

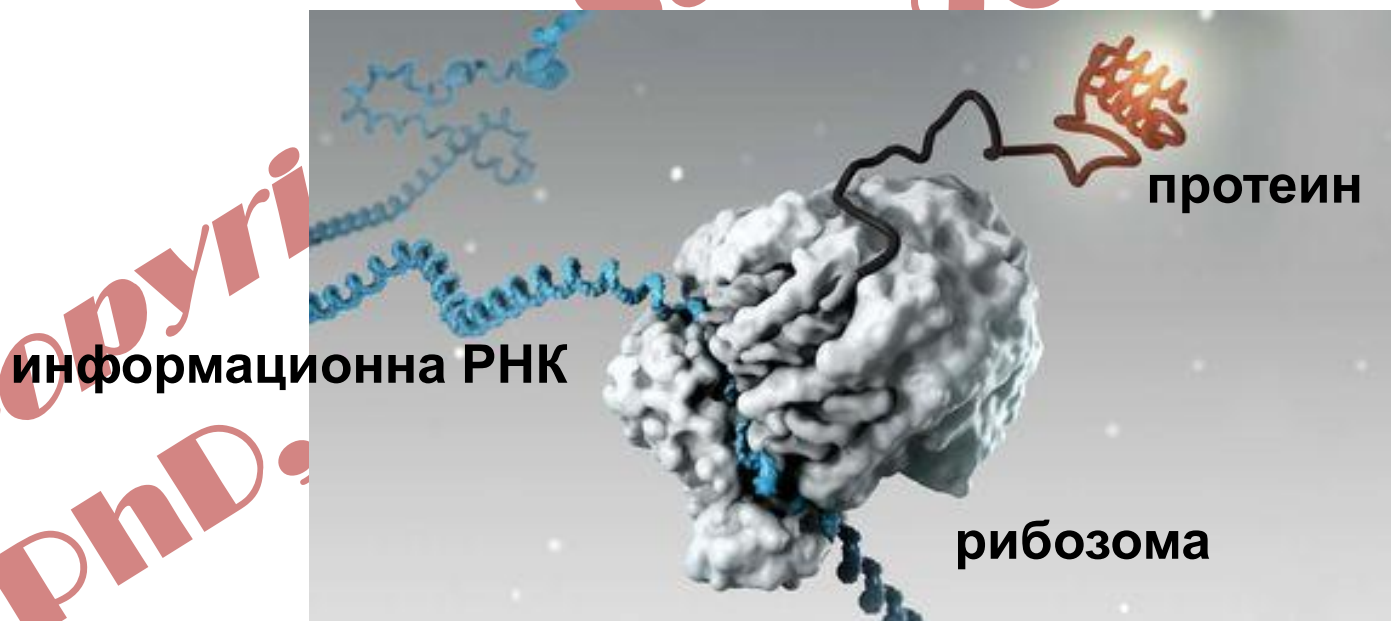
***Copyright* Stefan E. Boiadjiev, PhD**  
**© 2018**

47. Протеини и нива на тяхната структурна организация. Функционална конформация на ензими, активен център. Ензимна катализа, ензимна кинетика. Механизъм на ензимно действие, серинова протеаза, протонна совалка. Стереоспецифичност и стереоселективност.

Пептидите и протеините са полимери от  $\alpha$ -аминокиселини (АК).

Пептидите – до около 50 АК остатъка.

Протеините са много по-дълги полимери,  $\gg$  50 АК остатъка.



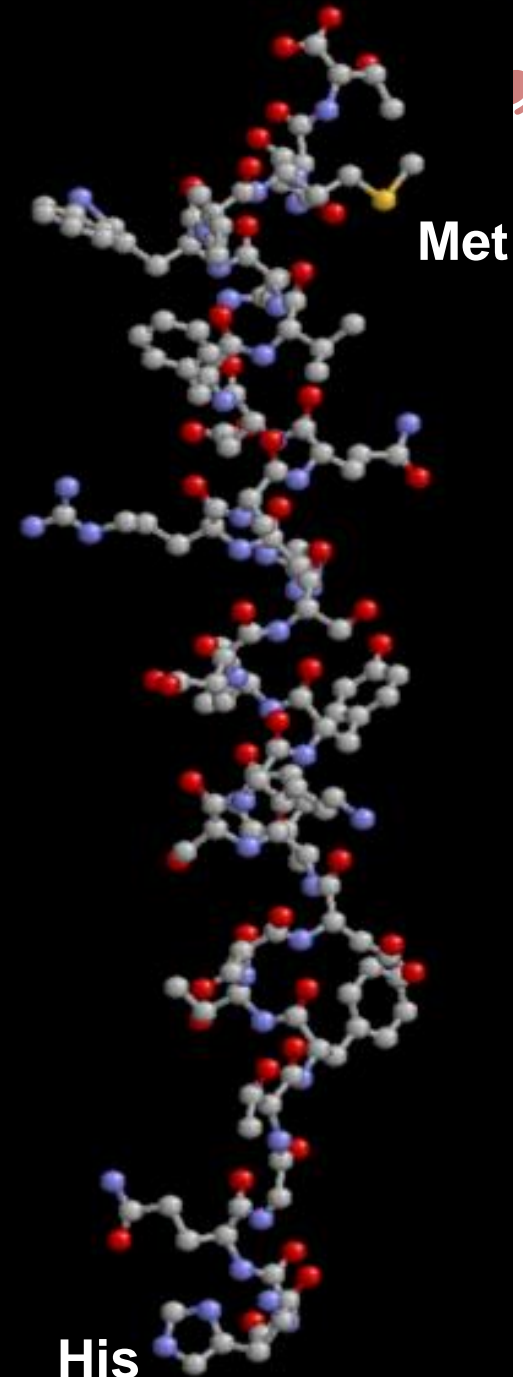
С-терминал

По-голям пептид е **глюкагон**. Глюкагонът е пептиден хормон съставен от 29 АК (малък,  $M = 3485$  далтона). **Първичната му структура** в хора е:  **$\text{NH}_2$ -His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH**.

cAMP е вътрешноклетъчният вторичен посредник, който сигнализира свързване на глюкагон към външния рецептор. Този хормон се секретира от панкреаса и способства разграждането на гликоген в черния дроб. **Нивото на глюкоза в кръвта (кръвна захар) се повишава.**

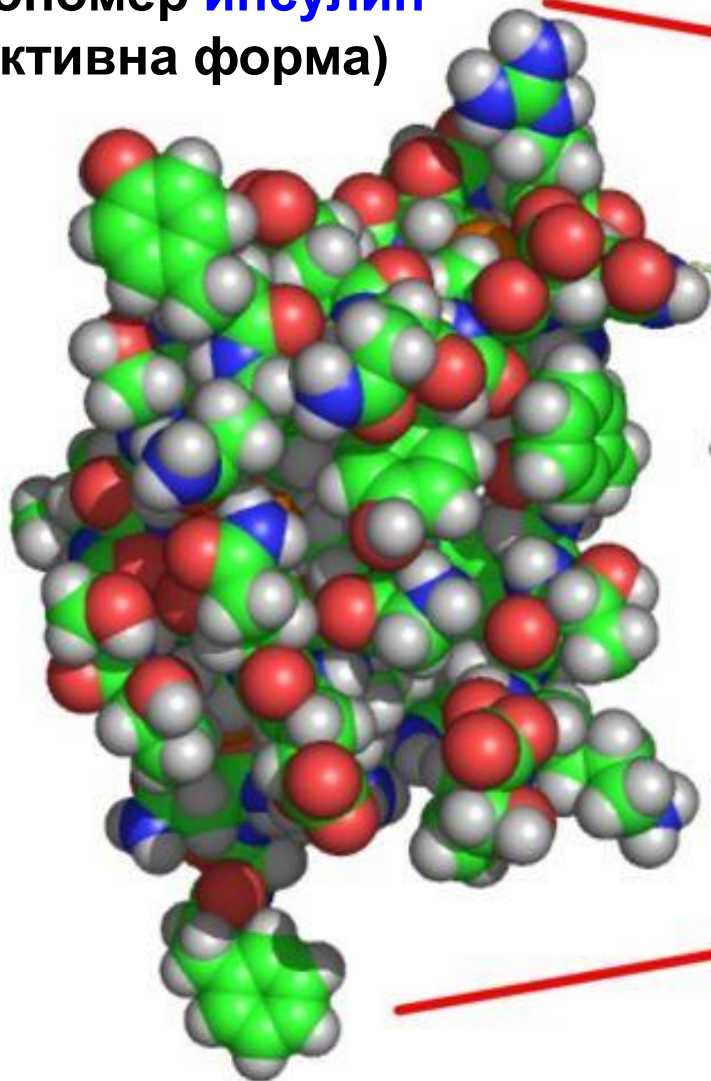
Ефектът му е противоположен на ефекта на инсулина, който **понижава нивото на кръвна глюкоза.**

