ферменты, у которых k_{cat}/K_M близко к диффузионно-контролируемым скоростям ассоциации (Таблица 12.2), то есть превращение фермент-субстратного комплекса в продукты происходит почти мгновенно.

Таблица 12.2. Некоторые ферменты с предельными ускорениями реакции.

Фермент	Субстрат	$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{мкМ}$	$k_{cat}/K_M, \text{с}^{-1}\text{М}^{-1}$
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	$1.4 \cdot 10^4$	90	$1.6 \cdot 10^8$
Карбоангидраза	CO_2	$1 \cdot 10^6$	12000	$8.3 \cdot 10^7$
	HCO_3^-	$4 \cdot 10^5$	26000	$1.5 \cdot 10^7$
Каталаза	H_2O_2	$4 \cdot 10^7$	1000000	$4 \cdot 10^7$
β-лактамаза	Бензилпенициллин	$2 \cdot 10^3$	20	$1 \cdot 10^8$
Супероксиддисмутаза	Супероксид	—	—	$7 \cdot 10^9$

В ферментативном катализе участвуют такие компоненты активного центра, как кофакторы(коферменты). Они могут быть разделены на две группы: обладающие окислительно-восстановительными свойствами (например, НАД, НАДФ, ФАД, металлопорфириновые комплексы (цитохромы, кобаламид, пероксидазы, каталазы), аскорбиновая и липоевая кислоты, убихинон, ионы металлов меди, железа и др.) и не обладающие ими (тиаминпирофосфат, пиродоксальфосфат, фолиевая кислота, биотин, глутатион, 5-аденозилметионин, АТФ, АДФ, АМФ, уридинфосфат, 4'-фосфопантотеин, ионы металлов цинка, магния и др.). Кроме этого, у самого белка-фермента есть собственные группы, которые способны выступать в качестве кислотно-основных и

нуклеофильных катализаторов (разобрали в Лекции 8). Примеры нуклеофильных групп в разных ферментах представлены в Таблице 12.3.

Таблица 12.3. Нуклеофильные группы некоторых ферментов.

Нуклеофил	Фермент	Интермедиат
-OH(Ser)	Сериновые протеазы, щелочные фосфатазы	Ацилфермент Фосфоацилфермент
-OH(Thr)	Амидазы	Ацилфермент
-OH(Zn-связ.)	Карбоангидраза	—
-SH(Cys)	Тиоловые протеазы	Ацилфермент
-CO ₂ -(Asp)	АТФаза	Фосфорилфермент
-NH ₂ (Lys)	Альдолаза Пиридоксалевые ферменты ДНК лигаза	Основание Шиффа Аденилфермент
-Im(His)	Фосфоглицератмутаза Сукцинил-коA-синтетаза	Фосфорилфермент
-OH(Тир)	Глутамин синтетаза Топоизомераза	Аденилфермент Нуклеотидилфермент

Важными характеристическими свойствами ферментов являются каталитический потенциал, т.е. отношение скорости катализируемой ферментом и не катализируемой реакций; регуляция, т.е. контроль ферментативной реакции (за счет pH и температуры среды); и специфичность, т.е. селективность фермента к субстрату и способность фермента выбрать субстрат (молекулярное узнавание).

Виды ферментативной специфичности. Специфичность ферментов иногда разделяют на шесть категорий:

- Специфичность к связи.** Это специфичность к субстратам, имеющим похожие связи и структуры. Примером служат β -амилаза, которая гидролизует а-1,4-гликозидные связи в крахмале и гликогене; липаза, катализирующая гидролиз эфирной связи между глицерином и жирной кислотой в жирах; протеазы, гидролизующие пептидные связи в разных белках.
- Групповая специфичность.** Характеризует случай, когда фермент специфичен и к типу связи, и группам вокруг нее, т.е. менее широкая специфичность, чем специфичность к связи. Сюда можно отнести структурную специфичность, например, эндо-и экзо-пептидазы. Пример ферментов – пепсин, он гидролизует пептидные связи, в которых с одной стороны от связи расположены ароматические аминогруппы. Также примером является химотрипсин, гидролизующий пептидную связь, у которой со стороны карбоксильной группы ароматические

аминокислоты; а также аминопептидазы, гидролизующие пептидную связь с N-конца, и карбоксипептидазы, гидролизующие ее с C-конца.

