МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

(к самостоятельной работе)

Структура и функции ферментов, а также механизм их действия почти ежегодно подробно обсуждаются на многих международных симпозиумах и конгрессах. Важное место отводится рассмотрению структуры всей молекулы фермента и ее активных центров, молекулярному механизму действия различных типов ферментов, общей теории энзиматического катализа. Тем не менее до сих пор нет полной ясности по двум кардинальным проблемам энзимологии: чем вызваны специфичность действия и высокая каталитическая эффективность ферментов?

До установления химической природы ферментов гипотезы о механизме их действия опирались на исследования кинетики и модельные опыты химического гомогенного катализа. Повышение скорости химических реакций под действием ферментов объясняли следующим: а) активированием субстрата в результате образования адсорбционных или молекулярных, обратимо диссоциирующих фермент-субстратных комплексов; б) цепным механизмом реакций с участием радикалов или возбужденных молекул. Оказалось, что цепные механизмы реакции не играют существенной роли в биологическом катализе. После установления химической природы ферментов подтвердилось представление, выдвинутое более 80 лет назад В. Анри, Л. Михаэлисом и М. Ментен, о том, что при энзиматическом катализе фермент E соединяется (в принципе обратимо) со своим субстратом S, образуя нестойкий промежуточный фермент-субстратный комплекс ES, который в конце реакции распадается с освобождением фермента и продуктов реакции P. Благодаря высокому сродству связывания и образованию ES-комплекса резко возрастает число молекул субстрата, вступающих в реакции. Эти представления легли в основу теории «ключа-замка» Э. Фишера, которую иногда называют теорией «жесткой матрицы». Таким образом, жесткая структура активного центра оказывается комплементарной молекулярной структуре субстрата, обеспечивая тем самым высокую специфичность фермента.

Л. Михаэлис не только постулировал образование промежуточного фермент-субстратного ES-комплекса, но и рассчитал влияние концентрации субстрата на скорость реакции. В процессе реакции различают несколько стадий: присоединение молекулы субстрата к ферменту, преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных (переходных) комплексов и протекающее в одну или несколько стадий отделение конечных продуктов реакции от фермента. Это можно схематически проиллюстрировать следующими примерами:

$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow \ldots \rightarrow E + P.$$

В реакциях анаболизма, например A + B —> AB, фермент может соединяться как с одним, так и с другим субстратом или обоими субстратами:

В реакциях катаболизма, например AB —> A + B:

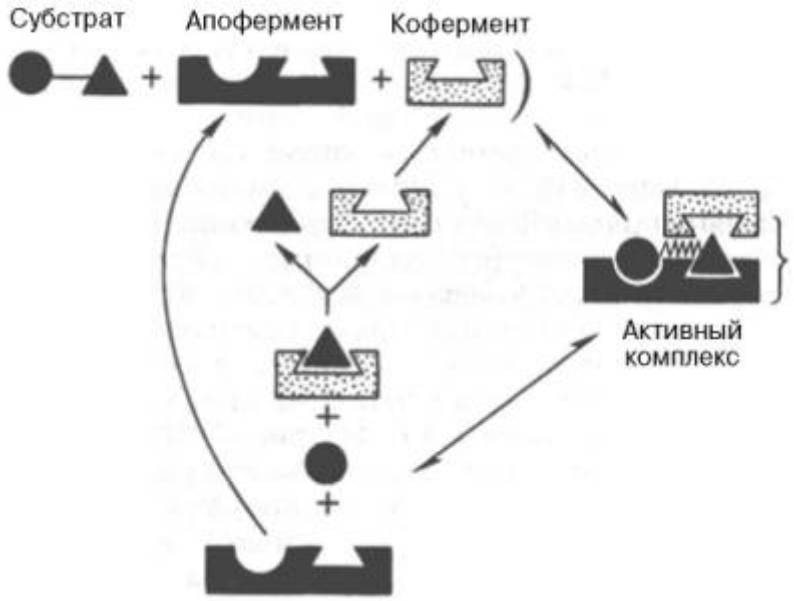
а) AB + E –> ABE
б) ABE –> A + BE
в) BE–>B + E

