

Программа курса лекций «Энзимология: механизмы катализа»

Автор курса: доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник [НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ](#)
[Виктория Ивановна Буник](#)

- 1) Предмет и задачи энзимологии. Ферменты, коферменты, простетические группы, субстраты, ингибиторы. Ферменты – белки, их составляющие блоки, функциональные группы и структурные мотивы. Аминокислоты, пептидная связь, формирование белковых глобул. Первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры ферментов. Типы взаимодействий, определяющих нативную структуру ферментов. Специфическая роль цистеиновых и пролиновых остатков в формировании структуры белковых катализаторов.
- 2) Активный центр ферментов, локализация активных центров в структуре белков, элементы вторичной структуры, принимающие участие в формировании активных центров. Примеры белковых структур, характерных для ферментов и их активных центров. Замкнутые и незамкнутые α - β структуры: бочонки « α - β », складка Россмана. Антипараллельные β -слои — например, формирующие активные центры супероксиддисмутазы («бочонок») и нейраминидазы («пропеллер»). Роль границ между доменами и субъединицами в формировании активных центров. Роль аминокислотных остатков активных центров в каталитическом действии ферментов.
- 3) Классификация ферментов по типу катализируемых ими реакций: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Основные функциональные свойства ферментов как биологических катализаторов: катализ, специфичность, преобразование энергии и регуляция.
- 4) Термодинамика ферментативных реакций. Экзэргонические (экзотермические) и эндэргонические (эндотермические) реакции. Свободная энергия ферментативного и неферментативного процесса. Энергия активации ферментативной и неферментативной реакции. Диаграммы ферментативной реакции. Переходное состояние реакции. Свободная энергия образования фермент-субстратного комплекса и переходного состояния. Влияние стабилизации фермент-субстратного комплекса и переходного состояния на скорость реакции.
- 5) Параллельные реакции с образованием кинетически и термодинамически стабильных продуктов, их роль в запасании и тепловом рассеивании энергии — на примере ферментативного гидролиза АТФ. Катализ эндэргонических реакций за счет ферментативного сопряжения с экзэргоническим процессом. Сопряжение за счет конформационных преобразований структуры ферментов.
- 6) Общие принципы катализа на примере сериновых протеаз: каталитическая триада, оксианионная ловушка, центр специфического узнавания субстрата. Обеспечение специфичности химотрипсина, трипсина и эластазы. Доменная организация химотрипсина, тип структурной организации, формирование активного центра на границе между доменами. Обеспечение регуляции биологической функции химотрипсина: зимогены. Конвергентная эволюция сериновых протеаз химотрипсина и субтилизина: сходство каталитического механизма при различных типах пространственных структур. Субстрат-ассистлируемый катализ на примере мутантов субтилизина. Возможности дизайна протеаз со строгой субстратной специфичностью на основе субстрат-ассистлируемого катализа.

- 7) Взаимодействие ферментов с лигандами: структурные предпосылки и роль в катализе. Этапы, многоточечность и движущие силы взаимодействия. Роль дальнедействующих электростатических, гидрофобных и ближних взаимодействий в формировании комплексов ферментов с лигандами. Энтропия и дегидратация при образовании комплексов фермента с лигандом. Роль специфического распределения электростатических зарядов на поверхности фермента для обеспечения направленности взаимодействий. Суммарный и локальный заряд ферментов. Электростатические диполи ферментных молекул. Роль сольватации в существовании оптимума соотношения между зарядом и энергией связывания.
- 8) Конформационные изменения фермента при взаимодействии с лигандом, их роль в связывании и катализе. Классификация конформационных изменений ферментов. Примеры открытых и закрытых конформаций активных центров на примере отдельных ферментов.
- 9) Гем-содержащие монооксигеназы: цитохромы **P450cam**. Биологическая роль, регуляция экспрессии и нарушения функции. Пиррол, порфин, порфирин, гем. Субстрат-связывающий центр, каталитический цикл и побочные реакции P450cam. Расчет свободной энергии связывания камфоры в активном центре P450cam. Принципы и область применения методов моделирования выхода субстрата из активного центра: молекулярная динамика со случайной выталкивающей силой, направленная молекулярная динамика, адиабатическое картирование путей. Роль электростатических взаимодействий и конформационных изменений в формировании каналов цитохромов P450cam и P450BM-3.
- 10) Направленный дизайн биологически активных соединений. Борьба с патогенными организмами путем блокирования путей биосинтеза ДНК. Ключевые ферменты биосинтеза ДНК: тимидилатсинтаза, тимидилаткиназа, дигидрофолатредуктаза — в качестве фармакологических мишеней. Проблема избирательного блокирования биосинтеза ДНК патогена по сравнению с организмом-хозяином.
- 11) Избирательность блокирования на основе разной скорости метаболизма раковых и нормальных клеток. Ингибирование тимидилатсинтазы и дигидрофолатредуктазы в химиотерапии рака. Механизм действия фторурацила, метотрексата, аминоптерина.
- 12) Избирательность блокирования на основе особенностей механизма катализа. Тимидилаткиназа патогена *Mycobacterium tuberculosis*. Отличительные особенности механизма действия по сравнению с тимидилаткиназой человека. Роль индуцированного субстратом связывания ионов Mg^{2+} в катализе. Механизм избирательного ингибирования бактериальной тимидилаткиназы азидодезокситимидинмонофосфатом.
- 13) Избирательность блокирования на основе межвидовых различий в конформационной подвижности фермента. Тимидилатсинтаза, механизм действия и ингибиторы. Механизм специфического блокирования бактериальной тимидилатсинтазы при связывании $\alpha 156$.
- 14) Проблемы дизайна на основе кристаллических структур ферментов. Роль динамики макромолекул и множественных ориентаций субстрата в активном центре на примере тимидилатсинтазы. Взаимодополняющее использование кристаллических структур и молекулярного моделирования для адекватной оценки взаимодействий. Кристаллические структуры для определения векторов конформационной подвижности и вклада каждого вектора в общую подвижность макромолекулы.
- 15) Витамины — кофакторы ферментов. Фосфорилированное производное витамина B₁ —

