

## Лекція 2. Структура ферментів

Питання для розгляду

- 1) Активний центр, структура амінокислот, що утворюють активний центр;
- 2) Структура складних ферментів: холофермент, апофермент, простетичні групи.
- 3) Кофактори: класифікація, біохімічні функції
- 4) Хімічні механізми участі іонів металів у ферментативному каталізі. Окислювально-відновні реакції з участю іонів металів і їх роль у біологічних процесах.
- 5) Коферменти, володіючи окислювально-відновними властивостями (НАД, НАДФ, ФАД);
- 6) Коферменти, які не володіють окислювально-відновними властивостями (тіамінпірофосфат, піридоксальфосфат, тетрагідрофолієва кислота, біотин, кофермент А)
- 7) Чинники, що визначають каталітичну ефективність ферментів.

### Активний центр ферменту

**Формування активного центру.** Особливість ферментативного каталізу полягає в тому, що фермент специфічним чином зв'язує субстрат, і всі реакції протікають усередині фермент-субстратного комплексу. Область ферментативної молекули, у якій відбувається скріплення й перетворення субстрату, називається активним центром.

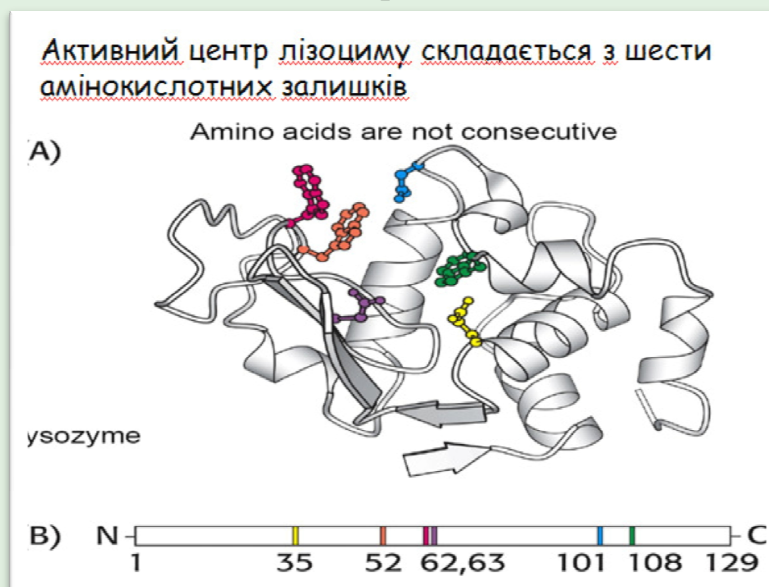


Рис.1 – Просторова будова активного центру ферментів

Активний центр формується із фрагментів поліпептидного ланцюга, зокрема, з окремих амінокислот, що містять різноманітні функціональні групи. Деякі з них беруть участь у сорбції субстрату на ферменті, інші - каталізують його хімічне перетворення. До каталітично активних радикалів білка відносяться нуклеофільні групи (імідазолу, гістидину, оксигрупа серину або тирозину,

тіольна група цистеїну, ε-аміногрупа лізину, іонізовані карбоксили аспарагінової і глютамінової кислот і ін.) і електрофіли (іон імідазолія, неіонізовані карбоксильні групи, іони металів і т. п.). У первинній структурі молекули ферменту групи активного центру зазвичай віддалені один від одного. Проте в третинній структурі амінокислотні залишки, що беруть участь у каталізі, фіксовані (орієнтовані) у стані, зручному для «одночасної» їхньої взаємодії із сорбованою молекулою субстрату. У формуванні активного центру беруть участь також молекули води, що входять у гідратаційні шари, а в ряді випадків іони металів, що пов'язані з білком, і органічні кофактори. Певну жорсткість такої конструкції додають α-спіралі, β-структури і дисульфідні містки.

Структурні особливості поверхневого шару білкових глобул дозволяють зосередити в активному центрі велике число різних по хімічній природі функціональних груп, здатних не тільки сорбувати субстрат на ферменті, але і взаємодіяти з ним хімічно.

Положення активного центру в молекулі білка визначається мотивом укладання ланцюга, а не бічними групами. Часто це вм'ятина в архітектурі білкової глобули. Така вм'ятина, кишеня автоматично сприяє оточенню субстрату одночасно багатьма бічними ланцюгами білка. Таким же звичайним місцем активного центру є місце стику доменів. Середовище активного центру відрізняється, як правило, сильно розвинутою мікрогетерогенністю. Це пов'язано з тим, що в утворенні поверхневого шару білка беруть участь не тільки заряджені та полярні амінокислотні залишки, але також частково й аполярні (вуглеводневі) бічні групи.