N-терминал

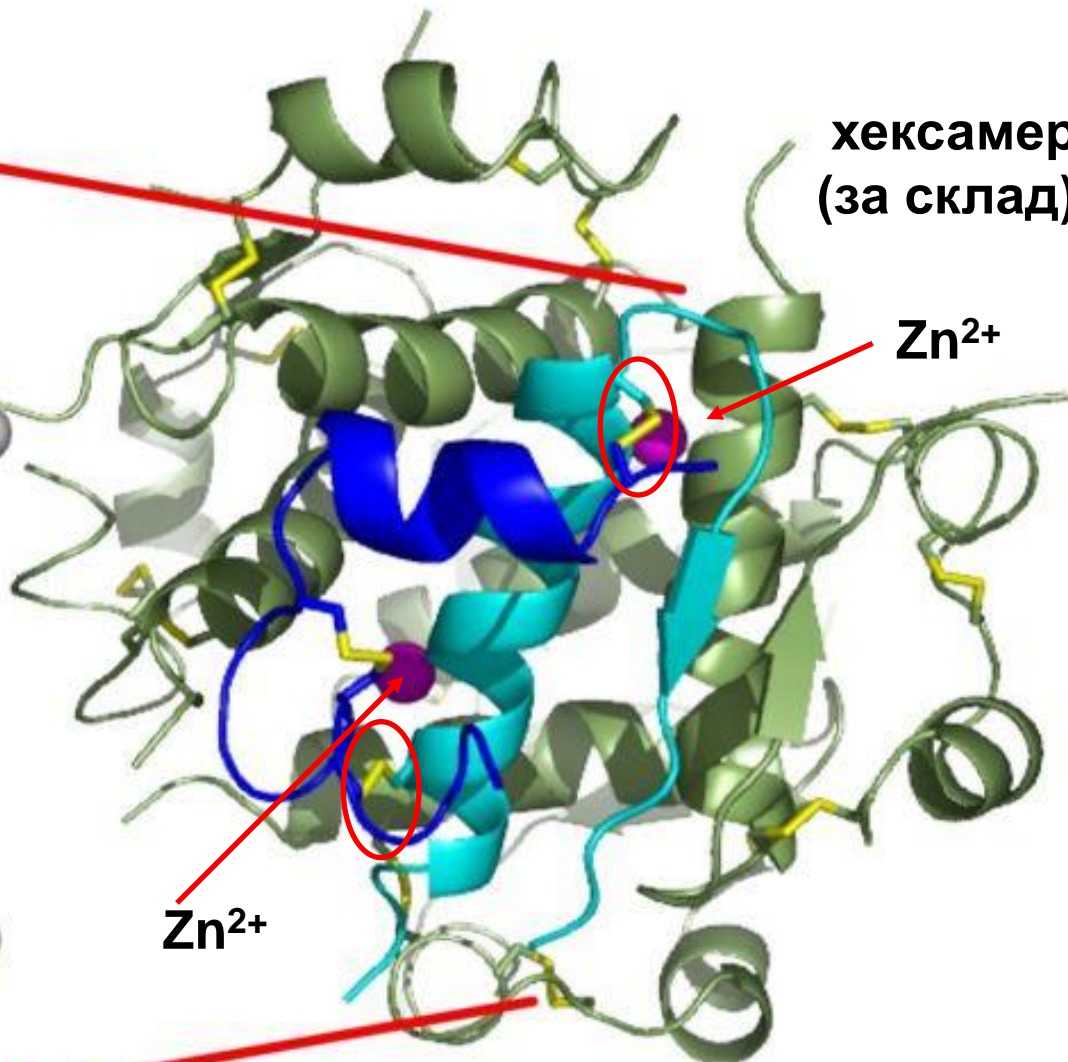


**Инсулин** Протеинов хормон от 51 АК, на границата пептиди – протеини.

мономер **инсулин**  
(активна форма)



гексамер  
(за склад)



$Zn^{2+}$

$Zn^{2+}$

○ Дисулфидни мостове  
между А-верига (**син**) и  
В-верига (**циан**)

Инсулинът е жизнено важен за лечение на диабетици. Хормонът е открит през 1921 г.; първото му клинично приложение срещу диабет е в 1922 г., в Торонто и за тези постижения Фредерик Бантинг и Джон Маклеод са удостоени с Нобелова награда за физиология или медицина в 1923 г.



Ф. Бантинг Дж. Маклеод "за откритието на инсулина"

Първият протеин с доказана последователност на АК е инсулин, 1951 г. За постижението си Фредерик Сейнгър получава Нобелова награда по химия в 1958 г. "за работата му по структури на протеини и специално върху инсулина", и втора, в 1980 г., заедно с П. Берг и В. Гилберт "за приноси към определяне секвенцията на бази в нуклеинови киселини".

Ф. Сейнгър



Протеините са високомолекулни полиамиди от  $\alpha$ -аминокиселини и, което е по-съществено, те изпълняват структурни и каталитични функции в биологията.

Възможно е протеините да се класифицират според:

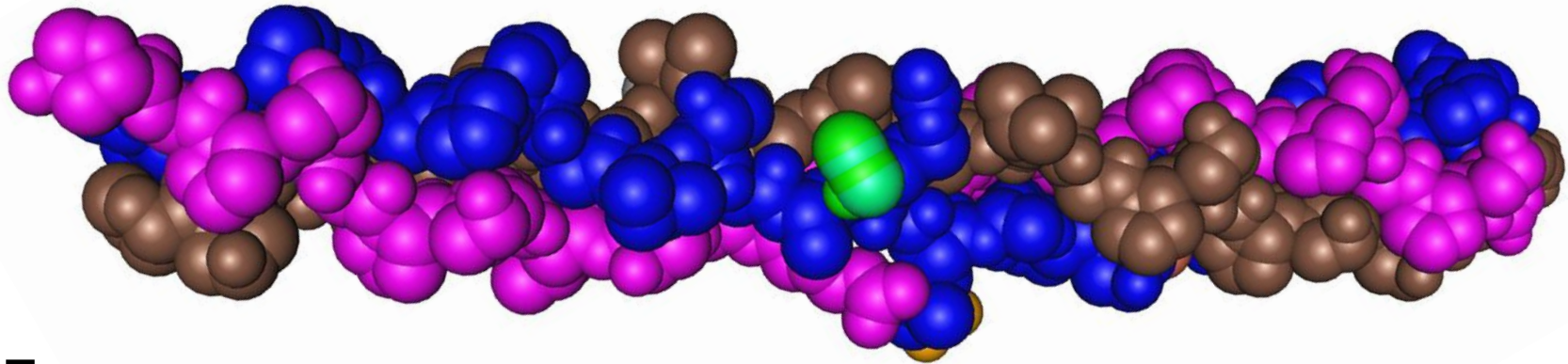
- ✓ структура
- ✓ биологична функция
- ✓ обща форма и разтворимост
- ✓ аминокиселинен състав
- ✓ на основа техните хранителни качества.

Според формата на молекулите се диференцират фибриларни (фибрилни) и глобуларни протеини.

