

Лекция 4

- Свойства ферментов
- Кинетика ферментативных реакций
- Механизм функционирования ферментов
- Механизм реакции, катализируемой химотрипсином
- Классификация ферментов

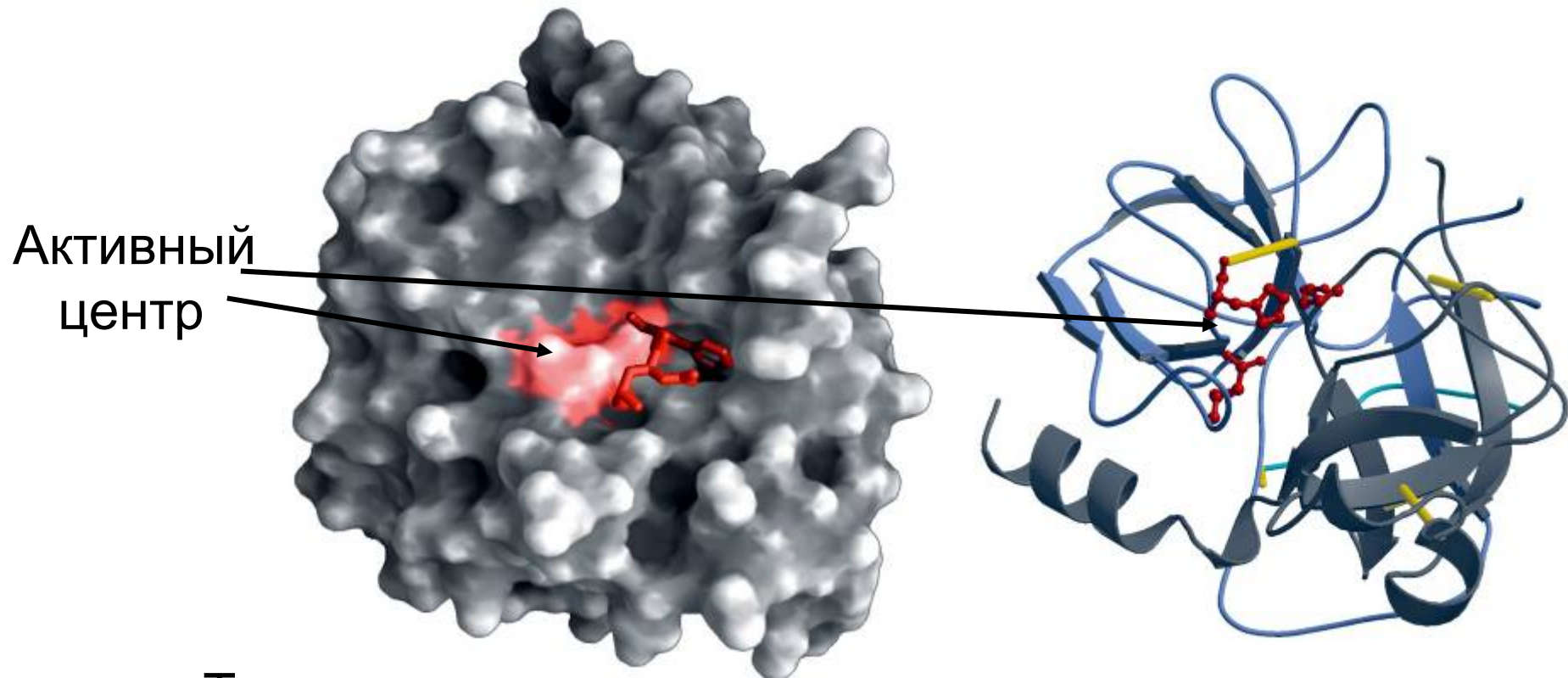
Свойства ферментов

Ферменты – биологические катализаторы, обеспечивающие катализ метаболических реакций

1. Ферменты обладают высокой эффективностью (ускоряют реакции в среднем в 10^6 - 10^{12} раз)
2. Ферменты характеризуются высокой специфичностью по отношению к субстрату и типу катализируемой реакции
3. Ферменты осуществляют катализ в узком диапазоне физиологических значений температур и pH
4. Ферменты в основном являются белками
5. Активность большинства ферментов регулируется

Активный центр ферментов

Активный центр фермента – часть молекулы белка, включающая аминокислотные остатки, расположенные в пространстве определенным образом и обеспечивающие связывание субстрата и катализ