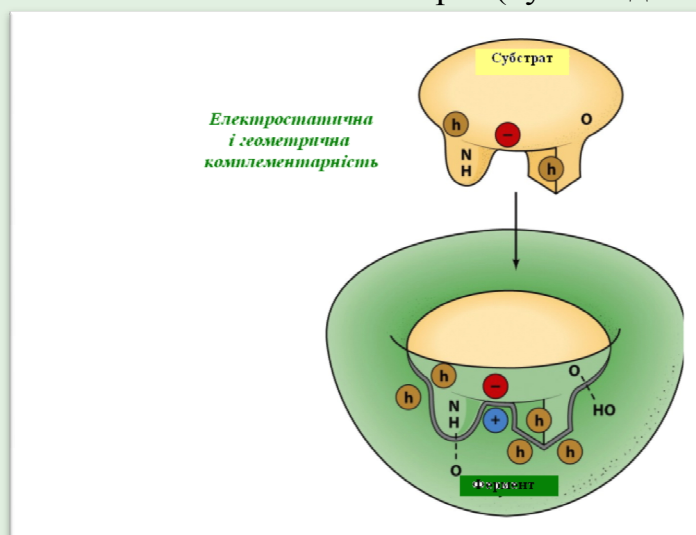


Рис. 2 –Взаємодії фермент-субстрат

Поверхневий шар білкової глобули характеризується підвищеною мікрров'язкістю. Ефекти підвищеної мікрров'язкості особливо сильно розвинені в області активного центру. Тут поліпептидні ланцюги білка розташовані настільки жорстко, що утрудняють не тільки поступальну дифузію в глобулу, але також і обертальний рух зв'язаної молекули. Важлива особливість будови активного центру – його поверхня комплементарна поверхні субстрату,

*тобто залишки амінокислот цієї зони ферменту здатні вступати в хімічну взаємодію з певними групами субстрату.*

В активному центрі розрізняють дві зони: центр зв'язування, відповідальний за приєднання субстрату, і каталітичний центр, відповідальний за хімічне перетворення субстрату. Центр зв'язування зазвичай має вигляд поглиблення, сформованого на поверхні білкової молекули певним розташуванням амінокислот. До складу каталітичного центру більшості ферментів входять такі амінокислоти, як серин, цистеїн, гістидин, тирозин, лізин. Складні ферменти в каталітичному центрі мають кофактор або кофермент.

Ферменти, що складаються з одного поліпептидного ланцюга, мають один активний центр.

### **Особливості структури активного центру простих і складних ферментів**

Умовно активний центр можна розділити на дві частини — зв'язуючий центр і каталітичний центр. Зв'язуючий центр (зв'язуючий майданчик) виконує функцію специфічного зв'язування субстрату і його оптимальної орієнтації по відношенню до груп, що каталізують. У каталітичному центрі сконцентровані каталітичні групи. Якщо для проведення реакції достатньо кислотного-основного каталізу (гідролітичні реакції такі як гідроліз амідного зв'язку в білках або міжнуклеотидного фосфатного зв'язку), то каталітичний центр формується бічними радикалами амінокислотних залишків білка. У цьому випадку фермент складається тільки з поліпептидних ланцюгів. Проте багато речовин, необхідних для життєдіяльності клітини, можуть бути отримані тільки за допомогою окислювально-відновних реакцій або реакцій перенесення груп, що містять вуглець. Бічні радикали амінокислотних залишків не можуть каталізувати такі реакції. У цьому випадку клітина використовує складні ферменти, у яких білкова частина забезпечує зв'язування субстрату, а каталіз здійснюють небілкові (мономерні) з'єднання, звані коферментом (кофактором, простетичною групою). Білкова частина такого ферменту називається апоферментом, а активний фермент (комплекс апоферменту й коферменту) — холоферментом. У більшості випадків кофермент зв'язується з апоферментом не ковалентними взаємодіями.

## **2. Кофактори і коферменти**

Більшість ферментів для прояву ферментативної активності потребує низькомолекулярних органічних сполук небілкової природи – коферментів та / або іонів металів – кофакторів.

Термін "кофермент" був введений на початку ХХ століття і позначав частину деяких ферментів, яка легко відділялася від білкової молекули ферменту і віддалялася через напівпроникну мембрану при діалізі. Дещо пізніше було з'ясовано, що більшість ферментів складається з термолабільної білкової частини і термостабільного небілкового фактора – кофермента. Білкова частина отримала назву " апофермент ", який за відсутності коферменту не володіє каталітичною активністю. Кофермент з білковою молекулою

(апоферментом) формують молекулу холофермента, що володіє каталітичною активністю.

