

Лекция 12. МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Ферменты играют ключевую роль в метаболизме. Они ускоряют реакции, увеличивая их константы скоростей. Рассмотрим энергетический профиль обычной реакции (рис. 12.1), проходящей в растворе по механизму столкновений $A+B \rightarrow P$.

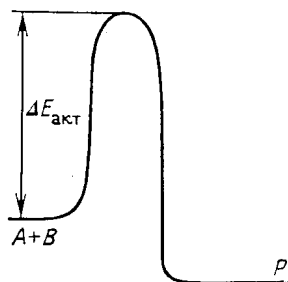


Рис. 12.1. Изменение энергии реагентов вдоль координаты реакции

Образование продукта P происходит, если энергия сталкивающихся молекул исходных веществ A и B превышает величину энергетического барьера. Очевидно, можно ускорить эту реакцию, если каким-то образом уменьшить величину энергии активации.

Общая схема ферментативной реакции, включает, как мы знаем, образование единого фермент-субстратного комплекса, в активном центре которого и происходит разрыв старых и образование новых связей с появлением продукта. В различных теоретических моделях механизма действия ферментов предлагаются

разные способы понижения барьера реакции в фермент-субстратном комплексе. В результате фиксации субстрата на ферменте происходит некоторое снижение энтропии реагентов по сравнению с их свободным состоянием. Само по себе это облегчает дальнейшие химические взаимодействия между активными группами в фермент-субстратном комплексе, которые должны быть взаимно строго ориентированы. Предполагается также, что избыток энергии сорбции, который выделяется при связывании субстрата, не переходит полностью в тепло. Энергия сорбции может быть частично запасена в белковой части фермента, затем сконцентрироваться на атакуемой связи в области образовавшихся фермент-субстратных контактов. Таким образом, постулируется, что энергия сорбции идет на создание низкоэнтропийной энергетически напряженной конформации в фермент-субстратном комплексе и тем самым способствует ускорению реакции. Однако экспериментальные попытки обнаружить упругие деформации, которые могли бы храниться в белковой глобуле фермента, не диссипируя в тепло в течение достаточно длительного времени между каталитическими актами ($10^{-2} - 10^{-3}$ с), не увенчались успехом. Более того, нужная для катализа взаимная ориентация и сближение расщепляемой связи субстрата и активных групп в центре фермента происходят спонтанно, вследствие внутримо-

лекулярной подвижности разных, в том числе и активных, групп фермента и субстрата. Такое сближение не требует образования каких-либо энергетически неблагоприятных контактов. Этот вывод следует из анализа невалентных взаимодействий в активных центрах ряда ферментов (α -химотрипсин, лизоцим, рибонуклеаза, карбоксипептидаза). Таким образом, сама по себе напряженность конформации в фермент-субстратном комплексе не является необходимым источником энергии и движущей силой катализа.

В других моделях высказывается предположение о том, что в белковой глобуле происходит бездиссипативная передача энергии тепловых колебаний от наружных слоев белка к атакуемой связи в активном центре. Однако никаких серьезных доказательств этому нет, кроме утверждения, что фермент должен быть "устроен" так, что его структура обеспечивает когерентный характер распространения флуктуационных изменений конформации без тепловых потерь по определенным степеням свободы. Помимо отсутствия экспериментальных доказательств общим недостатком этих моделей является то, что в них не учитывается в явном виде важный фактор – спонтанная внутримолекулярная подвижность белка. Шаг вперед в этом отношении сделан в конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа. В ней появление продукта рассматривается как результат последовательных конформационных изменений в фермент-субстратном комплексе, индуцированных первоначальными изменениями электронного состояния в активном центре фермента. Вначале, в течение короткого времени ($10^{-12} - 10^{-13}$ с), происходят электронно-колебательные взаимодействия, затрагивающие только выделенные химические связи субстрата и функциональные группы фермента, но не остальную часть белковой глобулы.