Трехмерная структура химитрипсина

Стадии ферментативного процесса



E - фермент

S - субстрат

ES - фермент-субстратный комплекс

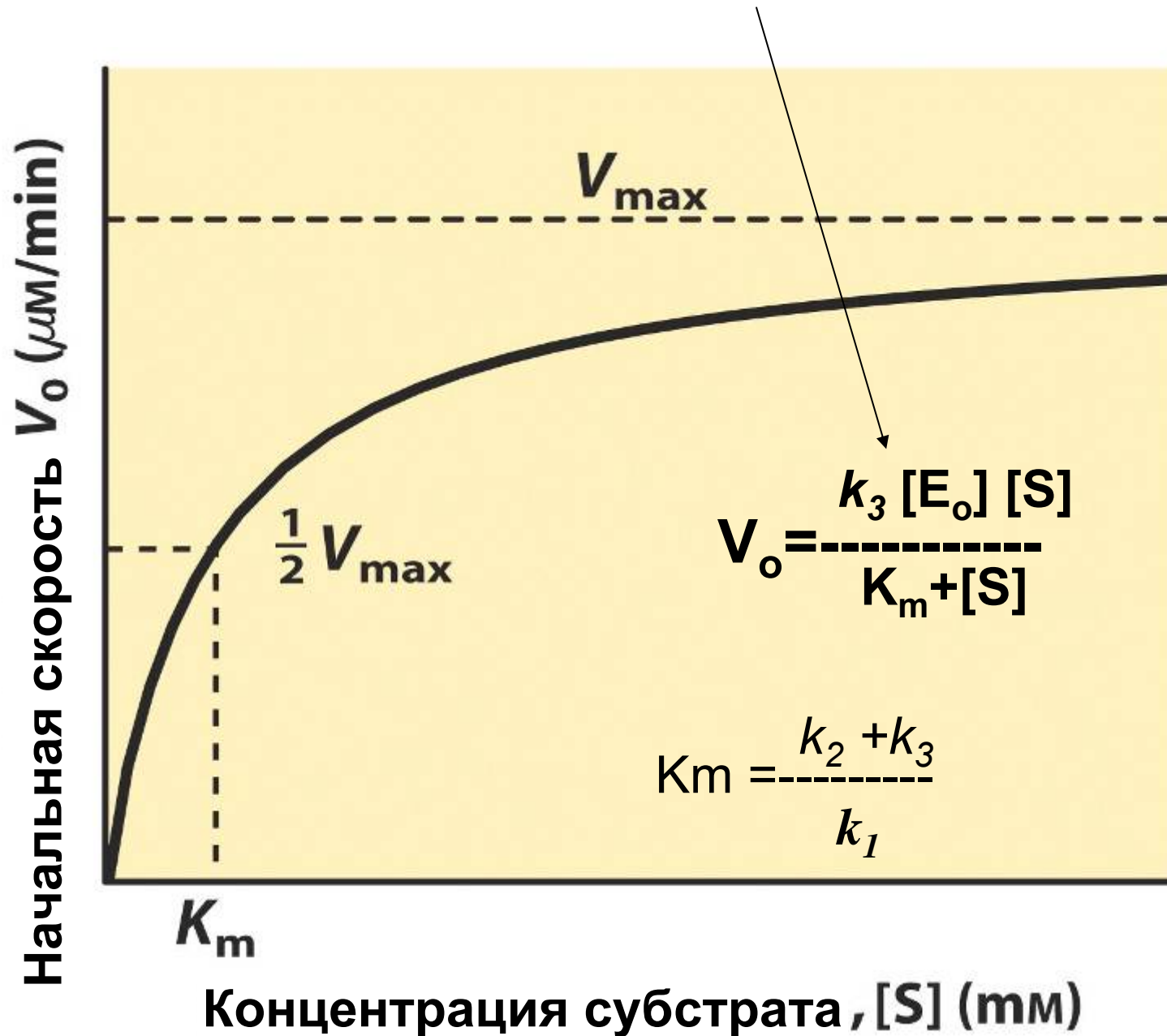
P - продукт

При условии, что: 1. $[E_0] \gg [S]$

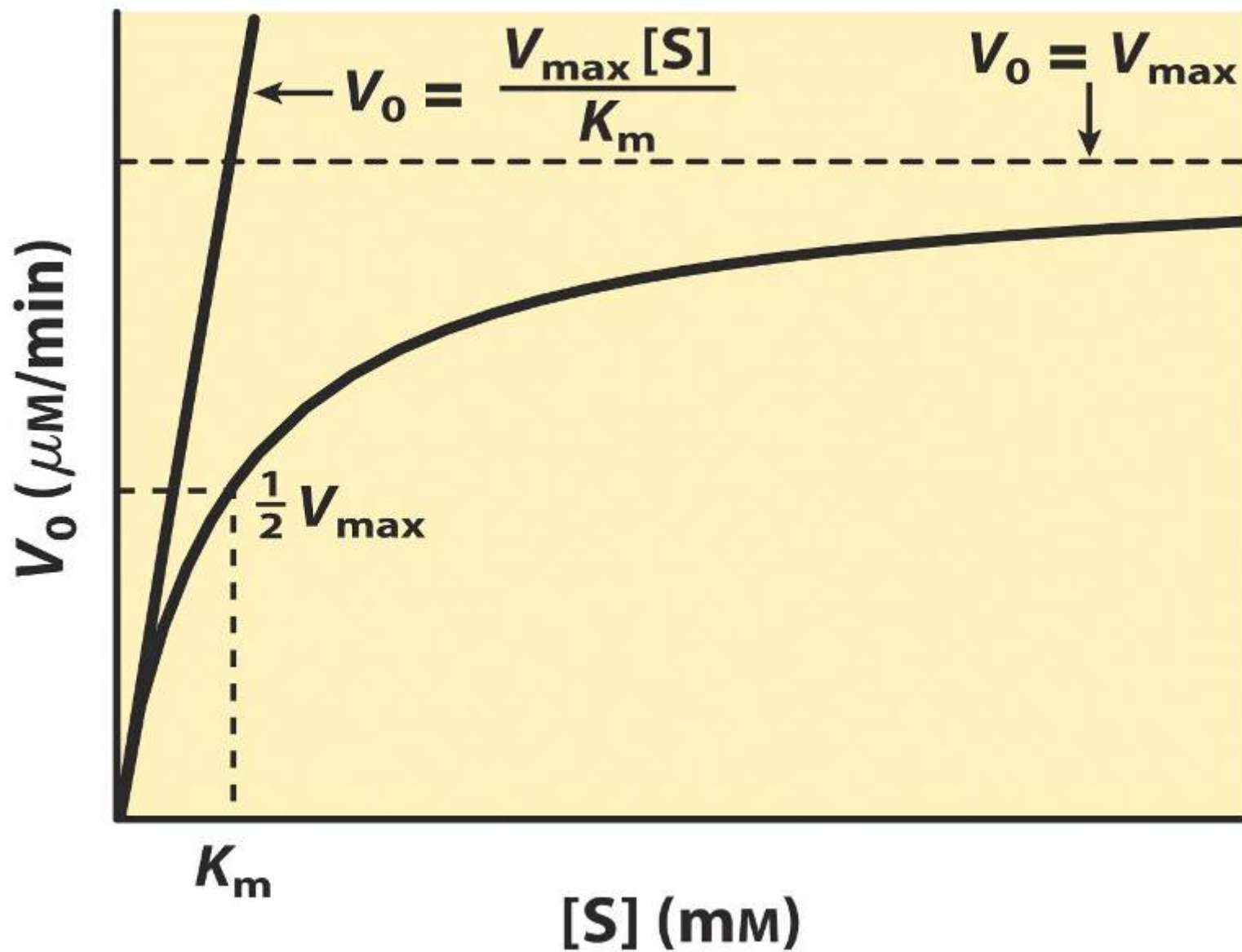
2. $[ES]=\text{const}$

