

Ферменты. Структурные основы и молекулярные механизмы регуляции активности

Лектор: профессор, д.б.н. О.Д. Лопина

Программа курса

1. Классификация ферментов, понятие об активном и аллостерических центрах ферментов. Основные принципы, заложенные в классификацию ферментов. Свойства ферментов как катализаторов, сходство и различия химического и ферментативного катализа. Снижение скорости химической реакции за счет иммобилизации субстрата. Понятие об эффективном катализаторе как о макромолекуле. Строение активных центров ферментов.

2. Молекулярные механизмы конформационной подвижности белков и ее функциональное значение. Характеристика типов подвижности белков. Методы регистрации конформационных состояний белков в растворах. Роль существования конформеров фермента со сходными величинами свободной энергии в ферментативном катализе. Равновесие между открытой и закрытой конформациями доменов в ферментах. Связывание лигандов с ферментом по механизму конформационной селекции, индукция закрытого состояния путем связывания лиганда. Взаимосвязь между конформационными изменениями активного центра и сетью внутримолекулярных взаимодействий. Типы движения доменов: скольжение, движение на шарнирах, движение петель и роль этих движений в катализе.

3. Принципы ферментативного катализа. Энергетический профиль односубстратной некатализируемой химической реакции. Понятие переходного состояния химической реакции. Энергия активации и константа скорости химической реакции, соотношение между ними. Энергетический профиль простейшей односубстратной ферментативной реакции. Образование фермент-субстратного комплекса и его роль в катализе. Природа сил, вовлеченных в связывание фермента с субстратом. Конформационная лабильность ферментов как основа ферментативного катализа и механизмов его регуляции. Доказательства комплементарности активного центра и переходного состояния на примере тирозил-тРНК-синтетазы. Кооперативные взаимодействия внутри молекулы фермента и их роль в катализе. Роль низкобарьерных водородных связей в эффективности катализа.

4. Химические механизмы стабилизации переходных состояний ферментативных реакций. Способы оценки вклада взаимодействий между разными функциональными группами фермента и субстрата в стабилизацию основного и переходного состояния. Использование для этих целей химической модификации аминокислотных остатков, участвующих в катализе. Химическая модификация субстрата, направленная на взаимодействие с аминокислотными остатками активного центра – достоинства и недостатки подхода. Использование направленного мутагенеза для оценки вклада различных функциональных групп фермента в прочность

взаимодействия субстрата, стабилизацию конформационного состояния и возможность связывания субстрата и диссоциации продукта реакции.

5. Типы катализа, используемые ферментами. Общие кислоты и основания в молекулах белков. Зависимость величин рКа от микроокружения аминокислотного остатка и важность этого фактора в катализе. Каталитический механизм аспартатных протеиназ. Пепсин: структурные основы активации: отщепление пропептида и механизм катализа. Структура и кинетический механизм рибонуклеазы А. Структура и каталитический механизм триозофосфатизомеразы. Факторы, обеспечивающие эффективность и специфичность ферментативного катализа.

- Ковалентный катализ. Общая характеристика.
- Нуклеофильный катализ. Каталитический механизм сериновых протеиназ. Химотрипсин – механизм активации и характеристика отдельных стадий реакции. Каталитический механизм цистеиновых протеиназ и альдегиддегидрогеназ. Нуклеофильный катализ в действии фосфатаз и фосфокиназ.
- Электрофильный катализ, его особенности. Сочетание элементов нуклеофильного и электрофильного катализа. Катализ с образованием оснований Шиффа. Электрофильный катализ с участием коферментов: пиридоксаль-5-фосфат и тиаминпирофосфат. Катализ ионами металлов. Металлопротеиназы.
- Специфичность катализа: сравнение специфичности и структуры связывающего центра различных протеиназ.

6. Структура и каталитические свойства NAD(P)- и АТФ-зависимых ферментов. Конформация NAD и АТФ в растворе и в комплексе с дегидрогеназами. Роль различных частей молекулы NAD в связывании с ферментом и в катализе. Специфичность ферментов по отношению к NAD и NADP и связь специфичности со структурой связывающего центра. Специфичность переноса гидрид-иона. Структура и каталитический механизм лактат-, алкоголь-, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ. Закономерности, определяющие взаимосвязь структуры и функциональных свойств этих ферментов.

7. Механизмы регуляции активности ферментов. Прямое влияние на активный центр (действие конкурентных и неконкурентных ингибиторов, ингибирование избытком субстрата, ковалентная модификация аминокислот активного центра). Механизм активации сАМР-зависимой протеинкиназы. Аллостерические эффекты. Регуляторные домен, регуляторные субъединицы. Роль олигомерной структуры, понятие о межсубъединичной кооперативности. Примеры, иллюстрирующие молекулярные механизмы аллостерической регуляции активности пируваткиназы, гликогенфосфорилазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, пируваткиназы.

8. Полифункциональные ферменты и полиферментные комплексы. Структурные основы туннелирования интермедиата между активными центрами, формируемыми разными доменами или субъединицами (триптофансинтаза,

глюкозамин-6-фосфатсинтаза). Направленное движение интермедиата по «шоссе» на поверхности молекулы тимидилатсинтазы/ дигидро-фолатредуктазы. Молекулярные механизмы согласования работы активных центров, соединенных туннелем или шоссе.