3. **Специфичность к субстрату** (абсолютная специфичность). В данном случае фермент специфичен к определенному субстрату или реакции. Например, как лактаза расщепляет только лактозу, сахараза – сахарозу, каталаза – пероксид водорода, глюкокиназа катализирует перенос фосфатной группы с АТФ только на глюкозу и никакие другие сахара, а также уреаза, гидролизующая мочевину, и аргиназа, катализирующая реакцию гидролиза аргинина до орнитина и мочевины (Схема 12.1).

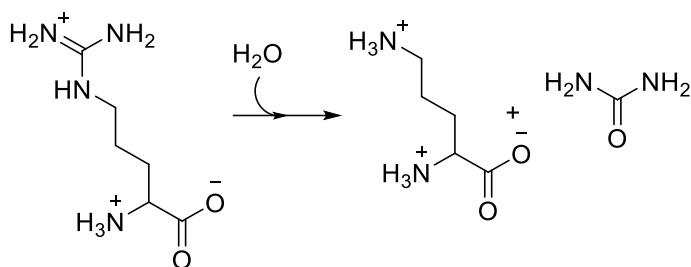


Схема 12.1. Гидролиз мочевины в присутствии аргиназы.

Отметим, что в случае абсолютной специфичности соединения, похожие на специфический субстрат для конкретного фермента, являются конкурентными ингибиторами этого фермента, как, например, лизин, канаванин или орнитин (Рисунок 12.1.), похожие на аргинин, ингибируют аргиназу.

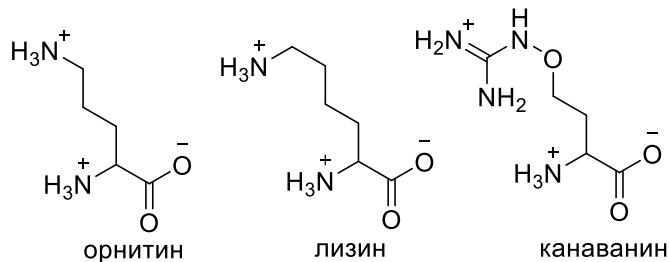


Рисунок 12.1. Конкурентные ингибиторы аргиназы – аналоги аргинина.

4. **Оптическая и стереоспецифичность.** В данном случае фермент специфичен к оптической конфигурации субстрата. Например, оксидаза L-аминокислот специфична только к L-аминокислотам, и неактивна по отношению к D-аминокислотам (трансформируемые группы повернуты не в ту сторону). Такая же специфичность есть и у сериновых гидролаз, для которых D-аминокислоты являются конкурентными ингибиторами. Еще один пример – α -амилаза, гидролизует α -амилазные связи (но не β -амилазные!) гликогена и крахмала, а β -амилаза – β -гликозидные связи (но не α -амилазные!) целлюлозы.
5. Геометрическая специфичность. Ферменты, обладающие такой специфичностью, катализируют реакции субстратов с похожей молекулярной структурой. Например, алкогольдегидрогеназа катализирует окисление этанола, метанола, пропанола. При

этом фермент может работать с разными субстратами с разной эффективностью – так, в присутствии алкогольдегидрогеназы метанол окисляется в 25 раз медленнее, а пропанол – в 2.5 раза медленнее, чем этанол, поскольку активный центр данного фермента оптимизирован именно для этанола.

6. **Коферментная специфичность.** В данном случае фермент работает только с определенными коферментами. Так, дрожжевая алкогольдегидрогеназа не связывает НАДФН, для этого фермента принципиально важно, чтобы в системе присутствовал НАД и НАДН.

Заключение по общим особенностям ферментативного катализа. Подведем итоги.