Вследствие этого создается конформационно-неравновесное состояние, которое релаксирует к новому равновесию с образованием продукта. Процесс релаксации происходит медленно и носит направленный характер, включая стадии отщепления продукта и релаксации свободной молекулы фермента к исходному равновесному состоянию. Координата ферментативной реакции совпадает с координатой конформационной релаксации. Температура же влияет на конформационную подвижность, а не на число активных соударений свободных молекул реагентов, что просто не имеет места в уже сформированном фермент-субстратном комплексе. Вследствие больших различий в скоростях мы можем рассматривать отдельно быстрые электронные взаимодействия в активном центре, осуществляющиеся на коротких расстояниях, и более медленные конформационно-динамические изменения в белковой части. На первом этапе катализа стохастический характер динамики белковой глобулы фермента и диффузии субстрата к активному центру приводят к образованию строго определенной конфигурации, включающей функциональные группы фермента и химические связи субстрата. Например, в случае гидролиза пептидной связи для реакции необходима одновременная атака субстрата двумя группами активного центра – нуклеофильной и

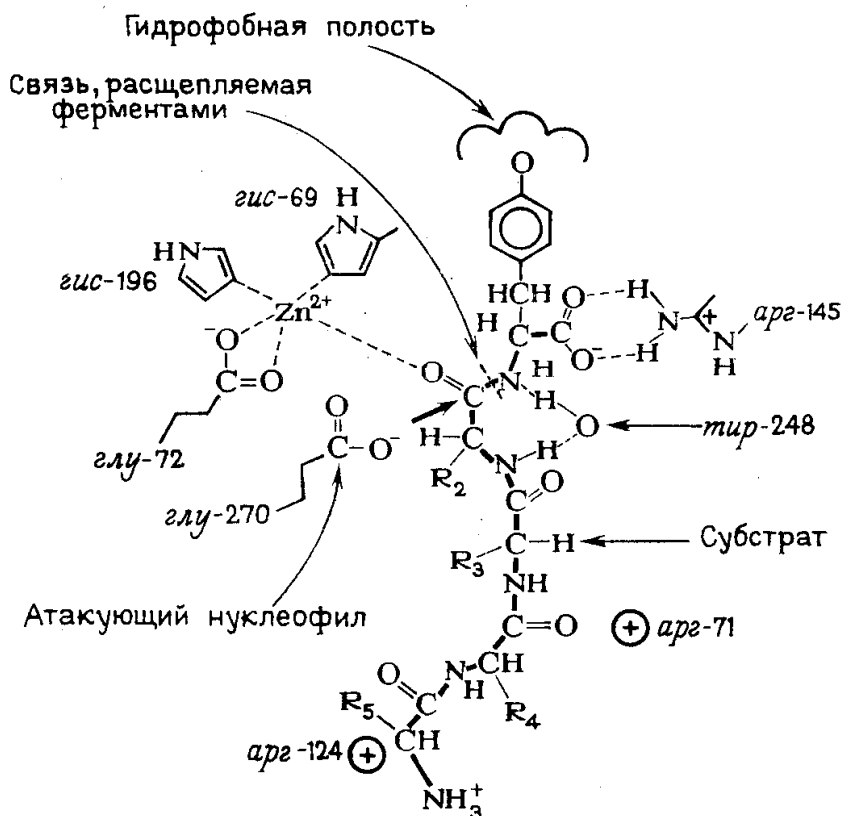


Рис. 12.2. Пример образования активной конфигурации или цепи перераспределения связей в случае гидролиза пептидной связи карбоксилазой А

электрофильной. На рис. 12.2 приведено взаимное расположение расщепляемой пептидной связи субстрата и боковых цепей Сер.-195, Гис-57. Атом O^{155} остатка Сер.-195 находится на расстоянии $2,8 \text{ \AA}$ против карбонильного углерода C^1 , а протон гидроксильной группы, не нарушая водородной связи с атомом N Гис-57, располагается на расстоянии $2,0 \text{ \AA}$ над атомом азота расщепляемой группы. При возникновении такой и только такой конфигурации происходит химический акт катализа. Формально это соответствует одновременному соударению нескольких молекул, что в растворе крайне мало вероятно.

Возникает вопрос: какова вероятность спонтанного формирования такого рода реакционноспособной конфигурации в плотно структурированной среде за счет конформационных флуктуаций нескольких групп, происходящих по законам ограниченной диффузии?

Расчеты показывают, что существует вполне определенная вероятность одновременного попадания нескольких групп в "реакционную"

область определенного радиуса, где они оказываются сближенными на короткие расстояния. Эта вероятность зависит главным образом от коэффициента диффузии и числа степеней свободы функциональных групп, "ищущих" друг друга в ограниченном пространстве. Например, при гидролизе пептидной связи необходимо создать благоприятную ориентацию для двух групп активного центра относительно определенных участков субстрата. Каждая из групп обладает тремя степенями свободы, а с учетом вибраций молекулы субстрата общее число степеней свободы