9. Каталитические антитела (абзимы) как примитивные ферменты. Теоретические предпосылки создания абзимов и их практическая реализация. Экспериментальные подходы к получению антител, катализирующих разные реакции. Примеры, иллюстрирующие сходство общих принципов функционирования абзимов и ферментов. Методы усовершенствования функциональных свойств абзимов. Генно-инженерные подходы к получению каталитических антител. Практическое использование абзимов.

Список рекомендуемой литературы

1. М. Бендер, Р. Бергельсон, М. Комяма. Биоорганическая химия ферментативного катализа. Мир. М. 1987.
2. Н.К. Наградова. Как работают ферменты. Энциклопедия «Современное естествознание», Молекулярные основы биологических процессов (ред. В.Н. Сойфер), т. 8, с. 158-168, Магистр-Пресс, 2000.
3. Н.К. Наградова. Олигомерная структура ферментов и ее функциональная роль. Там же, с. 149-157.
4. Н.К. Наградова. Каталитические антитела. Там же, с. 174-181.
5. A.R. Fersht, R.J. Leatherbarrow, T.N. Wells. Binding energy and catalysis: a lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. TIBS, v. 11, p. 321-325, 1986.
6. P.G. Schultz. The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysis. Science, v. 240, p.426-443. 1988.
7. A.R. Clarke, T. Atkinson, J.J. Holbrook. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. TIBS, v.14, p. 145-148, 1989.
8. J.R. Knowles. Enzyme catalysis: not different, just better. Nature, v. 350. P. 121-124, 1991.
9. A. Mattevi, M. Bolognesi, G. Valentini The allosteric regulation of pyruvate kinase. FEBS Letter, v. 389. P.11-15, 1996.
10. P. Pan, E. Woehl, M.F. Dunn. Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. TIBS, v. 22, p. 22-27, 1997.
11. E.W. Miles, S. Rhee, D.R. Davies The molecular basis of substrate channeling. J. Biol. Chem. V. 274, p.12193-12196, 1999.
12. RN. Perham. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. Annu. Rev. Biochem. 69:961-1004. 2000.
13. S. Ghisla, C. Thorpe. Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. Eur. J. Biochem. 271(3):494-508, 2004.
14. M.A. Vanoni, L. Dossena, R.H. van den Heuvel, B. Curti. Structure-function studies on the complex iron-sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation. Photosynth. Res. 83(2):219-38, 2005.

15. G. Lippens, I. Landrieu, C. Smet. Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. *FEBS J.* 2007 274(20):5211-22, 2007.
16. S.J. Benkovic, GG. Hammes, S. Hammes-Schiffer Free-energy landscape of enzyme catalysis. *Biochemistry.*47(11):3317-21. 2008.
17. G.L. Waldrop, HM.Holden, M. St Maurice. The enzymes of biotin dependent CO₂ metabolism: what structures reveal about their reaction mechanisms. *Protein Sci.* 21(11):1597-619, 2012.
18. M. Deponte. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830(5):3217-66 2013.
19. R.S. Phillips. Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1854(9):1167-74, 2015.
20. B.H. Shilton. Active transporters as enzymes: an energetic framework applied to major facilitator superfamily and ABC importer systems. *Biochem. J.* 467(2):193-9, 2015.
21. E. Flashman. *Basic Enzymology.* University of Oxford. Trinity Term. 2015.
22. P.K. Agarwal , N. Doucet , C. Chennubhotla , A. Ramanathan, C. Narayanan. Conformational Sub-states and Populations in Enzyme Catalysis. *Methods Enzymol.* 578:273-97, 2016.
23. C.T. Supuran. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.* 473(14):2023-32, 2016.
24. S. Dajnowicz, RC. Johnston, JM. Parks, MP. Blakeley, DA. Keen, KL.Weiss, O.Gerlits, A. Kovalevsky, TC. Mueser. Direct visualization of critical hydrogen atoms in a pyridoxal 5'-phosphate enzyme. *Nat. Commun.* 8(1), 955, 2017.
25. AA. Ukuwela, AI. Bush. Reduction potentials of protein disulfides and catalysis of glutathionylation and deglutathionylation by glutaredoxin enzymes. *Biochem. J.* 474(22):3799-3815, 2017.
26. TL. Amyes, MM. Malabanan, X. Zhai, AC. Reyes, J.P. Richard. Enzyme activation through the utilization of intrinsic dianion binding energy. *Protein Eng. Des. Sel.* 30(3):157-165, 2017.
27. B. Wielgus-Kutrowska, T. Grycuk, A. Bzowska. Part-of-the-sites binding and reactivity in the homooligomeric enzymes - facts and artifacts. *Arch. Biochem. Biophys.* 642:31-45, 2018.
28. J. Azadmanesh, EO. Gloria, A. Borgstahl. Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase.*Antioxidants (Basel).* 7(2): 25, *Protein Sci.* 21(11):1597-619, 2018.