(а + б + в): AB + E –> A + B + E

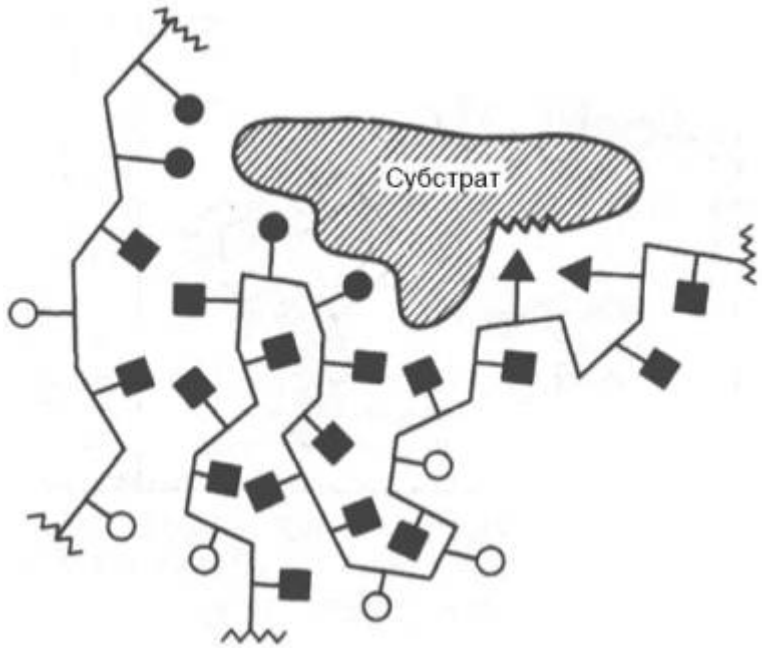
На рис. представлена схема образования промежуточного фермент-субстратного комплекса. Если фермент в активном центре содержит кофермент, то предполагается образование тройного комплекса (рис. 4.8).

Фермент вступает во взаимодействие с субстратом на очень короткий период, поэтому долгое время не удавалось показать образование такого комплекса. Прямые доказательства существования фермент-субстратного комплекса были получены в лабораториях Д. Кейлина и Б. Чанса. В настоящее время экспериментальные и математические методы кинетики, термодинамики и статической механики химических реакций позволяют

Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок».



Функция кофермента (по А. Кантарову и Б. Шепартцу).

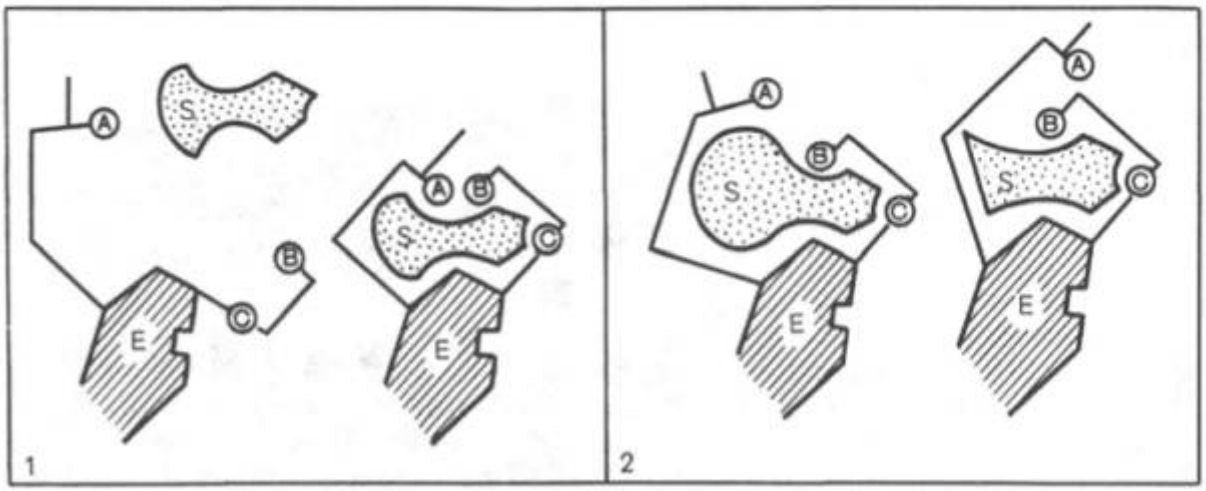


Образование не-ковалентных связей между ферментом и субстратом (схема).

определить для ряда ферментативных реакций кинетические и термодинамические показатели, в частности константы диссоциации промежуточных фермент-субстратных комплексов, константы скорости и равновесия их образования.

В образовании фермент-субстратных комплексов участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а в ряде случаев также ковалентные, координационные связи. Информация о природе связей между субстратом и связывающим участком активного центра фермента может быть получена методами ЭПР и ЯМР, а также методами УФ- и ИК-спектроскопии.