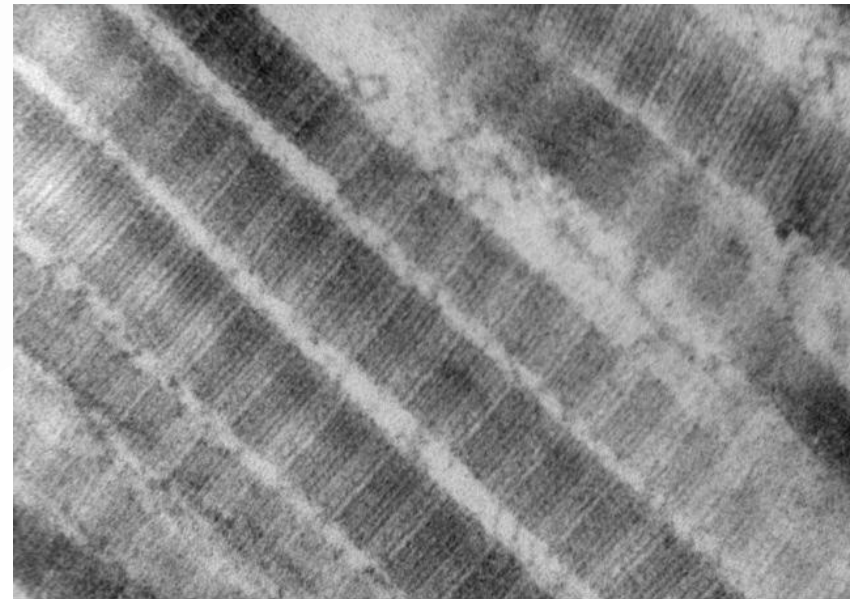
**Фибриларните протеини** са основен строителен материал на живата тъкан, например **кератин** в кожата, космите, рогата, ноктите; **колаген** в сухожилията; **миозин** в мускулите.

Тези протеини са неразтворими във вода и имат **нишковидна структура** на молекулата. Основната им роля е защитна и поддържаща, структурна.

Обикновено фибриларните протеини изграждат съединителната тъкан, сухожилията, остеона (основната структурна единица в костите) и мускулните фибрили.



Три усукани протеинови вериги  
в колаген.



50 nm

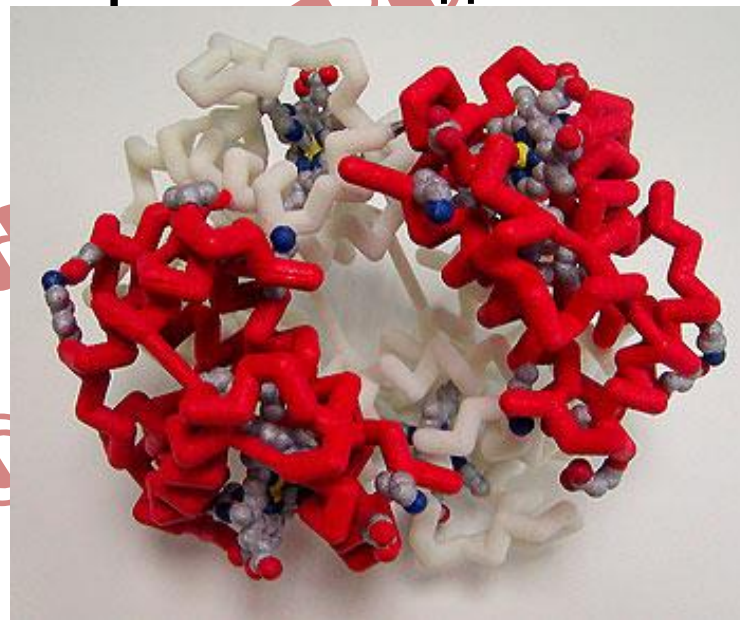
11LungTEM

1/7/0 REMF

Колагенови нишки е белодробна тъкан, TEM

Сору  
PhD,

Глобуларните белтъци изпълняват различни функции по поддържане и регулиране на жизнените процеси в организма. Такива са някои ензими, хормони, например **албумин** (в яйцата), **хемоглобин** и **фибриноген** (в кръвта), **миоглобин** (в мускулите), **инсулин** (в панкреатичната жлеза) и много други. Тези протеини имат **кълбовидна форма** и са разтворими във вода.



Модел на хемоглобин с ясно различими 4 протеинови вериги – две  $\alpha$  141 АК и две  $\beta$  146 АК,  $M \sim 68000$  и четири хема.



Основните биологични функции на протеините са:

- **структурни протеини** – напр. кератин, колаген и еластин. Кератините втвърдяват защитни тъкани като коса, крила, пера, рога. Колагени и еластин поддържат съединителни тъкани в сухожилия и стави;
- **свиващи се протеини** – напр. актин и миозин. Те са отговорни за движението на мускулите;
- **транспортни протеини** – напр. хемоглобин, цитохроми, серумен албумин. Хемоглобинът транспортира  $O_2$ . Цитохромите оперират в електронтранспортната верига. Серумният албумин пренася с кръвния поток редица вещества;
- **протеини съхраняващи аминокиселини** – напр. овалбумин в яйчен белтък и казеин в млякото;
- **хормонални протеини** – напр. инсулин, окситоцин и самототропин. Окситоцинът е пептид от 9 АК, който стимулира ритмичното свиване на матката по време на родилния процес. Соматотропинът е растежен хормон, който стимулира синтеза на протеин в мускулните клетки;

- **антитела**, наричани и имуноглобулини (означавани в медицината като Ig), Те са специализирани серумни гликопротеини, **гама-глобулини**, които защитават организма от чужди нашественици – антигени. Антителата се свързват специфично с антигени и реагират като антитоксини – неутрализират токсините на инфекциозните агенти; аглутини – предизвикват аглутинация (слепване) на чужди клетки; опсонини – увеличават чувствителността на инфекциозните агенти към фагоцитоза (разрушаване от белите кръвни клетки); лизини – разрушават инфекциозни агенти чрез лизис; преципини – преципитират чужди вещества
- **ензими** – биохимични катализатори, напр. лактаза и пепсин. Лактазата хидролизира лактоза в млякото. Пепсинът е храносмилателен ензим в стомаха, който хидролизира протеини.

## Нива на структурната организация в протеини

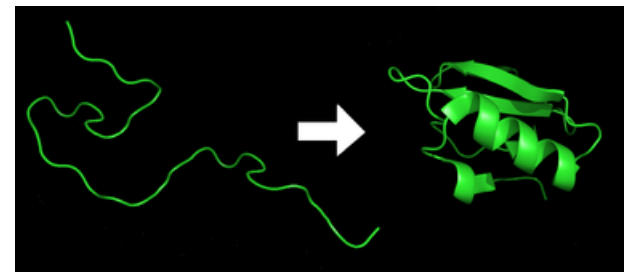
Въпреки огромното разнообразие на протеинови структури, те се описват с четири нива на организация:

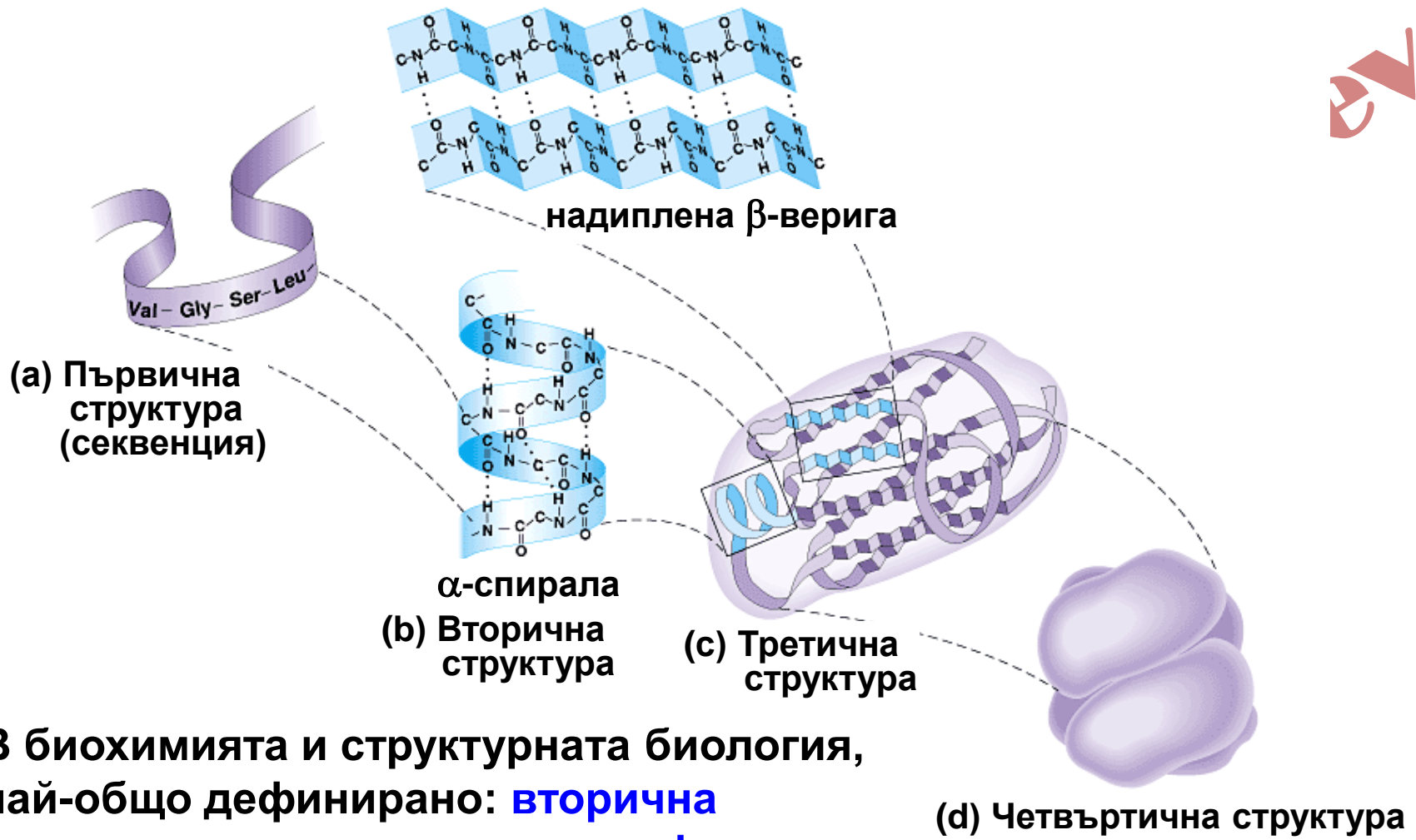
- Първична структура (секвенция)
- Вторична структура (локална конформация)
- Третична структура (глобална конформация)
- Четвъртична структура (постигане на функционалност)

Първичната и вторичната структура бяха разгледани в Тема 46.

**Първичното ниво** представлява точната последователност на свързване на отделните аминокиселинни остатъци, кодирана от полинуклеотидната последователност в ДНК. Природно функциониращите протеини не съществуват в първична структура. Те спонтанно се сгъват до следващите нива –

**$\alpha$ -спирална,  $\beta$ -листовидна, надиплена, структура и неподредени участъци.**

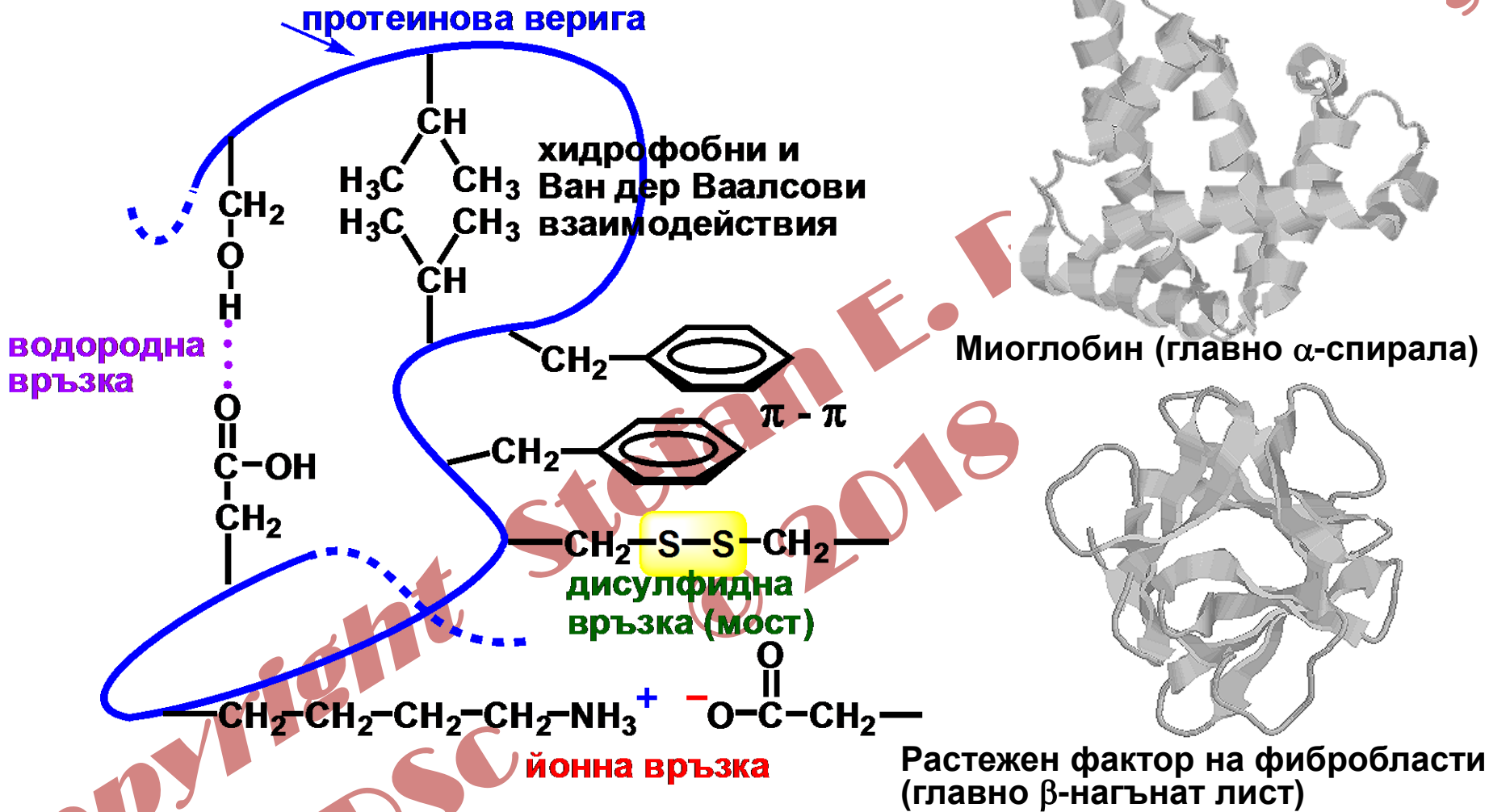




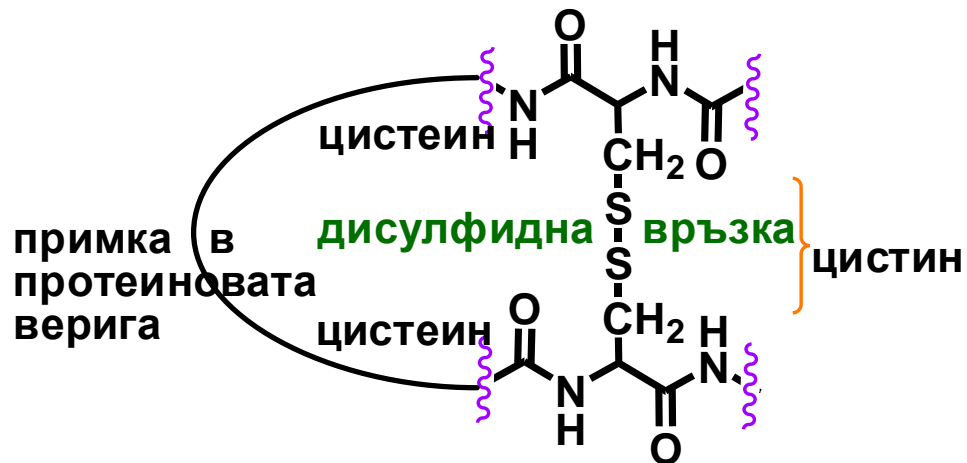
В биохимията и структурната биология, най-общо дефинирано: **вторична структура** е пространствената форма на **локални сегменти** в биополимери (протеини, РНК, ДНК). Тя не описва специфични атомни координати в 3D, които се разглеждат в третичната структура на цялата верига.