Зависимость скорости реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен

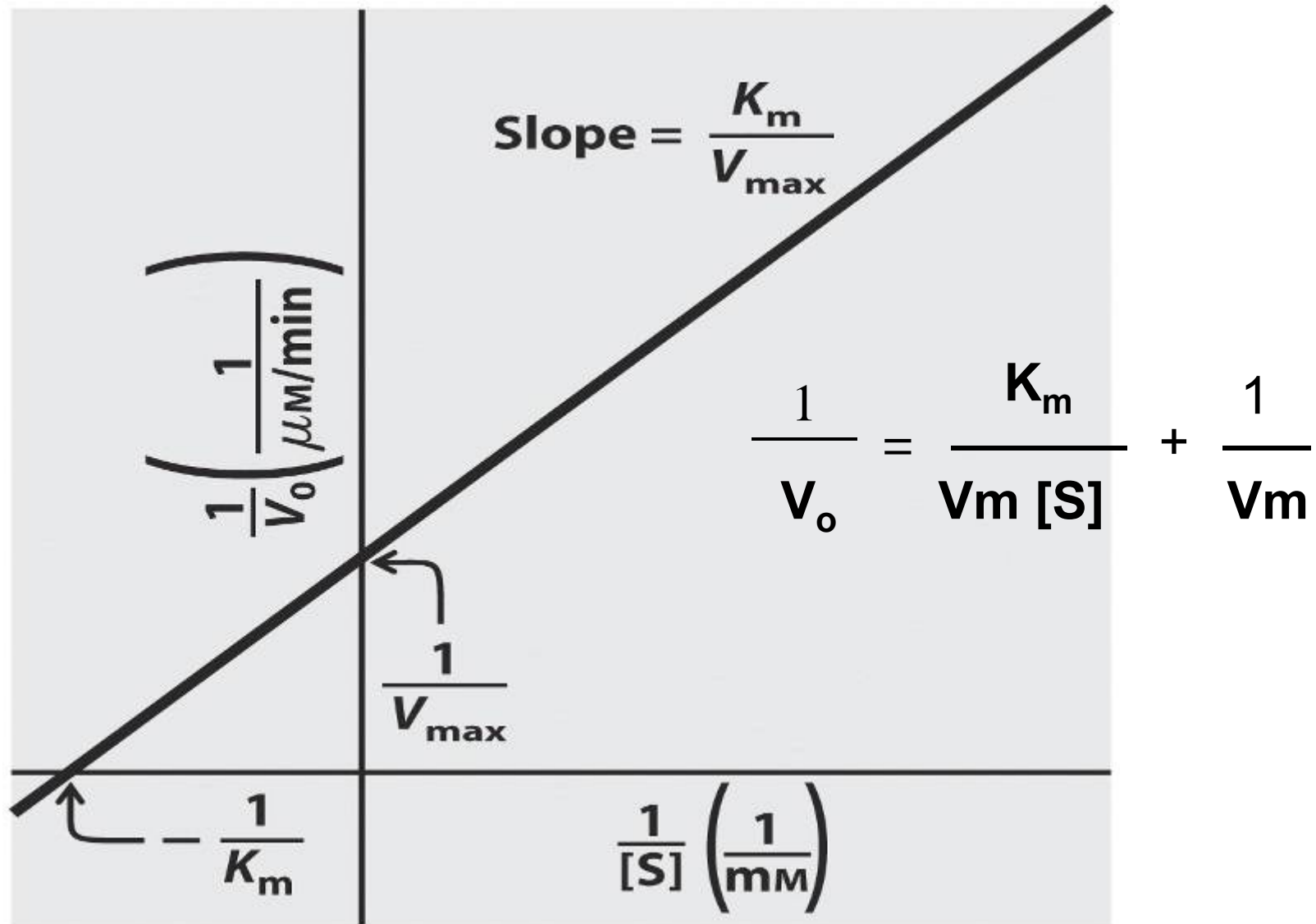
Уравнение Михаэлиса-Ментен



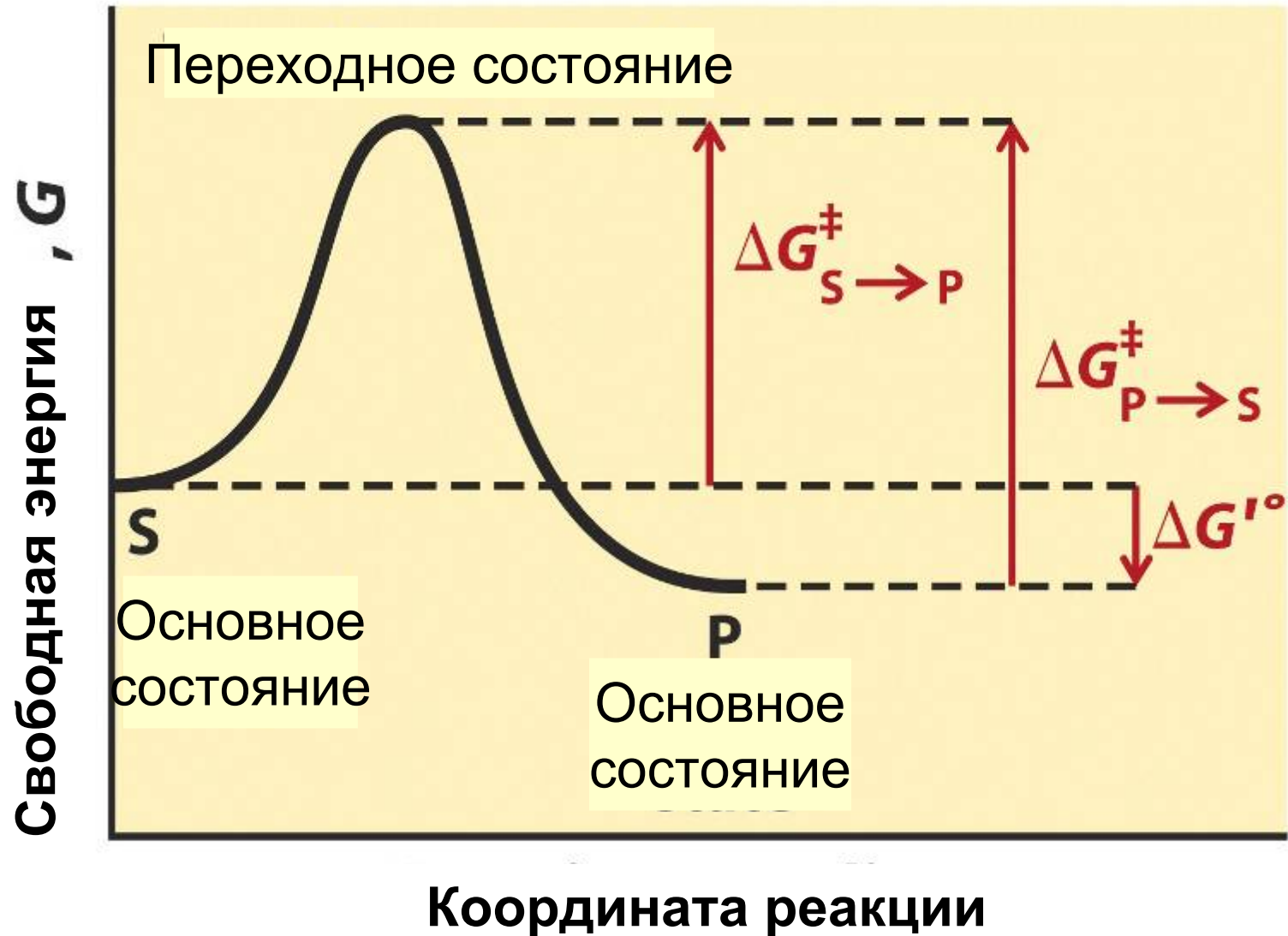
Уравнение Михаэлиса-Ментен: V_m и K_m



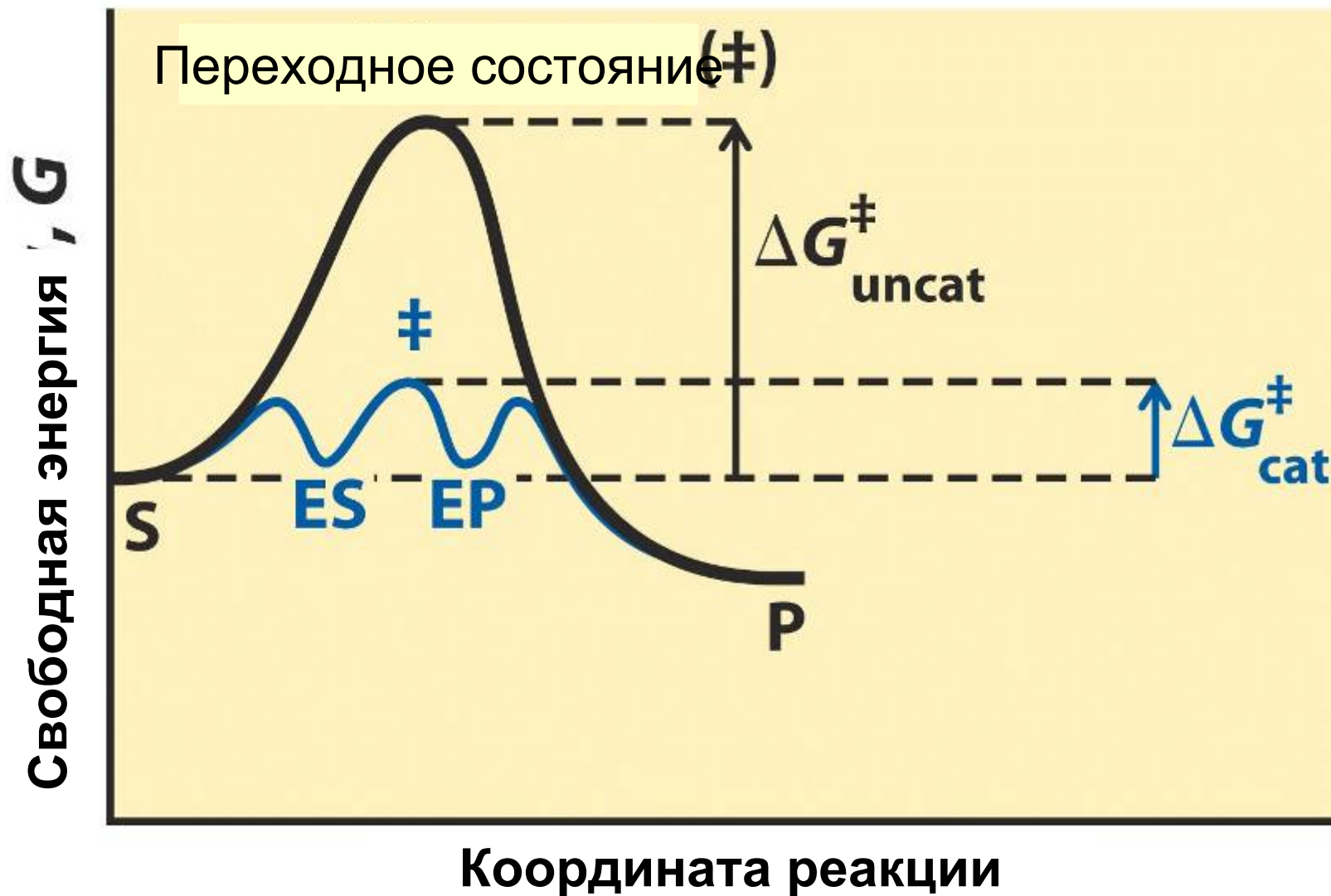
Решение уравнение Михаэлиса-Ментен в двойных обратных координатах