**Кофактори.** Більше 25% всіх ферментів для прояву повної каталітичної активності потребує іонів металів. Іони металу виконують функцію стабілізаторів молекули субстрату, активного центру ферменту і конформації білкової молекули ферменту, а саме третинної і четвертинної структур. *Іони металів – стабілізатори субстратів.* У деяких ферментів субстрати є комплекс з іоном металу. Наприклад, для більшості кіназ в якості одного з субстратів виступає не молекула АТФ, а комплекс  $Mg^{2+}$  - АТФ. У цьому випадку іон  $Mg^{2+}$  не взаємодіє безпосередньо з ферментом, а бере участь у стабілізації молекули АТФ і нейтралізації негативного заряду субстрату, що полегшує його приєднання до активного центру ферменту. Схематично роль кофактора при взаємодії ферменту і субстрату можна представити як комплекс ES-Me, де E - фермент, S - субстрат, Me - іон металу.

*Іони металу - стабілізатори активного центру ферменту.* У деяких випадках іони металу служать "містком" між ферментом і субстратом. Вони виконують функцію стабілізаторів активного центру, полегшуючи приєднання до нього субстрату і протікання хімічної реакції. У ряді випадків іон металу може сприяти приєднанню коферменту. Перераховані вище функції виконують такі метали, як  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $MO^{2+}$ . У відсутність металу ці ферменти активністю не володіють. Такі ферменти отримали назву "металоензим". Схематично даний процес взаємодії ферменту, субстрату і металу можна представити таким чином:

E - Me - S

*Роль металів у стабілізації третинної і четвертинної структури ферменту.* Іони металів забезпечують збереження вторинної, третинної, четвертинної структури молекули ферменту. Такі ферменти в відсутність іонів металів здатні до хімічного каталізу, проте вони нестабільні. Їх активність знижується і навіть повністю зникає при невеликих змінах рН, температури та інших незначних змінах зовнішнього оточення. *Таким чином, іони металів виконують функцію стабілізаторів оптимальної конформації білкової молекули.*

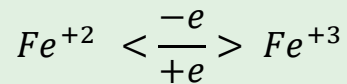
Іноді в стабілізації вторинної та третинної структури беруть участь іони лужноземельних металів. Так, для підтримки третинної конформації піруваткінази необхідні іони  $K^+$ . Для стабілізації четвертинної структури алкогольдегідрогенази, що каталізує реакцію окислення етанолу, необхідні іони цинку. Алкогольдегідрогеназа складається з 4 субодиниць з молекулярною масою 151 кД. До складу ферменту входять 4 атома  $Zn^{2+}$ . Видалення  $Zn^{2+}$  призводить до втрати активності ферменту за рахунок дисоціації на 4 неактивні субодиниці з молекулярною масою 36 кД.

*Роль металів у ферментативному каталізі.* Не менш важливу роль відводять іонам металів у здійсненні ферментативного каталізу.

*Участь іонів металів у електрофільному каталізі.* Найбільш часто цю функцію виконують іони металів із змінною валентністю, що мають вільну d-орбіталь і виступають в якості електрофілів. Це, в першу чергу, такі метали,

як  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ . Іони лужноземельних металів, такі як  $Na^+$  і  $K^+$ , не володіють цією властивістю. У ході електрофільного каталізу іони металів часто беруть участь у стабілізації проміжних сполук.

*Участь іонів металів в окисно-відновних реакціях.* Іони металів із змінною валентністю можуть також брати участь в перенесенні електронів. Наприклад, в цитохромах (білках, що містять гем) іон заліза здатний приєднувати і віддавати один електрон:



Завдяки цій властивості цитохроми беруть участь в окисно-відновних реакціях.

*Роль металів у регуляції активності ферментів.*

Іноді іони металів виступають в ролі регуляторних молекул. Наприклад, іони  $Ca^{2+}$  служать активаторами ферменту протеїнкінази С.

**Коферменти.** Як вже було сказано, для прояву каталітичної активності більшості ферментів необхідно наявність коферменту. Виняток становлять гідролітичні ферменти (наприклад, протеази, ліпази, рибонуклеаза), що виконують свою функцію в відсутність коферменту.