**Третично ниво** – пълното нагъване на полипептидната верига в пространството, с всички възможни близки и далечни взаимодействия. Това ниво дава представа за цялостната форма на белтъчната молекула, както и за връзките и отношенията между отделните вторични структури. Третичната структура не е резултат от действието на случайни сили, а е строго определена от аминокиселинната последователност (първичната структура) на полипептидната верига, тоест тя е генетично детерминирана. **Триизмерната форма, която протеинът приема на ниво третична структура се означава като функционална конформация (заедно с четвъртичното ниво).** Във физиологични условия конформацията търпи промени от взаимодействия с други молекули, свързани с конкретната функция. Формата на белтъчната молекула се поддържа от множество слаби нековалентни взаимодействия между, понякога отдалечени по веригата, аминокиселинни остатъци. Тези взаимодействия са: **йонни връзки, водородни връзки, хидрофобни взаимодействия,  $\pi$  –  $\pi$  взаимодействия ( $\pi$  stacking), дипол-диполни взаимодействия и дисулфидни връзки (ковалентни мостове).**

# Поддържащите третичната структура взаимодействия.



Разбира се, водородните връзки са от първостепенна важност за формиране на вторичната структура! **Много на брой вътрешномолекулни водородни връзки** дават съществения принос към стабилността на протеините.



**Дисулфидни връзки** в протеини се образуват между тиоловите групи на цистеина (метионинът, като тиоетер не може да формира S-S връзки).

Когато са образувани в една и съща верига, дисулфидните връзки стабилизират третичната, сгънатата форма на протеина. **Дисулфидни мостове** може да съединяват две вериги протеин, както е в инсулина, т.е. участват в четвъртичната структура.

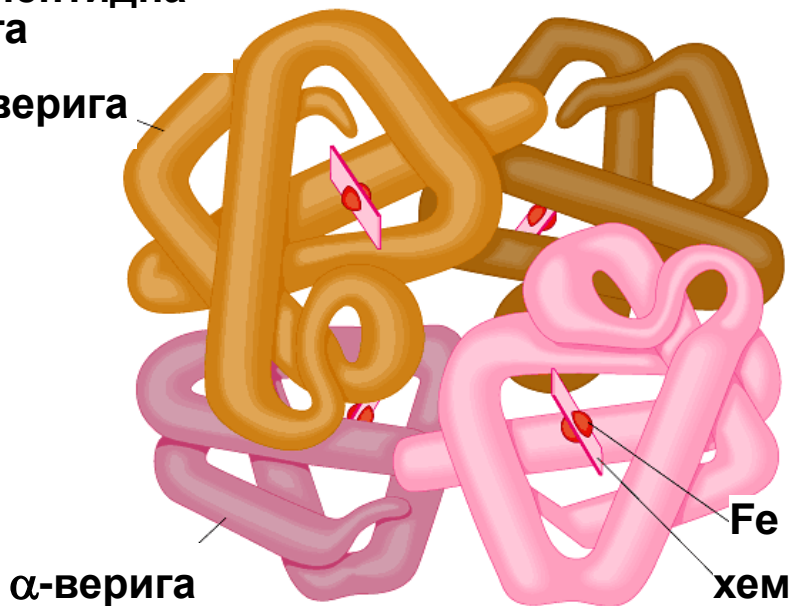
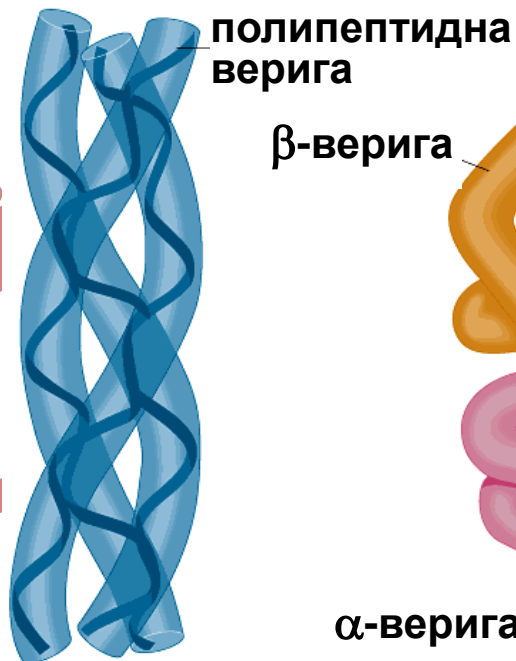
**Хидрофобни взаимодействия** Възникват от сили на привличане между неполярни остатъци в АК.

**$\pi - \pi$  Взаимодействия** Възникват между почти паралелни ароматни пръстени на фенилаланин, тирозин и триптофан.

**Дипол-диполните взаимодействия** имат значение за координиране на протеина с други молекули.

**Четвъртично ниво (супрамолекулна химия)** Кватернерната структура отново разглежда цялостната пространствена форма, но на асоциирани нековалентно или ковалентно свързани белтъчни молекули. Всяка отделна протеинова молекула, притежаваща характерна, завършена, третична структура се означава като **субединица**, а цялостният конгломерат – понякога като олигомер. Не всички протеини притежават четвъртична структура, тъй като повечето от тях функционират като една полипептидна верига. Четвъртичното ниво предполага наличието на поне две полипептидни вериги. Типичен пример за белтък с четвъртична структура е хемоглобинът.

Колаген  
фибриларен  
структурен  
протеин;  
тример

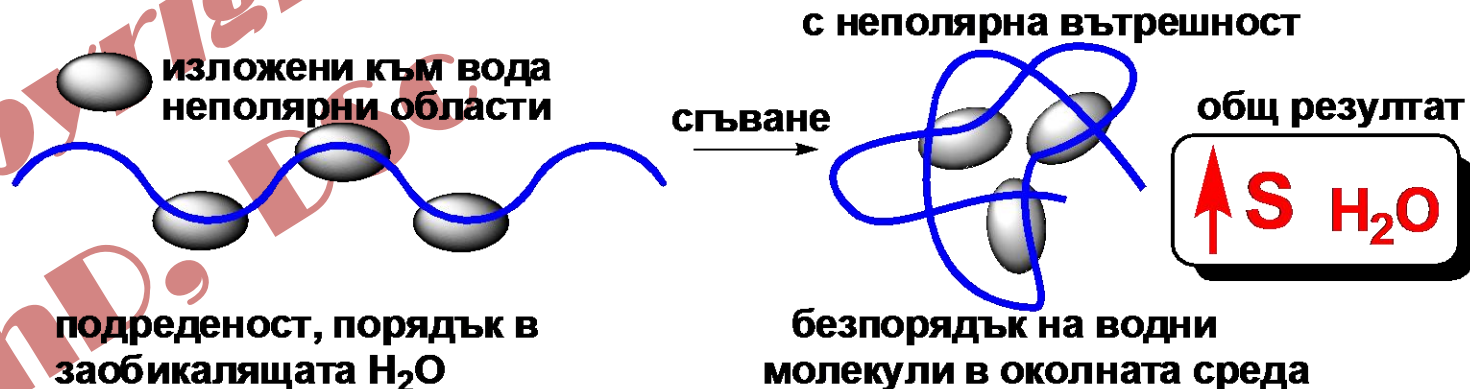




## Принципи на протеиновата структура

Функциониращите сгънатите протеини обикновено имат **хидрофобна вътрешност**, в която неполярните странични вериги са по-плътно опаковани (хидрофобен ефект) и я стабилизират. Полярните и заредени странични вериги заемат преимуществено изложената на разтворителя повърхност (образуване на водородни връзки с водата).

Минимизиране на броя хидрофобни странични вериги, които са експонирани към вода е важна движеща сила за спонтанното сгъване на протеина, дори по време на напускането му от рибозома. Термодинамично нараства общата ентропия на системата протеин-вода.