Первое – в ферменте имеется особый участок – активный центр, на котором происходит катализ. Это есть в каждом ферменте! Далее, во многих случаях, чтобы протекала каталитическая реакция, нужно образование фермент-субстратного комплекса, в котором реализуются многоточечные взаимодействия за счет множественных водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий. Это необходимо для правильной ориентации субстрата для дальнейшего катализа, а также для перевода реакции во внутримолекулярный режим. Такого не происходит в обычном органическом катализе. Затем, следует помнить об эстафетной передаче заряда, которая позволяет повысить нуклеофильность реагирующих групп, как например, действует триада в сериновых гидролазах или тиол-имидаэзольная пара в цистеиновых протеазах. Кроме этого, для ферментов характерно поддержание микроокружения активного центра в состоянии, отличном от водного раствора, (вытеснение воды из активного центра, которое дает выигрыш в ориентации боковых цепей), и связывание гидрофобного субстрата в гидрофобном активном центре, который расположен в глубине фермента и отличается от водной среды по физико-химическим характеристикам и большее напоминающий неполярный растворитель. В ряде ферментов, например, холинэстеразе и карбоангидразе, вода покидает активный центр в начале реакции, когда группы активного центра «подживаются» при связывании субстрата, и возвращается обратно после окончания реакции. Еще одна важная особенность, присущая только ферментативному катализу – средство фермента выше к переходному состоянию, чем к исходному субстрату, что стабилизирует переходное состояние и понижение его свободной энергии. Так, в сериновых гидролазах образуется оксоанионная дырка, стабилизирующая ПС, а для лизоцима было экспериментально показано, что связывание фермента с синтетическими аналогами переходного состояния лучше, чем с субстратом. Заключительный момент, важный для ферментативного катализа – это специфичность ферментов, которая подробно была рассмотрена в настоящей лекции.

Лекция 13. Металлы в составе ферментов.

Факторы, влияющие на эффективность катализа, на примере карбоангидразы.

Казалось бы, если ион металла хорошо связывается с ферментом в непосредственной близости от центра связывания, то это должно способствовать увеличению эффективности катализа. Однако на практике этого не происходит, так как на эффективность катализа влияет ещё множество других факторов. Для ряда ферментов возможно удалить ион металла и, поместив в раствор соли другого металла, получить фермент с этим новым ионом металла в районе центра связывания. Одним из таких ферментов является карбоангидраза, которая чувствует в процессе получения угольной кислоты из углекислого газа.

В активном центре карбоангидразы находится цинк, координированный атомами азота трёх остатков гистидина и атомом кислорода молекулы воды или гидроксил-иона (Рисунок 13.1). Молекула CO_2 связывается в непосредственной близости от гидроксил-иона (мы будем говорить о гидроксил-ионе, а не о молекуле воды, так как физиологические условия подразумевают слабощелочную среду с $\text{pH} 6$). OH -группа является сильным нуклеофилом, который атакует молекулу углекислого газа. Дальше происходит гидратация CO_2 с образованием гидрокарбонатного иона, который уходит из активного центра.

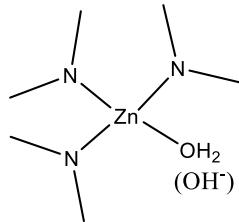


Рисунок 13.1. Координация цинка в активном центре карбоангидразы.

С помощью ЭДТА ион цинка легко удалить из активного центра фермента, а потом заменить его на любой другой ион, поместив в раствор соли соответствующего металла. Полученные в ходе таких экспериментов данные (Таблица 13.1.) свидетельствуют о том, что цинк связывается с активным центром фермента не лучше и не хуже остальных металлов, однако почему-то обладает максимальной гидратацией CO_2 .

Таблица 13.1. Гидратация CO_2 в присутствии разных металлов.