Энергия активации реакции



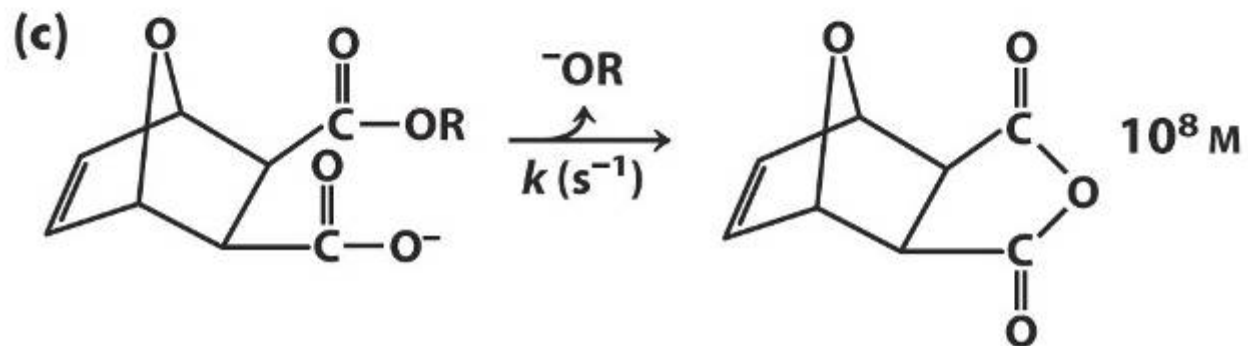
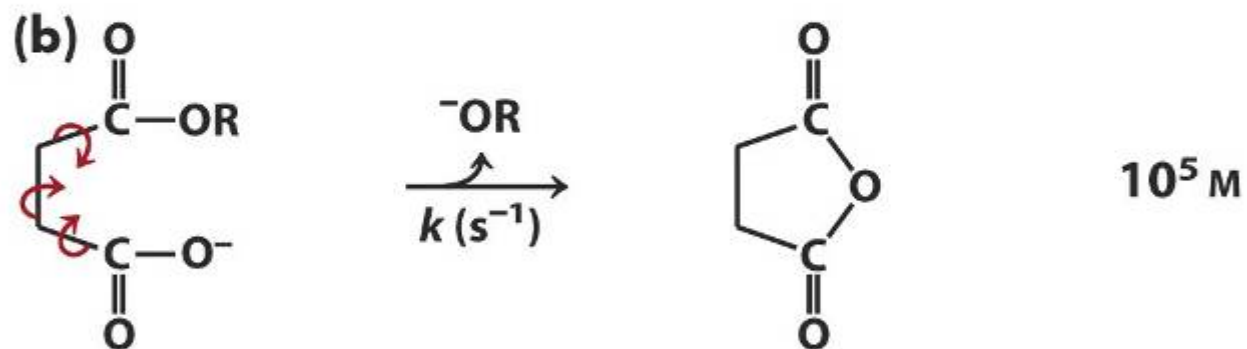
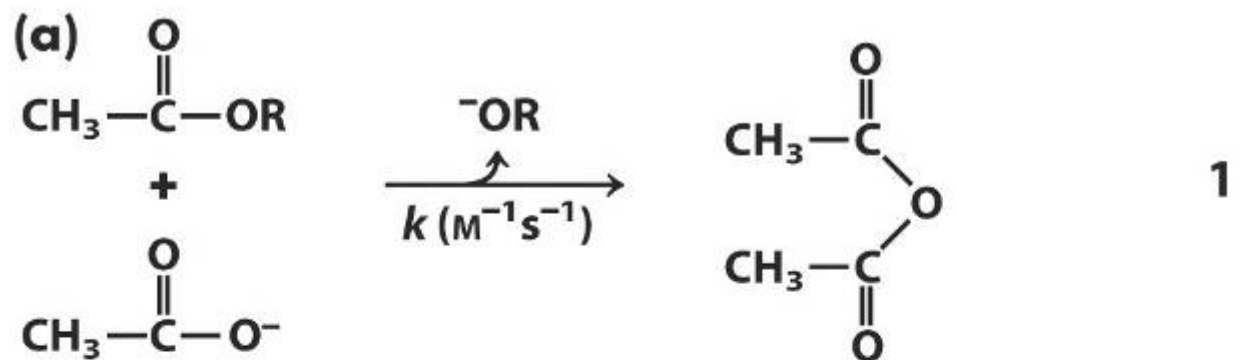
Роль энергии связывания в катализе



Увеличение скорости за счет снижения

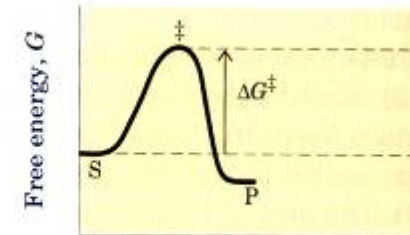
Реакция

Увеличение скорости

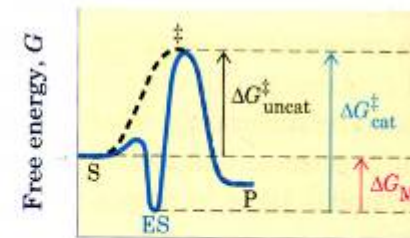
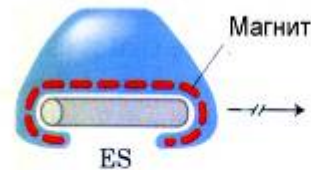


Схематичное представление фермент-субстратного комплекса

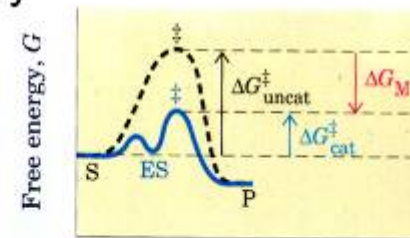
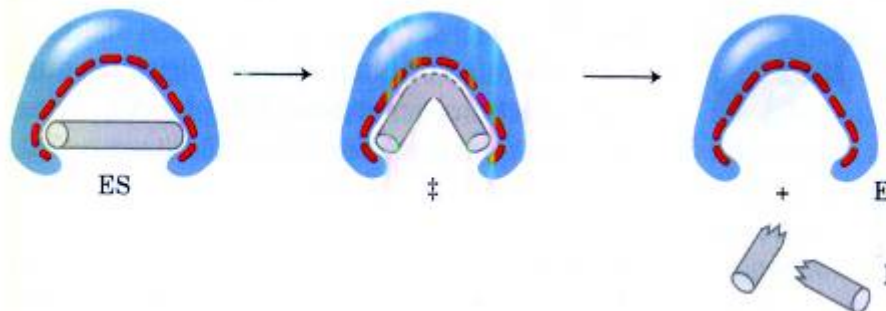
В отсутствие фермента



Фермент комплементарен субстрату



Фермент комплементарен переходному комплексу



Координаты реакции

Типы катализа, используемого ферментами

Большинство ферментов использует комбинацию нескольких стратегий катализа, наиболее часто это **ковалентный** катализ, **общий кислотно-основной** катализ и катализ с использованием **ионов металлов**.

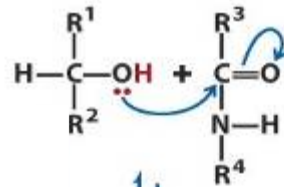
1. При **ковалентном катализе** происходит образование ковалентных связей между ферментом и субстратом, например, при гидролизе связи между А и В вместо реакции:



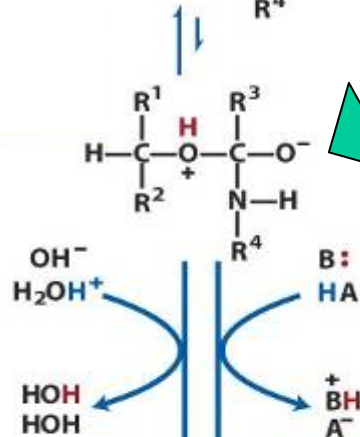
В присутствии фермента, имеющего нуклеофильную группу X:, реакция идет следующим образом:



Если новый путь имеет меньшую энергию активации, чем некаталитический, то новые стадии протекают быстрее, чем реакция в отсутствие катализатора.