Для каталитической активности фермента существенное значение имеет пространственная структура, в которой жесткие участки α-спиралей чередуются с гибкими, эластичными линейными отрезками, обеспечивающими динамические изменения белковой молекулы фермента. Этим изме-неням придается большое значение в некоторых теориях ферментативного катализа. Так, в противоположность модели Э. Фишера «ключ-замок» Д. Кошлендом была разработана теория «индуцированного соответствия», допускающая высокую конформационную лабильность молекулы белка-фермента и гибкость и подвижность активного центра. Эта теория была основана на весьма убедительных экспериментах, свидетельствующих о том, что субстрат индуцирует конформационные изменения молекулы фермента таким образом, что активный центр принимает необходимую для связывания субстрата пространственную ориентацию. Иными словами, фермент только в присутствии (точнее, в момент присоединения) субстрата будет находиться в активной (напряженной) Т-форме в отличие от неактивной R-формы. Видно из рисунка, что присоединение субстрата S к ферменту E, вызывая соответствующие изменения конформации активного центра, в одних случаях приводит к образованию активного комплекса, в других – неактивного комплекса вследствие нарушения пространственного расположения функциональных групп активного центра в промежуточном комплексе. Получены экспериментальные доказательства нового положения о том, что постулированное Д. Кошлендом «индуцированное соответствие» субстрата и фермента создается не обязательно изменениями



Изменения структуры активного центра фермента, вызванные субстратом, согласно модели «индуцированного соответствия» Д. Кошланда.

A, B, C - функциональные группы активного центра; 1 - активный комплекс; 2 - неактивный комплекс.

Энергетический механизм ферментативной и неферментативной химических реакций.

S - исходный субстрат; P - продукт; $\Delta E_{НФ}$ -энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{Ф}$ - энергия активации ферментативной реакции; ΔG - стандартное изменение свободной энергии.

конформации белковой молекулы, но также геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы субстрата.

В каталитическом процессе существенное значение имеют точное соответствие между ферментом и субстратом, а также термодинамические и каталитические преимущества подобного соответствия. Гипотеза «индуцированного соответствия» предполагает существование между ферментом и субстратом не только пространственной или геометрической комплементарности, но и электростатического соответствия, обусловленного спариванием противоположно заряженных групп субстрата и активного

центра фермента. Точное соответствие обеспечивает образование эффективного комплекса между субстратом и ферментом.

Подобно другим катализаторам, ферменты, с термодинамической точки зрения, ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации . Энергией активации называется энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние при данной температуре. Другими словами, это энергия, необходимая для запуска химической реакции, без которой реакция не начинается несмотря на ее термодинамическую вероятность. Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне. На рисунке видно, что ферментативная реакция имеет более низкую энергию активации. Следует отметить, что как катализируемая ферментом, так и не катализируемая им реакция независимо от ее пути имеет одинаковую величину стандартного изменения свободной энергии (ΔG). Действуя на скорость реакции, ферменты не изменяют равновесия между прямой и обратной реакциями, как и не влияют на величину свободной энергии реакции; они лишь ускоряют наступление равновесия химической реакции.

Зависимость между константой равновесия и изменением свободной энергии реагирующих веществ математически принято выражать уравнением $\Delta G = = -R \cdot T \cdot \ln K$, где R – газовая постоянная; T – абсолютная температура в Кельвинах; lnK – натуральный логарифм константы равновесия; ΔG – стандартное изменение свободной энергии, Дж/моль. Из представленного уравнения вытекает, что при высоком значении K величина ΔG оказывается отрицательной. Подобные реакции сопровождаются уменьшением свободной энергии. При низком значении K величина ΔG оказывается положительной. Если константа равновесия равна единице, то изменение свободной энергии будет равно нулю и реакция легкообратима.

Для измерения константы равновесия и величины свободной энергии какой-либо химической реакции, например реакции взаимопревращения глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат, катализируемой ферментом фосфоглюкомутазой, определяют количество глюкозо-6- и глюкозо-1-фосфата при достижении химического равновесия. В состоянии равновесия содержание глюкозо-6-фосфата оказывается в 19 раз больше количества глюкозо-1-фосфата. Отсюда константа равновесия K равна 19. Подставляя эту цифру в уравнение, получаем $\Delta G = -7329$ Дж/моль. Это означает, что при превращении 1 моля глюкозо-1-фосфата в 1 моль глюкозо-6-фосфата при температуре 25°C происходит уменьшение свободной энергии системы на 7329 Дж.

Таким образом, в механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется как тонкой трехмерной структурой активного центра, так и уникальной структурной организацией всей молекулы фермента, обеспечивающими высокую каталитическую активность и специфичность действия биокатализатора.