Металл	$\lg K_f$	Гидратация CO_2 , у.е.
Co^{2+}	7,2	5700
Cd^{2+}	9,2	430
Ni^{2+}	9,5	500
Zn^{2+}	10,5	30000
Cu^{2+}	11,6	127
Hg^{2+}	21,5	5

Это ещё раз доказывает, что сродство металла к ферменту не играет решающей роли в эффективности катализа. Гораздо большее значение может иметь координационное число металла, которое, например, у ртути равно двум, при том, что в активном центре карбоангидразы металл взаимодействует с тремя гистидинами и должен иметь возможность помимо этого связывать гидроксил-ион.

Мы так же можем отметить высокие показатели гидратации углекислого газа для ионов никеля и кобальта. Их координационные числа равны 6, а координационные окружения представляют октаэдры. То есть помимо трёх связей с гистидинами они способны связываться с ещё тремя молекулами воды. Однако значения гидратации для этих ионов уступают таковому для иона цинка, так как депротонирование молекул воды в таких комплексах носит ступенчатый характер, и отщепление протона от каждой следующей молекулы происходит всё сложнее. В физиологических условиях протон отщепится только от одной молекулы воды в таких комплексах и только с вероятностью 1/3 гидроксил-ион окажется в нужном для взаимодействия с CO₂ положении.

Казалось бы, в таком случае ион Cu²⁺ должен обладать схожими с Zn²⁺ значениями гидратации углекислого газа, ведь его координационное число тоже равно 4. Однако стоит помнить, что координационным полиэдром цинка является тетраэдр, а меди – квадрат. То есть в случае, если комплекс образован ионом цинка, гидроксил-ион будет направлен перпендикулярно плоскости образованной тремя атомами азота остатков гистидина, а в случае меди – он будет находиться в той же плоскости. Из-за этого взаимодействие OH- связанный с ионом меди с CO₂ не происходит.

Механизмы связывания и роль металлов в катализе. Существует множество возможных механизмов белка, металла и субстрата:

- Металл может обеспечивать связывания некоего лиганда, то есть выступать в роли «мостика».
- Металл может быть не в состоянии связаться с ферментом в отсутствие лиганда. Например, ферменты, взаимодействующие с комплексами металл-нуклеотид-дифосфат. При этом металл не увеличивает сродство фермента к субстрату (и АДФ и Me-АДФ связываются одинаково), однако металл может активировать лиганд внутри фермента.
- Фермент играет роль «мостика» между металлом и лигандром, то есть связывает металл с лигандром для дальнейшего взаимодействия.

В определении механизма помогают модели, в которых *имитируется активный центр фермента*. Однако такие модели часто не отражают реального положения вещей. В отсутствие лиганда в окружении иона металла могут существовать группировки с энергиями более близкими к энергии мономолекулярного переходного состояния, чем к энергии стабильной молекулы. Такое состояние называется «теинтатным». При связывании с ферментом металл существенно меняет своё окружение, так как является заряженной частицей. Это приводит к тому, что группы оказались в зоне 10 нм рядом с металлом меняют своё энергетическое состояние.

Фермент в качестве «мостика» выступает, в случае если субстрат и ион металла связываются на значительном расстоянии друг от друга. Наглядным примером такого взаимодействия являются ионы одновалентных металлов, участие которых в реакции влияет на эффективность катализа. Казалось бы, эти металлы не могут выполнять никаких функций в ферменте, кроме как связываться с ним, однако они стабилизируют каталитически-активную конформацию, энергетически менее выгодную, чем нативную. При этом металл может никак не влиять на ход реакции.

Основные функции металлозимов. Металлозимы – разнообразный класс ферментов. Стоит взглянуть на множество их представителей в активном центре, которых расположен ион цинка (Таблица 13.2). Казалось бы, цинк не обладает особым сродством к каким-то группам и не способен вступать в специфические реакции, кроме того, он не распространён в окружающей среде, тем не менее, известно множество цинк-зависимых металлозимов.

Таблица 13.2. Цинк-зависимые металлозимы.