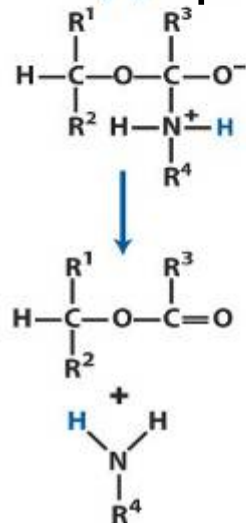


Кислотно-основной катализ



Без катализатора нестабильный (заряженный) интермедиат распадается

Если транспорт H⁺ от или к воде происходит быстрее, чем распад интермедиата, то интермедиат не распадается



Если транспорт H⁺ от или к воде происходит медленнее, чем распад интермедиата, то нужны дополнительные доноры (HA) или акцепторы B: H⁺ для стабилизации интермедиата

Аминокислоты – доноры и акцепторы H⁺

Аминокислоты	Доноры протона	Акцепторы протона
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$ \begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagdown \quad \diagup \\ HN \quad \quad NH^+ \\ \diagup \quad \diagdown \\ C \\ \\ H \end{array} $	$ \begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagdown \quad \diagup \\ HN \quad \quad N: \\ \diagup \quad \diagdown \\ C \\ \\ H \end{array} $
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$ \begin{array}{c} \text{R} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{R} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{O}^- \end{array} $

Катализ с использованием ионов металлов

Металлы, прочно связанные с ферментом или с субстратом, могут принимать участие в катализе несколькими способами.

1. Ионные взаимодействия между ионом металла, связанным с ферментом, и субстратом помогают ориентировать субстрат надлежащим образом или стабилизируют заряженное переходное состояние (интермедиат) реакции.
2. Металлы обеспечивают катализ окислительно-восстановительных реакций за счет обратимого изменения окислительного состояния иона металла. Почти треть всех известных Ферментов нуждается для проявления каталитической активности в одном или более ионах металлов

Специфичность действия различных пептидаз

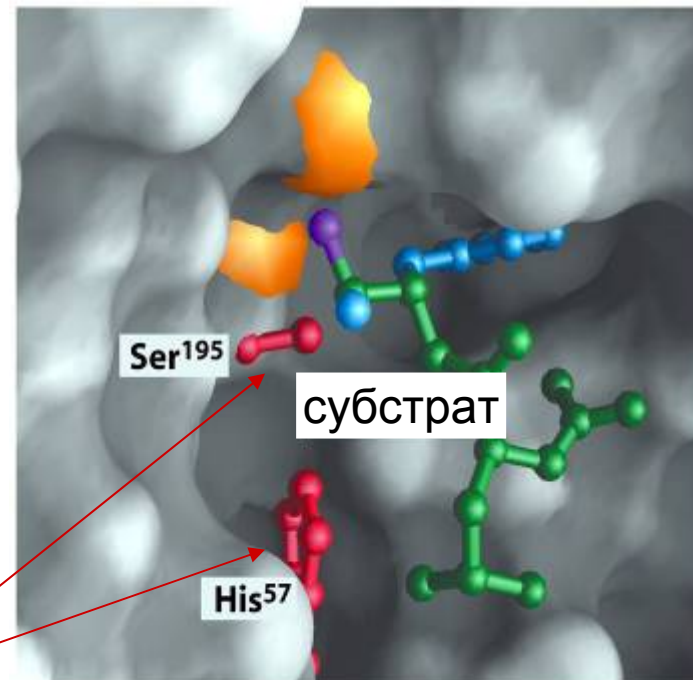
- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| •Трипсин | Lys, Arg (C) |
| •Химотрипсин | Phe, Trp, Tyr (C) |
| •V8 (Staphylococcus aureas) | Asp, Glu (C) |
| •Пепсин | Phe, Trp, Tyr (N) |

Механизм действия химотрипсина



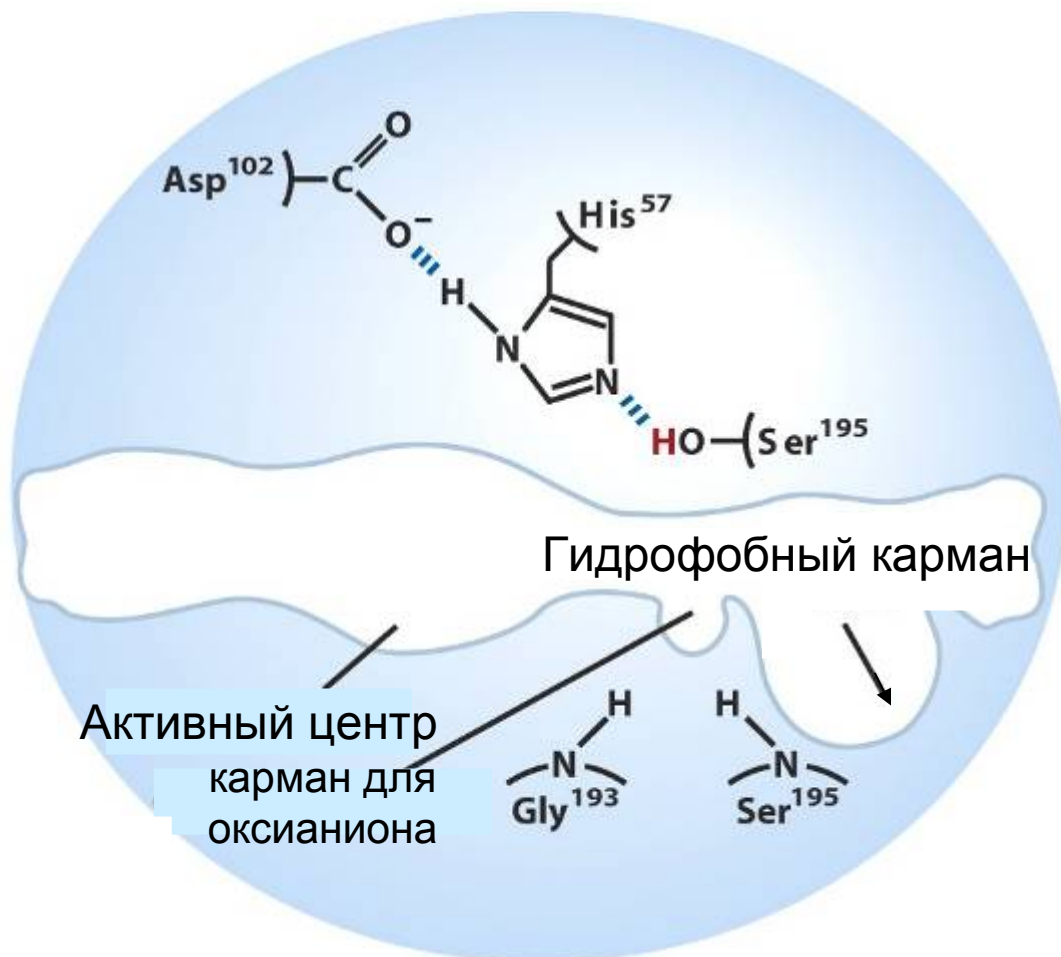
Химотрипсин – протеаза, катализирующая гидролиз пептидной связи, рядом с которой находится ароматическая аминокислота (Trp, Phe, Tyr). Реакция, катализируемая химотрипсином, иллюстрирует принцип *стабилизации переходного состояния* и является классическим примером *общего кислотно-основного катализа* и *ковалентного катализа*.