Кофермент, локалізуючи в каталітичній ділянці активного центру, бере безпосередню участь в хімічній реакції, виступаючи в якості акцептора і донора хімічних угруповань, атомів, електронів. Кофермент може бути пов'язаний з білковою частиною молекули ковалентними і нековалентними зв'язками. У першому випадку він називається простетичною групою (наприклад, FAD, FMN, біотин, ліпоєва кислота). Разом з тим відомі приклади, коли кофермент приєднується до ферменту нековалентними зв'язками настільки міцно, що ні дисоціює від білкової молекули, наприклад тіаміндіфосфат.

У другому випадку кофермент взаємодіє з ферментом тільки на час хімічної реакції і може розглядатися в якості другого субстрату. Приклади -  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ .

*Апофермент забезпечує специфічність дії і відповідає за вибір типу хімічного перетворення субстрату.* Один і той же кофермент, взаємодіючи з різними апоферментами, може брати участь у різних хімічних перетвореннях субстрату. Наприклад, пиридоксальфосфат залежно від того, з яким апоферментом взаємодіє, бере участь у реакціях трансамінування або декарбоксілування амінокислот.

Хімічна природа коферментів, їх функції у ферментативних реакціях надзвичайно різноманітні. Традиційно до коферментам відносять похідні вітамінів, хоча крім них є значний клас небілкових сполук, що беруть участь в прояві каталітичної функції ферментів. До коферментам відносять такі сполуки: похідні вітамінів; геми, що входять до складу цитохромів, каталази, пероксидази, гуанілатциклази, NO-синтази і є простетичною групою ферментів; нуклеотиди – донори та акцептори залишку фосфорної кислоти;

убіхінон, або кофермент Q, який бере участь в перенесенні електронів і протонів у дихальному ланцюгу; фосфоаденозилфосфосульфат, що бере участь в перенесенні сульфату; S-аденозилметіонін (SA) – донор метильної групи; глутатіон, який бере участь в окисно-відновних реакціях.

Вітамінні коферменти.

*Тіамінові коферменти* містять у своєму складі похідне вітаміну В1 (тіамін) – тіаміндифосфат (ТДФ). ТДФ пов'язаний з ферментами декарбоксилазами альфа-кетокислот (входить до складу піруватдегідрогеназного і альфа-кетоглутаратдегідрогеназного комплексів) і є коферментом транскетолази.

*Флавінові коферменти* містять у своєму складі похідне вітаміну В2 – флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндінуклеотид (ФАД).

ФМН і ФАД пов'язані з ферментами дегідрогеназами. Беруть участь в реакціях дегідрування.

*Пантотенові коферменти* містять у своєму складі вітамін В5 (пантотенова кислота). Представник – кофермент А. Бере участь у перенесенні ацильних радикалів; активації жирних кислот; синтезі холестеролу і кетонів тіл; знешкодження ксенобіотиків.

*Нікотинамідні коферменти* містять у своєму складі вітамін РР (нікотинамід): нікотинамідаденіндінуклеотид (НАД) і нікотинамідаденіндінуклеотидфосфат (НАДФ). Коферменти можуть бути в окисленій і відновленій формі НАД і НАДФ пов'язані з ферментами дегідрогеназами, які прискорюють окислювально-відновні реакції.

*Піридоксинові коферменти* містять у своєму складі вітамін В6. Кофермент – піридоксальфосфат (ПФ). Бере участь у реакціях перетворення амінокислот – реакції *переамінірування* (трансамінірування) – пов'язаний з ферментами амінотрансферазами та *декарбоксилювання* амінокислот.

Невітамінні коферменти не містять в своєму складі вітамінів, але беруть участь у каталітичних перетвореннях.

*Нуклеотиди*: АТФ, ЦТФ (беруть участь у синтезі фосфоліпідів); УДФ, УТФ, ГТФ (беруть участь у синтезі глікогену).

*Похідні порфірина*: гем, цитохроми, каталаза.

### **3. Фактори, що визначають каталітичну ефективність ферментів.**

Ферменти підвищують швидкості каталізуємих ними реакцій в  $10^8$  -  $10^{20}$  разів. Наприклад, уреаза прискорює гідроліз сечовини в  $10^{14}$  разів при рН 8 і 20°C. Як же вдається ферментам проявляти таку надзвичайно високу каталітичну активність в настільки м'яких умовах?

Існують чотири основні чинники, що визначають здатність ферментів прискорювати хімічні реакції:

- зближення і орієнтація субстрату по відношенню до каталітичної групи;
- напруга і деформація чутливого до дії ферменту зв'язку, який утворюється в наслідок індукованої відповідності між молекулами субстрату і ферменту;
- загальний кислотно-основний каталіз;
- ковалентний каталіз.