Фермент	Источник	Катализическая реакция
Алкогольдегидрогеназа	Дрожжи, печень лошади и человека	Окисление спиртов
D-лактат цитохром редуктаза	Дрожжи	Восстановление D-лактата
Глицеральдегидфосфат дегидрогеназа	Мышцы коровы и свиньи	Восстановление
Фосфогалюкомутаза	Дрожжи	Изомеризация
РНК полимераза	E. coli	Синтез РНК
ДНК полимераза	E. coli	Синтез ДНК
Обратная танскриптаза	Вирус птичьего миелобластоза	
Меркаптопиурватсульфотрансфераза	E. coli	Перенос сульфогидрильной группы
Щелочная фосфотаза	E. coli	Гидролиз фосфатной связи
Фосфолипаза C	Bacillus cereus	Гидролиз пептидной связи
Лейцинаминопептидаза	Почки свиньи	Гидролиз пептидной связи
Карбоксипептидаза А	Поджелудочная железа человека и коровы	Гидролиз пептидной связи

Карбоксипептидаза В	Поджелудочная железа свиньи и коровы	Гидролиз пептидной связи
Карбоксипептидаза G	Pseudomonas stutzeri	Гидролиз пептидной связи
Дипептидаза	Почки свиньи	Гидролиз пептидной связи
Нейтральная протеаза	Bacillus sp.	Гидролиз пептидной связи
Щелочная протеаза	Esherichia freundii	Гидролиз пептидной связи
АМФ аминогидролаза	Мышцы кролика	
Альдолаза	Дрожжи, Aspergillus niger	
Фосфоманнозоизомераза	Дрожжи	Изомеризация
Пируваткарбоксилаза	Дрожжи	Карбоксилирование

Видно, что цинк-зависимые металлозимы, чувствуют во множестве различных реакций. Рассмотрим основные функции, которые выполняют в живых системах металлозимы:

1. **Транспорт кислорода** (миоглобины, гемоэритрины, гемоцианины). В гемоглобинах и миоглобинах в активном центре находится ион железа (железопорфириновый комплекс). В несвязанном с кислородом состоянии атом железа выведен из плоскости порфиринового кольца. Когда же происходит связывание кислорода, ион железа возвращается в плоскость, что приводит к изменению магнитных свойств железопорфиринового комплекса. Гемоглобин состоит четырёх одинаковых субъединиц и связывается с кислородом кооперативно (каждая следующая молекула кислорода связывается проще предыдущей за счёт постепенного сближения иона железа с плоскостью порфиринового кольца). Такой механизм повышает вероятность насыщения тканей кислородом. У гемоцианинов и геноиритринов кислород связывает пара ионов металлов, в гемоцианинах – два иона меди, а в гемоэрритринах – два иона железа. Для этих классов характерно окислительное присоединение к дезокси-форме биметаллического центра, а так же генерация пироксидного (в случае гемоцианинов) или гидропироксидного (в случае гемоэрритринов) производных. Таким образом, транспорт кислорода всегда осуществляется металлобелками, в активном центре которых расположены ионы меди или железа. Важно понимать, что при таком взаимодействии кислород выступает в качестве основания Льюиса, а порфириновое кольцо или биметаллический центр - в качестве кислоты Льюиса.

2. **Перенос электрона.** Обычные белки не могут переносить электрон, так как в них нет групп, способных легко окисляться/восстанавливаться, поэтому практически всегда эти функции выполняют металлобелки. Примеры – нитрогеназы, ферритоксины,

цитохромы p450. Перенос электрона требует преодоления различных окислительно-восстановительных потенциалов, с чем отлично справляется многообразие ионов металлов, встречающиеся в природе (Таблица 13.3). Так же на окислительно-восстановительный потенциал влияет лигандное окружение металла, что позволяет точно подобрать условия для преодоления любого потенциала.