Каталитический цикл состоит из двух фаз, в первой из которых разрывается пептидная связь субстрата и образуется эфирная связь между карбонильным углеродом пептида и ОН-группой Ser¹⁹⁵: формируется ацил-фермент (интермедиат). Во второй фазе происходит гидролиз эфирной связи регенерация свободного фермента

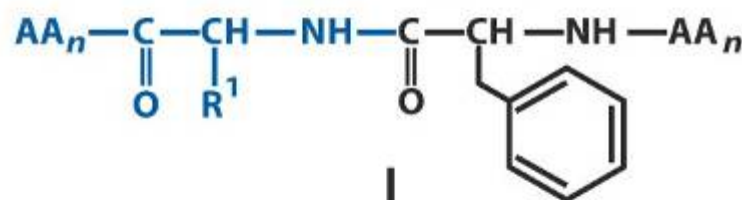


Аминокислоты активного центра химотрипсина

Активный центр и субстрат химотрипсина

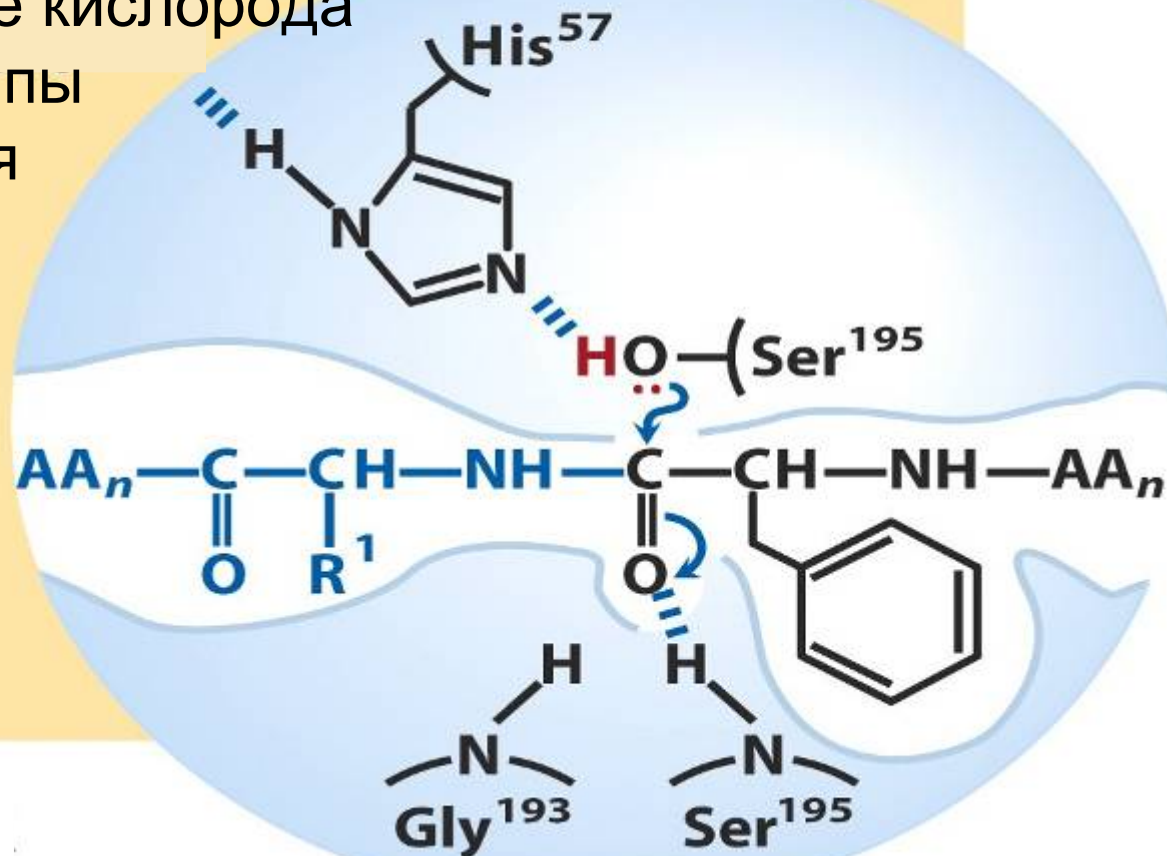


Субстрат (полипептид)



Стадия 1: образование комплекса ES

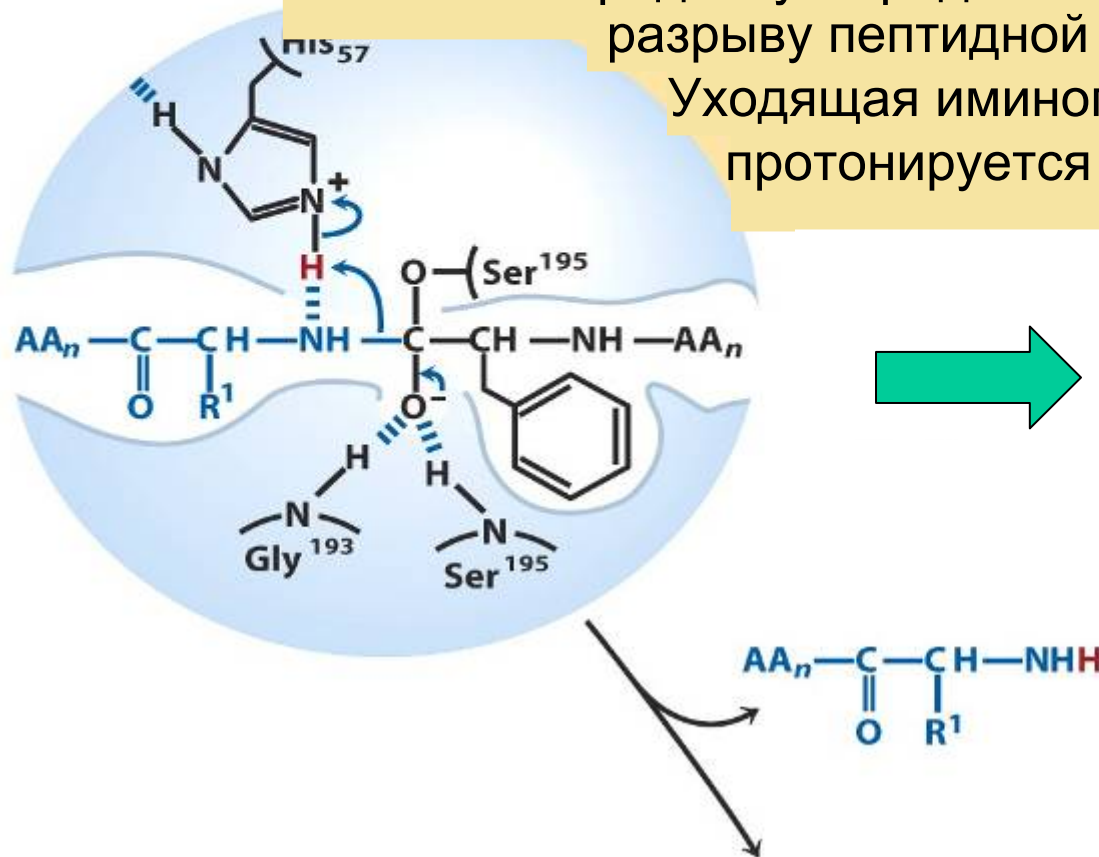
Взаимодействие Ser¹⁹⁵ и His⁵⁷ приводит к образованию сильного нуклеофила (электронная пара кислорода), который атакует карбонильную группу пептида, образуя тетраэдрический ацил-фермент. На атоме кислорода карбонильной группы сосредотачивается короткоживущий отрицательный заряд, который стабилизируется атомами H от Gly¹⁹³ и Ser¹⁹⁵



ES комплекс

Стадия 2: освобождение продукта 1

Нестабильность, обусловленная наличием заряда на карбонильном кислороде субстрата, приводит к распаду тетраэдрического комплекса с восстановлением двойной связи кислорода с углеродом и разрыву пептидной связи. Уходящая иминогруппа протонируется His⁵⁷.