Име	Символ	Странична верига	Относително съдържание(%)	% "Скрити"
аланин	A, Ala	CH <sub>3</sub> -	7.49	51
аргинин	R, Arg	HN=C(NH <sub>2</sub> )-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	5.22	5
аспарагин	N, Asn	H <sub>2</sub> N-CO-CH <sub>2</sub> -	4.53	22
асрапартова к-на	D, Asp	HOOC-CH <sub>2</sub> -	5.22	19
цистеин	C, Cys	HS-CH <sub>2</sub> -	1.82	74
глутамин	Q, Gln	H <sub>2</sub> N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	4.11	16
глутамова к-на	E, Glu	HOOC-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	6.26	16
глицин	G, Gly	H-	7.10	52
хистидин	H, His	N=CH-NH-CH=C-CH <sub>2</sub> -     	2.23	34
изолевцин	I, Ile	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-	5.45	66
левцин	L, Leu	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -	9.06	60
лизин	K, Lys	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	5.82	3
метионин	M, Met	CH <sub>3</sub> -S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	2.27	52
фенилаланин	F, Phe	Phenyl-CH <sub>2</sub> -	3.91	58
пролин	P, Pro	-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH- 	5.12	25
серин	S, Ser	HO-CH <sub>2</sub> -	7.34	35
треонин	T, Thr	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-	5.96	30
триптофан	W, Trp	Phenyl-NH-CH=C-CH <sub>2</sub> - 	1.32	49
тирозин	Y, Tyr	4-OH-Phenyl-CH <sub>2</sub> -	3.25	24
валин	V, Val	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-	6.48	64

Структурата на протеини се доказва с класическите методи:

1) с реактив **Ф. Сейнгър** (Fr. Sanger, секвенция на инсулин, 1951 г.)

– **2,4-динитрофлуоробензен** (ДНФБ). Той реагира с N-крайната аминокиселина ( $S_NAr$ ). След пълна (или частична) хидролиза и хроматографско разделяне, N-крайната АК (или съдържащият я олигопептид) се идентифицира по жълтия цвят от маркера ДНФБ. Процедурата се

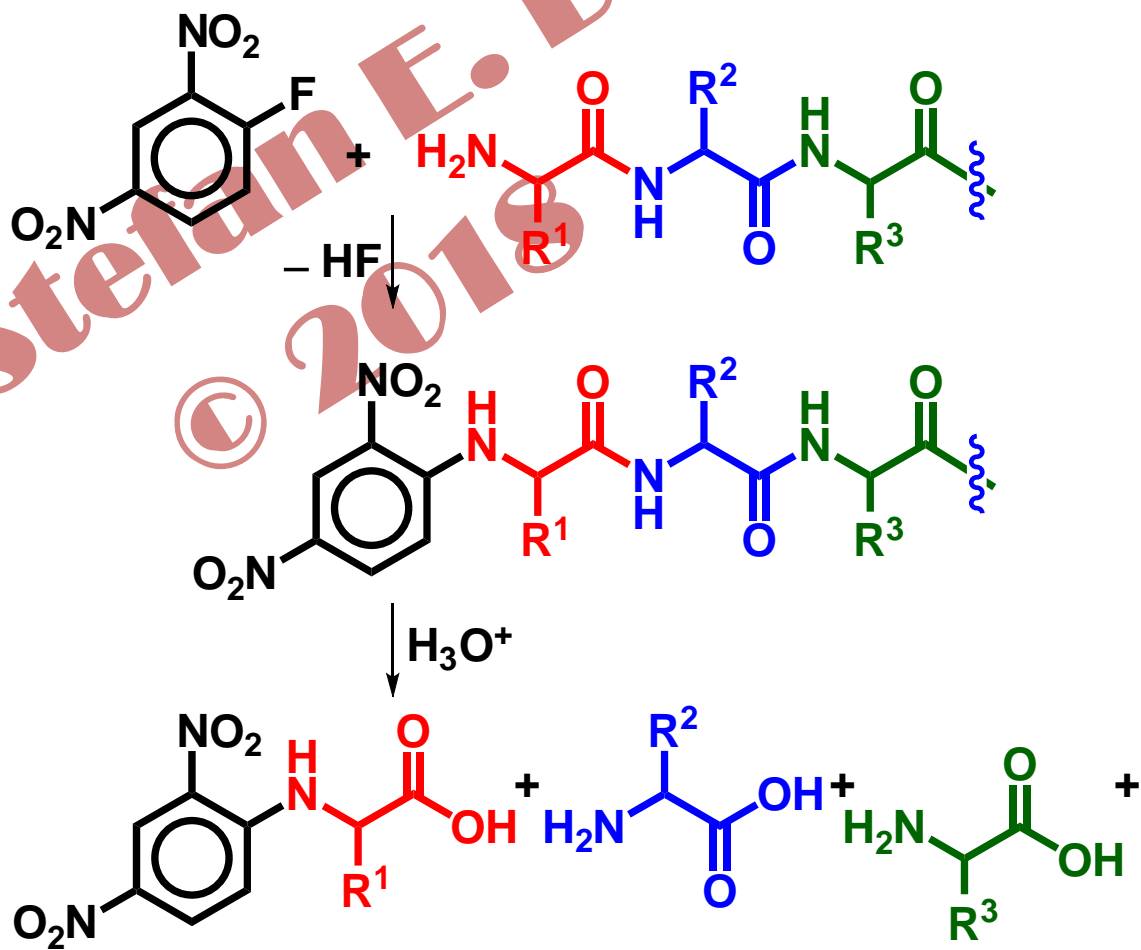
повтаря докато се идентифицират

наслагващи

се сегменти, от които

се извежда пълната

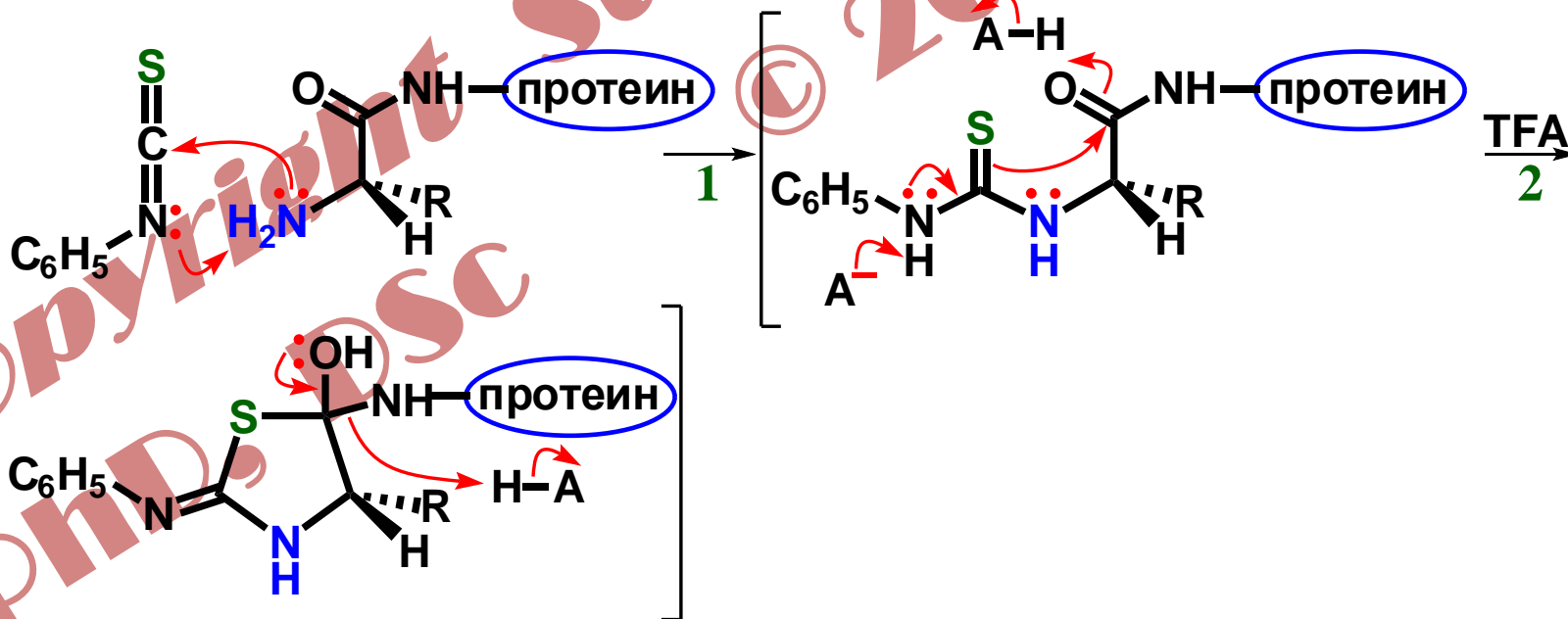
секвенция.