Таблица 13.3. Окислительно-восстановительные потенциалы для восстановления ряда ионов металлов и реакций с участием O_2

Частицы	$E^\circ (B)$	Частицы	$E^\circ (B)$
$Cu^{2+} + e^- = Cu^+$	+0,153	$O_2(g) + e^- = O_2^-$	-0,33
$Fe^{3+} + e^- = Fe^{2+}$	+0,771	$O_2(g) + H^+ + e^- = HO_2$	-0,13
$Mn^{3+} + e^- = Mn^{2+}$	+0,1,51	$O_2(g) + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2$	+0,281
$Co^{3+} + e^- = Co^{2+}$	+1,842	$O_2(g) + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$	+0,815
		$O_2(g) + 2H^+ + e^- = H_2O_2$	+0,89

Перенос электронов чаще всего осуществляется за счёт железо-серных кластеров (передают один-два электрона). Данные кластеры имеют разное строение в зависимости того, в каком белке они представлены, но они всегда состоят из серы гистидина и ионов железа. В лабораторных условиях возможно получить такие кластеры, но для этого необходимо тщательно следить за условиями в которых, ведётся синтез, так как данные соединения неустойчивы в присутствии влаги и кислорода. Однако белки с железо-серными кластерами стабильны в водных растворах в присутствии кислорода.

3. Структурная функция. Иногда взаимодействие белков с ионами металла необходимо для стабилизации структуры доменов, способных распознавать определённые участки биомакромолекул. Например, ряд белков, участвующих в регуляции экспрессии генов, являются цинк-звисимыми металлизмами. Кроме того, стоит упомянуть домен «цинковые пальцы», распознающий определённые последовательности ДНК. В этом домене цинк организует аминокислотные остатки внутри белка, так что они становятся строго комплементарные участку нуклеиновой кислоты. Наконец, цинк является неотъемлемой частью РНК и ДНК полимераз.

Принцип работы нитрогеназы. Поговорим про свойства такого уникального белка как нитрогеназа, которая обеспечивает фиксацию молекулярного азота. В промышленности данный процесс осуществляется при высоких давлениях и температуры в присутствии катализатора. То есть данная реакция требует огромных затрат энергии. Однако природа научилась обходить эти ограничения за счёт нитрогеназы, основным источником которой являются клубеньковые бактерии. Процесс протекает при комнатной температуре и 1 атм.

Нитрогеназа состоит из двух субъединиц, одна субъединица содержит крупный железо-серный кластер (до 10ти атомов железа), а вторая - небольшой железо-серный кластер и молибден-серный кластер. Рассмотрим механизм фиксации азота (Рисунок 13.1).

Сначала происходит образование гидрида металла (активация электронов). $\text{Mo-OH} + \text{ATF} \rightarrow \text{Mo-H}$. Гидрид металла сам по себе не устойчив и крайне реакционноспособный, однако в ферменте эту группу удаётся стабилизировать и использовать в качестве восстановителя. Затем протекает координация N_2 с биядерным активным центром, содержащим Mo и Fe, причём N_2 связывается с Fe с образованием линейного комплекса. Комплекс Fe-N_2 подвергается гидридной атаке Mo-H с образованием биядерного комплекса, в котором N_2 восстановлен до диазена, гораздо более реакционноспособного, чем азот. Последующий перенос электрона даёт вначале биядерный гидразиновый комплекс, а затем координированный с атомами металлов NH_3 , обладающий низким сродством к активному центру и легко уходящий.

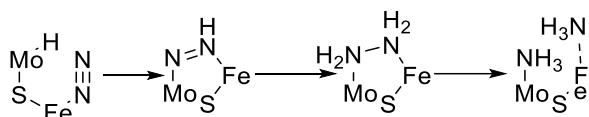


Схема 13.1. Принцип работы нитрогеназы.

Фотосинтез. В процессе фотосинтеза так же огромную роль играет металлобелок, хлорофилл. Хлорофилл содержит протопофириновый комплекс с магнием. Казалось бы, магний малопригоден для подобных процессов, ведь его координационным полиэдром является тетраэдр, в то время как протопорфириновое кольцо способствует образованию квадратной геометрии окружения металла. Однако именно это несоответствие и лежит в основе реакции фотосинтеза. Из-за сильных искажений координационной сферы магния при образовании комплекса с протопорфериновым кольцом, магний оказывается вне плоскости порфирина, что приводит к появлению пятой вакансии, которую занимает либо молекула воды, либо другая молекула хлорофилла (за счёт наличия кето-группы). Так образуются «хлорофилловые антенны», комплексы, состоящие из нескольких молекул хлорофилла. При облучении светом в такой «антенны» возникает неспаренный электрон, который передаётся по хиноидной структуре образованной кето-группами молекул хлорофилла для дальнейшего участия в цикле Кальвина.