тиаминпирофосфат. Механизм каталитического действия тиаминпирофосфата и типы тиамин-зависимых реакций. Общность принципов взаимодействия тиамин-зависимых ферментов с тиаминпирофосфатом и обеспечения активации кофермента. Система переноса протона при каталитическом действии тиаминпирофосфата в составе тиаминных ферментов. Ионы металлов в связывании пирофосфатной группы тиаминпирофосфата. Структура и механизм действия декарбоксилаз и дегидрогеназ 2-оксокислот (пирувата).

- 16) Аллостерическая регуляция ферментов. Гомотропные и гетеротропные регуляторы. Согласованная модель Моно-Вимена-Шанже и последовательная модель Кошланда-Немети-Филмера. Кинетические методы исследования аллостерических свойств с помощью структурных аналогов аллостерических регуляторов и сайт-направленного мутагенеза. Преобразование Хилла. Структурная обособленность аллостерического и активного центров на примере фосфофруктокиназы и пируватдекарбоксилазы. Реализация аллостерической регуляции в пределах мономера и при взаимодействии субъединиц в составе олигомера. Механизм активации пируватдекарбоксилазы при связывании пирувата в аллостерическом центре. Структурные основы взаимодействия активного и аллостерического центров фосфофруктокиназы.
- 17) Связывание лиганда, изменяющее конформационную подвижность отдаленных от центра связывания участков белковых молекул, как общий случай аллостерии. Биотинил домен СоА-карбоксилазы; триптофан-зависимый репрессор; галактозилтрансфераза. Аллостерические эффекты для направленного дизайна биологически активных соединений со строгой специфичностью действия.
- 18) Характеристика переходного состояния реакции. Структура связи в переходном состоянии. Соотношение между ускорением реакции и энергией активации. Способы снижения энергии активации реакции при ферментативном катализе: стабилизация переходного состояния (пируватдекарбоксилаза); возникновение «напряженной» конформации фермента при связывании субстрата (оротидинмонофосфатдекарбоксилаза); связывание «напряженной», т.е. близкой к переходному состоянию, конформации субстрата (хоризматмутаза).
- 19) Катализ за счет более прочного связывания ферментом переходного состояния реакции. Реагенты и переходные состояния в ходе тиамин-пирофосфат-зависимой пируватдекарбоксилазной реакции: стадии присоединения, декарбоксилирования и элиминирования. «Взвешенное среднее» переходных состояний и реагентов для оценки энергетического эквивалента ускорения сложных реакций. Физический смысл разницы свободных энергий переходных состояний ферментативного и неферментативного катализа декарбоксилирования пирувата. Сближение энергии переходных состояний отдельных стадий реакции как способ оптимизации ферментативного катализа. «Антикаталитическая» стабилизация ферментом реагентов и ее биологическая роль.
- 20) Катализ за счет релаксации напряженной конформации фермента, возникающей при связывании субстрата. Отсутствие стабилизирующих взаимодействий в переходном состоянии оротидинмонофосфатдекарбоксилазной реакции по сравнению с комплексом Михаэлиса. Конформационное напряжение фермента в комплексе Михаэлиса. Разложение энергетической диаграммы реакции на составляющие, показывающие изменение свободной энергии конформационных состояний фермента в ходе реакции.
- 21) Катализ за счет связывания ферментом близкой к переходному состоянию конформации субстрата. Хоризматмутантная реакция. Разная стабильность конформеров хоризмата в растворе и в активном центре хоризматмутазы. Критерии определения конфор-

мации хоризмата, близкой к переходному состоянию.