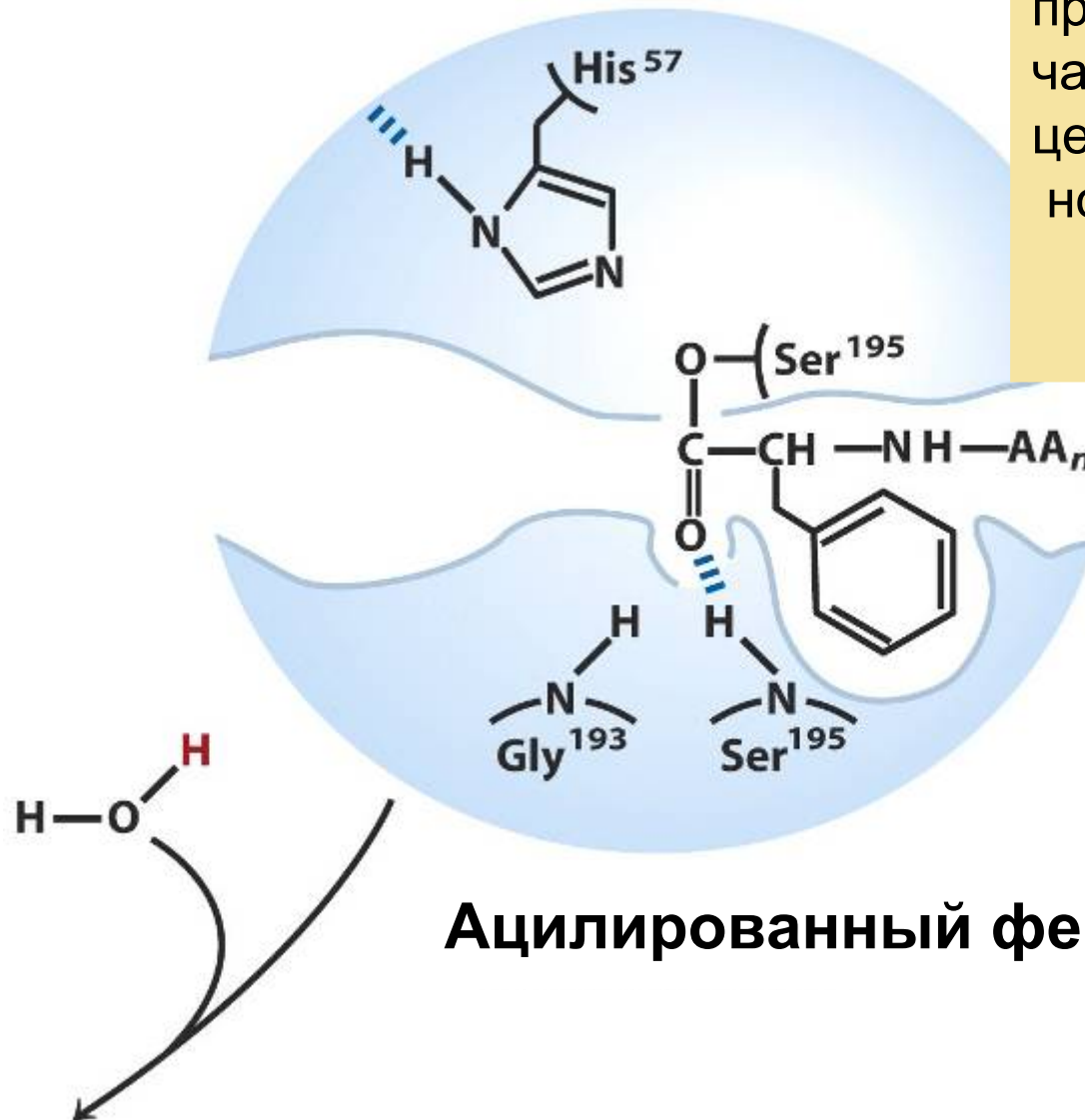


См. следующий слайд

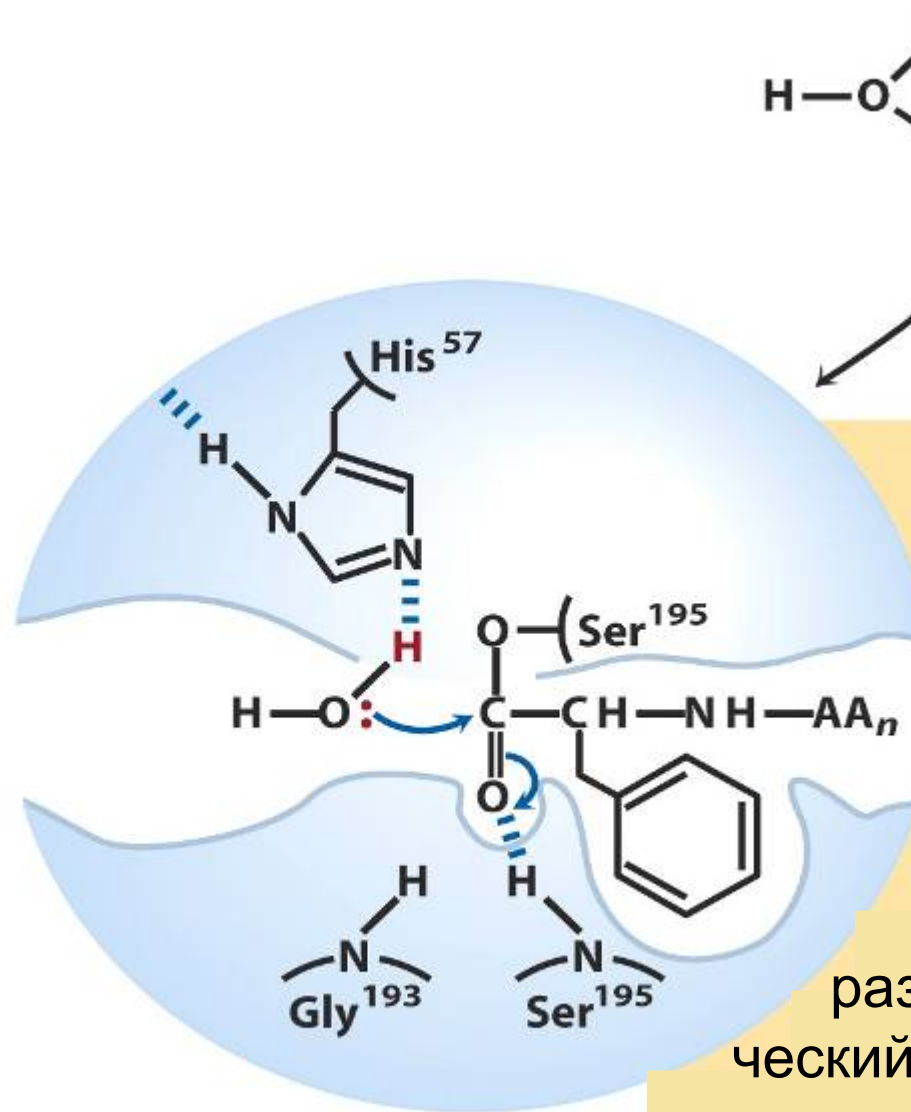
Продукт 1

Стадия 3: образование ацилфермента

После ухода первого продукта оставшаяся часть полипептидной цепи остается связанной с Ser¹⁹⁵ ковалентной связью (ацилфермент).