Органомеркурилиаза и меркурионредуктаза. Попадание ртути в окружающую среду приводит к отравлению живых организмов, что требует от природы поиска новых способов противостоять действию этих токсичных соединений. Такими способами стали ферменты органомеркурилиаза и меркурионредуктаза. Органомеркурилиаза катализирует реакцию превращения алкилмеркургалогенидов (самые токсичные соединения ртути) в алкены и галогениды ртути (гораздо менее токсичные соединения). Меркурионредуктаза же катализирует реакцию восстановления ртути(II) до металлической ртути, за счёт образования меркаптопроизводных. Ртутьсвязывающий белок связывает ртутьорганику и переносит на транспортный белок, который в свою очередь доставляет их в цитоплазму бактерий, где и происходит восстановление.

Механизмы с участием ионов металла. К ним относятся:

- Конформационные влияния.

- Генерация сильного нуклеофильного центра (увеличение кислотности воды). При этом нуклеофильность гидроксил-иона падает незначительно.
- Катализ нуклеофильной атаки. За счёт образования более благоприятных электростатических взаимодействий в комплексе и протекании классического электрофильного катализа, который почти всегда происходит при участии ионов металла.
- Изменение окислительно-восстановительных свойств лиганда. Координация часто делает лиганд более устойчивым по отношению к внешним окислителям. Если ион металла сам является окислителем то координация будет способствовать его окислению.
- Маскирование реакционной способности лигандов в комплексе (Схема 13.2). При координации может чувствовать электронная пара, необходимая для другой реакции, то есть происходит нейтрализация её активности. Лицанд может в результате координации приобрести неблагоприятную для реакции ориентацию. При координации может произойти изменение окислительно-восстановительных потенциалов. Лицанд при координации может перейти в другую ионную и таутомерную форму, которая обладает меньшей реакционной способностью.

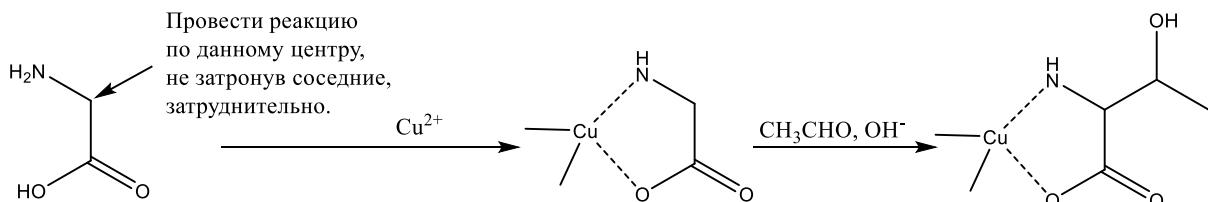


Схема 13.2. Принцип маскирования реакционной способности лигандов в комплексе на примере образования комплекса с медью.

Калиевый канал. Калиевый канал обладает уникальным свойством пропускать крупный ион калия и задерживать мелкий ион натрия, что, казалось бы, невозможно. Он представляет из себя канал, стенки которого образованы сериновыми атомами кислорода, расположенным в точности на том же расстоянии, на котором расположены молекулы воды в гидратированных ионах калия. Таким образом, при прохождении иона калия молекулы воды в его акватированном ионе последовательно заменяются атомами кислорода калиевого канала. В случае же иона натрия, расстояние между молекулами воды в его акватированном ионе сильно меньше. Для того, чтобы гидратированный ион натрия смог связаться с атомами кислорода калиевого канала требуется *слишком много энергии, поэтому ионы натрия через такие каналы не проходят*.



ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