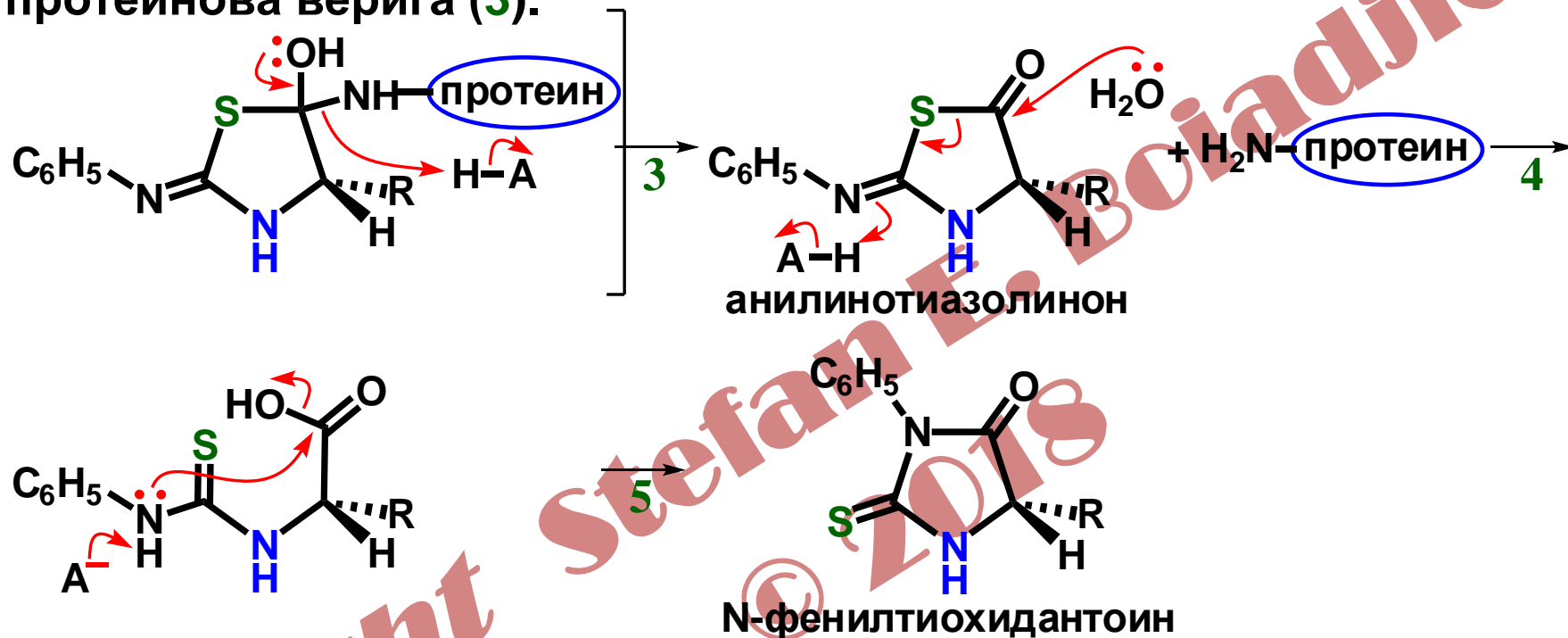
Copyright  
PhD, DSC

2) **разграждане по Едмън**. Основната идея е да се откъсват една по една АК от N-края и да се идентифицират. За идентификация на продукта, 4-заместен фенилтиохидаントин, в съвременно приложение се използват хроматографски-масспектрални методи (MALDI-TOF, матрично-активирана лазерна десорбция / йонизация с време на полет мас анализатор) работещи с  $< 1 \mu\text{g}$  (пикомол).

Протеинът се третира с фенилизотиоцианат, който присъединява нуклеофилно крайната  $\text{NH}_2$  до заместена N-фенилтиоуреа (1). Тя циклизира в следваща обработка с TFA до междинен, нестабилен, анилинотиазолин (2).



От анилинотиазолина се откъсва крайната АК от протеиновата верига и се образува заместен анилинотиазолинон и скъсена протеинова верига (3).



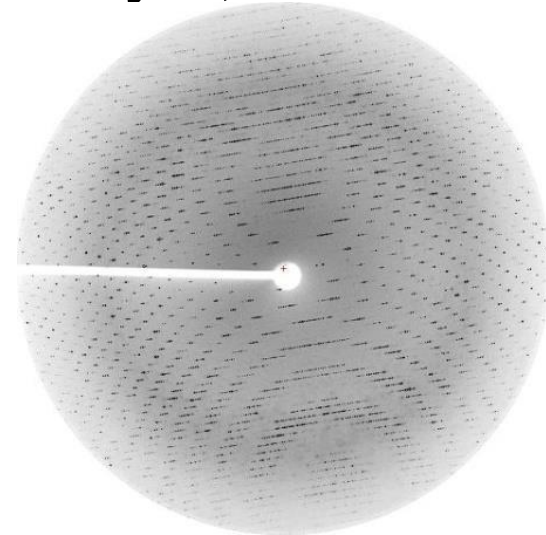
Следваща прегрупировка в кисела среда (4, 5) води до по-стабилния изомерен N-фенилтиохидантоин. Той се идентифицира по молекулна маса, с което се доказва R.

Скъсеният протеин автоматично се подлага на същата поредица реакции. Методът не е приложим към дълги протеини поради натрупване на странични продукти.

3) **киселинна или ензимна хидролиза** до олигопептиди. Те се разделят и идентифицират, някои след допълнителна хидролиза от специфични ензими – ендопептидази. След доказване на структурата на отделните фрагменти се реконструира секвенцията на изходната протеинова молекула.

Съвременните методи за структурни изследвания на протеини са:

- Рентгеноструктурен кристалографски анализ** Първостепенен, точен и най-сигурен метод за определяне на молекулна конформация в биологични макромолекули, в частност протеини и нуклеинови киселини;



- ❑ **Спектроскопия на ядреномагнитен резонанс (ЯМР)** Метод с разнообразни възможности за получаване на точна информация за структура и динамика на протеини;

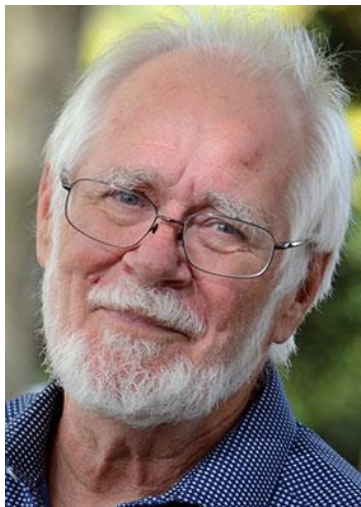


900 MHz и 800 MHz ЯМР  
спектрометри



- ❑ **Компютърно моделиране** Предсказва протеиновата три-дименсионална структура с квантово-химични изчисления (*ab initio*, *de novo*-моделиране) базирани на секвенцията.

## С Нобелова награда по химия за 2017 г. са удостоени



Жак Дюбоше, Йоахим Франк и Ричард Хендерсън

"за развитие на криоелектронната микроскопия за определяне структурата на биомолекули в разтвор с висока разделителна способност"

Молекулярните биолози предпочитат установяване на секвенцията на ген в ДНК, от която следва секвенцията на даден протеин.



## Ензими

Ензимите са биохимични катализатори.