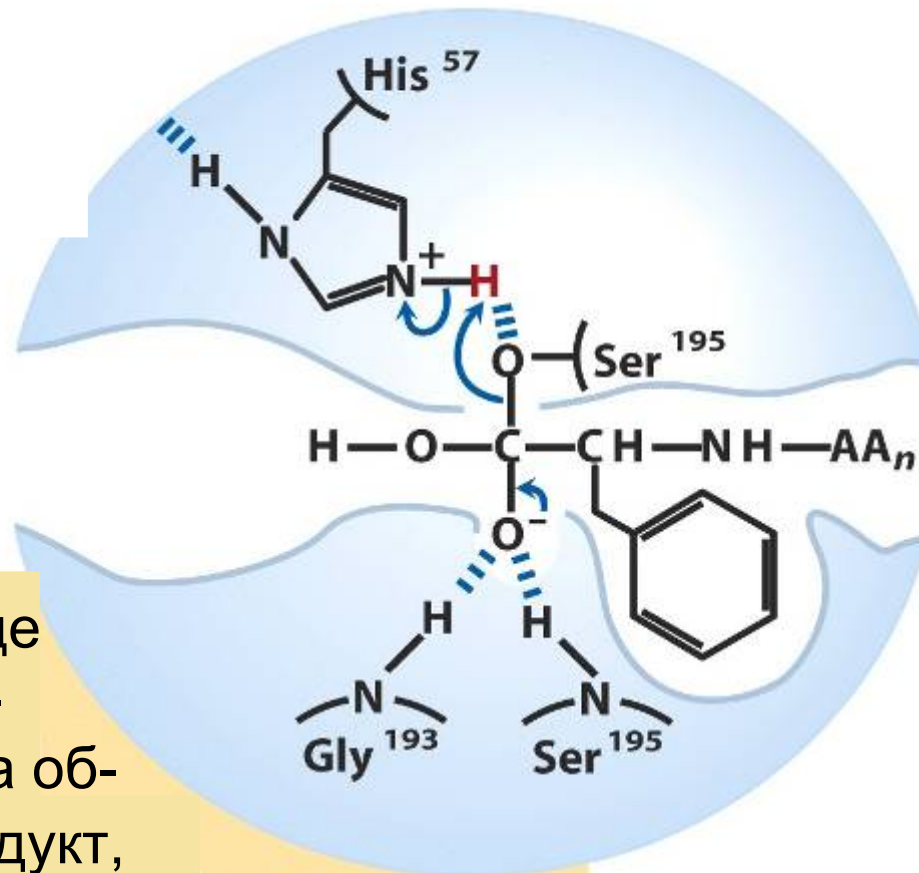


Стадия 4: связывание воды



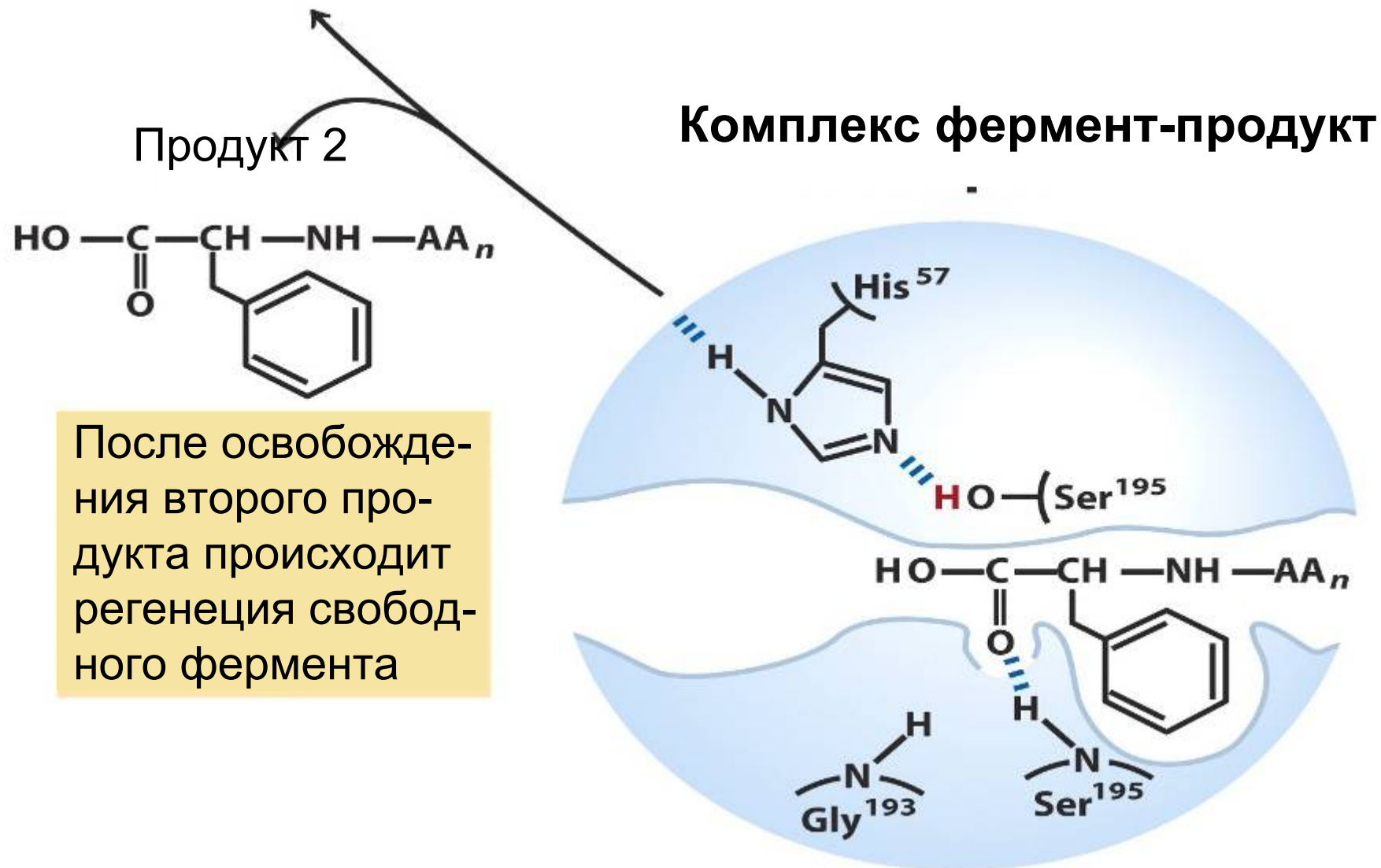
Приходящая молекула воды депротонируется за счет взаимодействия с His⁵⁷, образуя нуклеофильный гидроксид-ион. Этот ион атакует эфирную связь ацилфермента: образуется второй тетраэдрический интермедиат с кислородом, несущим отрицательный заряд

Стадия 5: деацилирование



При распаде второго интермедиата образуется второй продукт, карбогидрат-анион, и H от His⁵⁷ перемещается к Ser¹⁹⁵.

Стадия 6: образование комплекса фермент-продукт и освобождение продукта

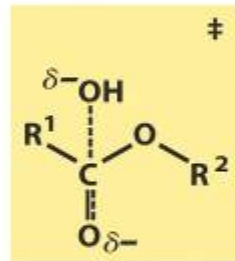
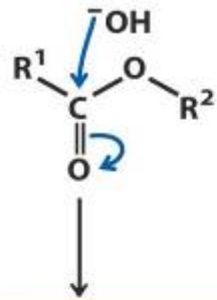


Корреляция между структурой субстрата и активностью фермента

		k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Субстрат А	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	0.06	31	2
Субстрат В	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	0.14	15	10
Субстрат С	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	2.8	25	114

Ожидаемые переходные состояния при гидролизе эфира и карбоната

эфир



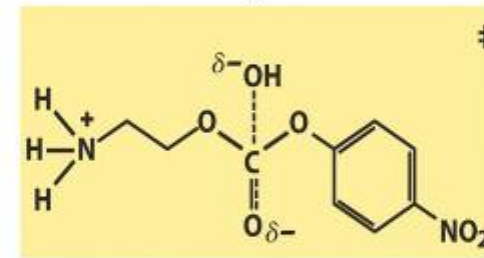
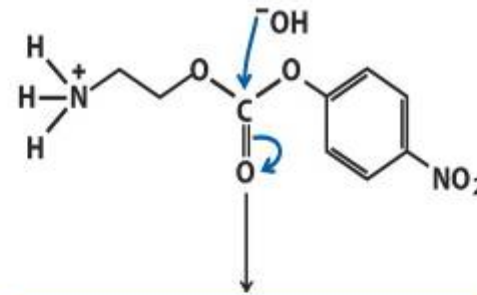
продукты

Переходное состояние



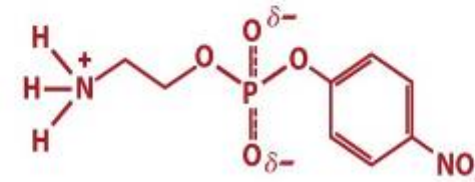
Аналог переходного состояния
Фосфонатный эфир

карбонат



Se
sti → продукты

Переходное состояние



Аналог переходного состояния
Фосфорный эфир

Можно синтезировать стабильные молекулы, являющиеся аналогами нестабильного переходного состояния некоторых ферментов.

Международная классификация ферментов

N Класс Тип катализируемой реакции

1. Оксидоредуктазы	Транспорт электронов (гидрид иона или атомов Н)
2. Трансферазы	Реакции переноса групп
3. Гидролазы	Реакции гидролиза
4. Лиазы	Присоединение групп по двойным связям или образование двойных связей при удалении групп
5. Изомеразы	Перенос групп внутри молекулы с получением изомеров
6. Лигазы	Образование C-C, C-S, C-O, C-N связей путем конденсации, сопряженное с распадом АТФ