- 22) Характеристика взаимосвязи между электронным строением катализатора и его каталитической активностью. Каталитический закон Бренстеда. Линейные соотношения и параметры Бренстеда для характеристики структуры переходного состояния. Ограничения применимости соотношений Бренстеда при исследовании ферментативного катализа. Зависимости Бренстеда для исследования переходного состояния реакций сериновых протеаз и глутаредоксина.
- 23) Ферментативный катализ реакций тиол-дисульфидного обмена и биологическая роль этих реакций. Коферменты НАД⁺, ФАД и их редокс-превращения. Общие закономерности протекания тиол-дисульфидного обмена. Зависимость скорости реакции от основности тиольного нуклеофила и уходящей группы. Основные представители ферментов, катализирующих тиол-дисульфидный обмен: тиоредоксин, глутаредоксин, изомеразы белковых дисульфидов, флаavin-содержащие дитиол/дисульфид оксидоредуктазы. Разница редокс-потенциалов тиол-дисульфид оксидоредуктаз на примере глутаредоксина, тиоредоксина и изомеразы белковых дисульфидов прокариот. Сходство и различия активных центров ферментов, предназначенных для восстановления дисульфидов или окисления тиолов в клетке.
- 24) Тиоредоксин как донор восстановительных эквивалентов для рибонуклеотидредуктазы и как тиол-дисульфид оксидоредуктаза, участвующая в проведении сигналов. Световая регуляция метаболизма растений с участием ферредоксин-тиоредоксиновой системы хлоропластов.
- 25) Изомеразы белковых дисульфидов про- и эукариот, черты сходства и различия. Биологическая роль, локализация, промежуточные и конечные акцепторы восстановительных эквивалентов.
- 26) Механизм действия флаavin-содержащих дитиол/дисульфид оксидоредуктаз. Представители семейства, сходство и особенности структур и каталитического процесса. Селеноцистеин и селенобелки.
- 27) Механизм действия глутаредоксина. Биологическая роль образования смешанных дисульфидов белков с низкомолекулярными тиолами. Факторы, определяющие селективность глутаредоксина в отношении глутатиона. Моно- и дитиольные пути катализируемых глутаредоксином превращений.
- 28) Редокс потенциал клетки и клеточных компартментов, системы антиоксидантной защиты и редокс-зависимые сигнальные системы клетки.
- 29) Обеспечение чувствительности клетки к редокс-изменениям. Регуляция транскрипции ДНК в ответ на окислительный стресс. Сенсоры перекиси водорода OxyR и Orp1-Yap1. Роль ферментов, катализирующих реакции тиол-дисульфидного обмена, в системе проведения сигнала с участием OxyR и Orp1-Yap1.
- 30) Энзимология полифункциональных ферментов и полиферментных комплексов: преимущества объединения различных активных центров, общие принципы дизайна и функционирования.
- 31) Полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот: ферментативные компоненты, коферменты, механизм отдельных стадий общего процесса, структурная организация. Принцип машущей руки. Домены центрального компонента комплекса – дигидролипоатацилтрансферазы; их роль в образовании структуры комплекса и сопряжении

отдельных стадий катализа. Сходство каталитического механизма и существенных аминокислотных остатков активного центра дигидролипоатацилтрансферазы и сериновых протеаз. Кубические и додэкаэдрические комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот. Ковалентно связанный субстрат — липоевая кислота. Улучшение каталитических параметров первого компонента комплекса — дегидрогеназы 2-оксокислот — при переходе от свободного липоата к липоильному остатку в составе декапептида и полного липоил-содержащего домена. Роль липоил-содержащего домена в обеспечении специфичности реакции. Взаимодействие липоильных остатков комплексов с тиолами и дисульфидами окружающей среды как способ регуляции окислительного декарбоксилирования 2-оксокислот.

- 32) Полиферментные комплексы декарбоксилирования глицина: ферментативные компоненты, коферменты, схема отдельных стадий общего процесса, структурная организация. N-белок как аналог липоил-содержащего домена комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот.
- 33) Принцип машущей руки с участием других кофакторов. Структура и механизм действия биотина и пантотеина при переносе CO₂ и ацильных остатков, соответственно. Карбоксил-переносящий белок, транскарбоксилаза и биотинкарбоксилаза. Ацил-переносящий белок синтетаз жирных кислот и поликетидов. Биосинтез пептидных антибиотиков. Модульная организация нерибосомных пептидсинтетаз. Механизм мульти-тиольной матрицы. Арил-переносящий белок в защите N-конца антибиотиков с помощью арильной группы.
- 34) Каталитические и биологические преимущества полиферментных комплексов и полифункциональных ферментов.
- 35) Прямой перенос интермедиатов по сравнению с диффузией в раствор. Обеспечение прямого переноса путем ковалентного и нековалентного объединения структур с разными активными центрами.
- 36) Мультифункциональные ферменты для двойного отбора субстратов. Редактирующая активность аминоксил-тРНК-синтетаз. Энергозависимое обеспечение необходимой точности дискриминации валина и изолейцина при синтезе белков.
- 37) Сегрегация высокореакционноспособного интермедиата в составе фермента и регуляция образования такого интермедиата при взаимодействии активных центров. Клеточное хранение и использование аммиака. Глутаминазный и синтетазный активные центры глутамин-зависимых амидотрансфераз (имидазол-глицеролфосфат-синтетаза; глутаматсинтетаза).