$N \sim 6 - 7$. Это в общем типично для ферментативных процессов. Оказывается, что в обычных условиях среднее время образования такой активной конфигурации составляет $\tau \sim 10^{-2} - 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, что совпадает с временами оборота фермента в условиях субстратного насыщения. В растворе для аналогичной реакции это время намного больше даже при больших коэффициентах диффузии. Причина состоит в том, что, попав в ограниченную область в плотноструктурированной среде, функциональные группы "находят" друг друга и сближаются на короткие расстояния раньше, чем они "разбегутся" в разные стороны, как это происходит в растворе. Вместе с тем величина $\tau \sim 10^{-2} - 10^{-4} \text{ с}$ намного больше, чем времена релаксаций отдельных групп, что является следствием достаточно жестких стерических условий для протекания реакции. Увеличение числа функциональных групп и необходимых одновременных контактов между ними увеличивает время достижения многоцентральной активной конфигурации. Общая скорость ферментативного катализа определяется именно временем образования нужной конформации при спонтанном сближении соответствующих групп в активном центре. Последующие за этим электронные взаимодействия происходят гораздо скорее и не лимитируют общую скорость катализа.

Существует ряд особенностей ферментов, облегчающих превращение субстрата в активном центре. Как правило, микросреда активного центра с его аминокислотными остатками более гидрофобна, чем окружающая водная среда. Это снижает значение диэлектрической постоянной активного центра ($\epsilon < 10$) по сравнению с водой ($\epsilon \sim 80$) и усиливает электростатические взаимодействия в гидрофобной среде между субстратом и полярными группами фермента. Кроме того, малополярная по сравнению с водой белковая среда частично экранирует переносимые заряды от действия полярного растворителя. Высокая же локальная концентрация диполей пептидных связей создает в активном центре электрические поля напряженностью порядка тысяч и сотен тысяч В/см. Таким образом, ориентированные полярные группы создают внутриглобулярное электрическое поле, влияющее на кулоновские взаимодействия в активном центре.

Механизмы самих электронных переходов в активной конфигурации требуют для своей расшифровки привлечения методов квантовой химии. Перекрывание электронных орбиталей может привести к перераспределению электронной плотности, появлению дополнительного заряда на разрыхляющей орбитали атакуемой связи в субстрате и ее ослаблению. Именно это и происходит при гидролизе пептидной связи в тетраэдрическом комплексе (рис. 12.3). Стекание электронной

плотности от O_{195}^{γ} – $Ser - 195$ на разрыхляющую орбиталь в пептидной связи происходит за счет взаимодействия неподеленной пары электронов O_{195}^{γ} с π -электронами атома C^1 пептидной связи. При этом неподеленная пара азота аминной группы выталкивается из пептидной связи $N=C^1$, которая утрачивает двойной характер и в результате ослабляется. Одновременно стекание электронной плотности от O_{195}^{γ} ослабляет и связь $H - O_{195}^{\gamma}$. Но тогда облегчается взаимодействие H фермента и N аминной группы и ее протонирование с переходом протона от O_{195}^{γ} к $Gis-57$. В свою очередь это опять увеличивает взаимодействие O_{195}^{γ} с пептидной группой и т. д. Таким образом, в тетраэдрическом комплексе создается уникальная ситуация, когда несколько мономолекулярных реакций протекают одновременно, взаимно ускоряя друг друга. Синхронное перемещение заряда и протона между $Ser-195$, $Gis-57$, пептидной связью обеспечивает высокую эффективность процесса. Каталитический акт сводит в единую кооперативную систему три отдельные бимолекулярные реакции, ведущие к разрыву пептидной связи – событию, маловероятному в растворе. В системе индицируются естественные конформационные перестройки и в итоге происходит деацилирование фермента и протонирование атома O_{195}^{γ} . Принцип образования полифункциональной замкнутой системы атомных групп в активной конфигурации выполняется и в других фермент-субстратных комплексах.

В ферментативном катализе многостадийный характер превращения субстрата, маловероятный в растворе, обеспечивается за счет синхронного кооперативного их протекания в единой полифункциональной системе. Замена малоэффективных последовательных активационных стадий скоординированным процессом приводит формально к снижению энергии активации всей реакции. Заметим еще раз, что, строго говоря физический смысл понятия «энергия активации» в ферментативных процессах не соответствует таковому для реакций в растворах, идущих по механизму активных столкновений свободных молекул.

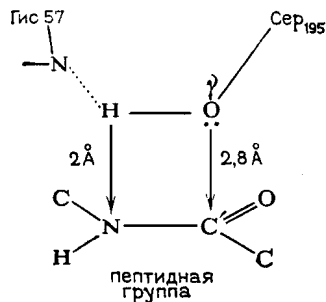


Рис. 12.3. Строение активного центра α -химотрипсина. Цифрами указаны межатомные расстояния (в Å)