Те катализират ~5000 познати реакции. Преобладаващият брой ензими са протеини с от 62 до 2500 АК остатъка. Установена е каталитичната роля на рРНК – рибозими.

Ензимите се подразделят на еднокомпонентни (прости) и многокомпонентни. В тях **протеиновата част се нарича апоензим**, а **небелтъчната част – кофактор (коензим) или простетична група**, когато е здраво свързана с протеина.

Copyright  
PhD, DSC

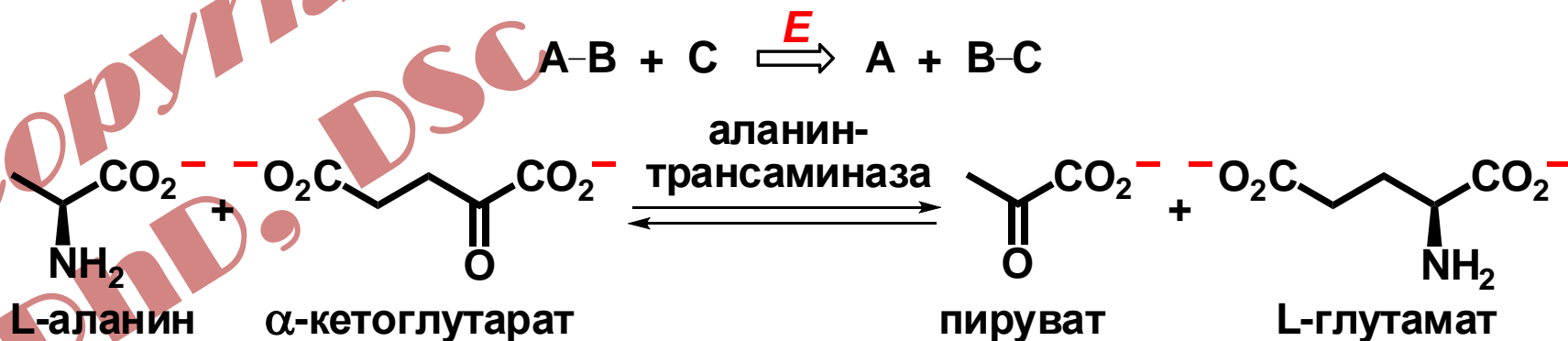
Stefan E. Borodjiev,  
© 2019

Според типа реакция, която катализират, ензимите се класифицират в главните групи (ЕС е Enzyme Commission):

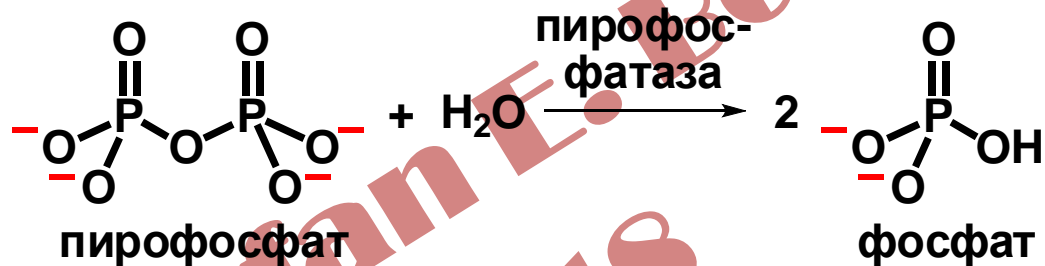
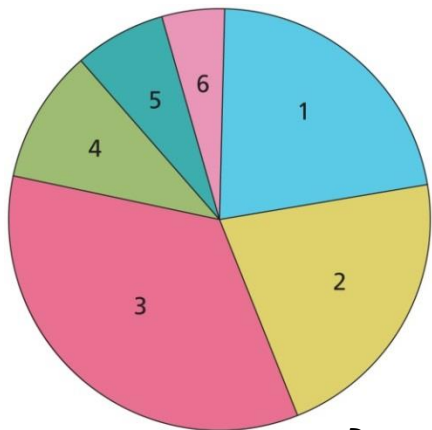
- **оксидоредуктази**, клас ЕС 1 – катализират окислително-редукционни реакции, напр. оксидази, редуктази, дехидрогенази, хидроксилази. Те изискват кофактор като НАД или ФАД.



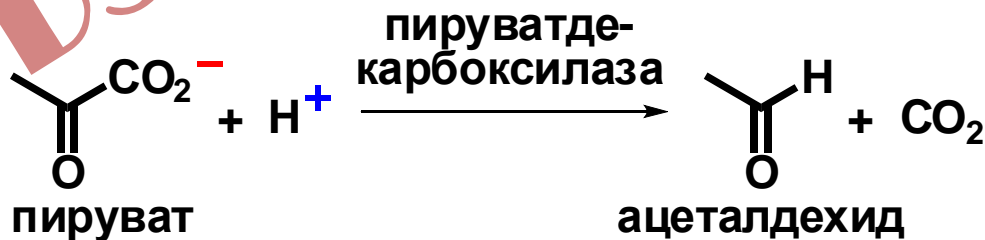
- **трансферази**, клас ЕС 2 – преместват молекулен фрагмент (метилова, фосфатна група), напр. метилтрансфераза, ацетилтрансфераза, аминотрансфераза.



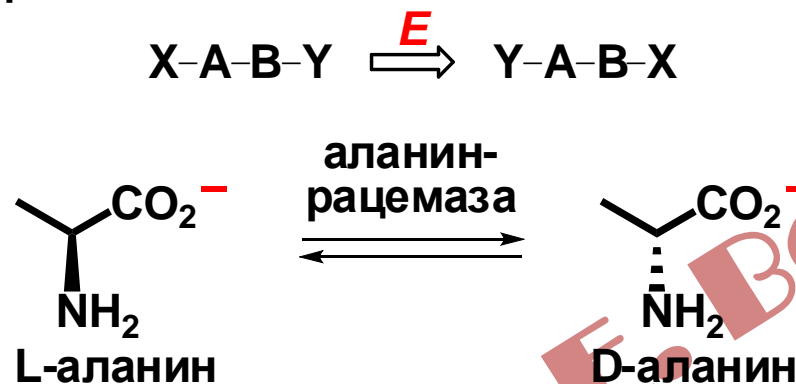
- **хидролази**, клас EC 3 – осъществяват хидролитично разграждане на различни химични връзки, напр. естерази, пептидази, гликозидази, фосфатази.



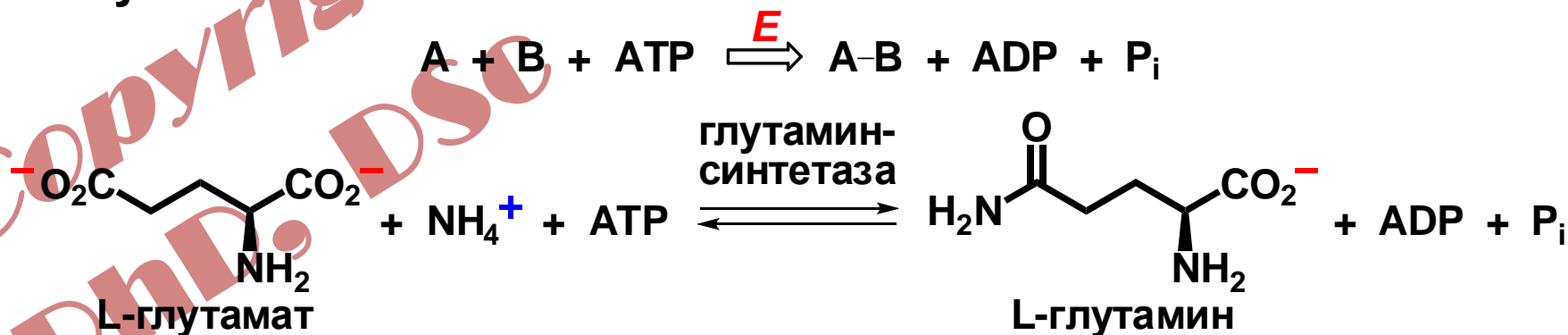
- **лиази**, клас EC 4 – катализират нехидролитично разкъсване на химична връзка, напр. алдолаза, декарбоксилаза.



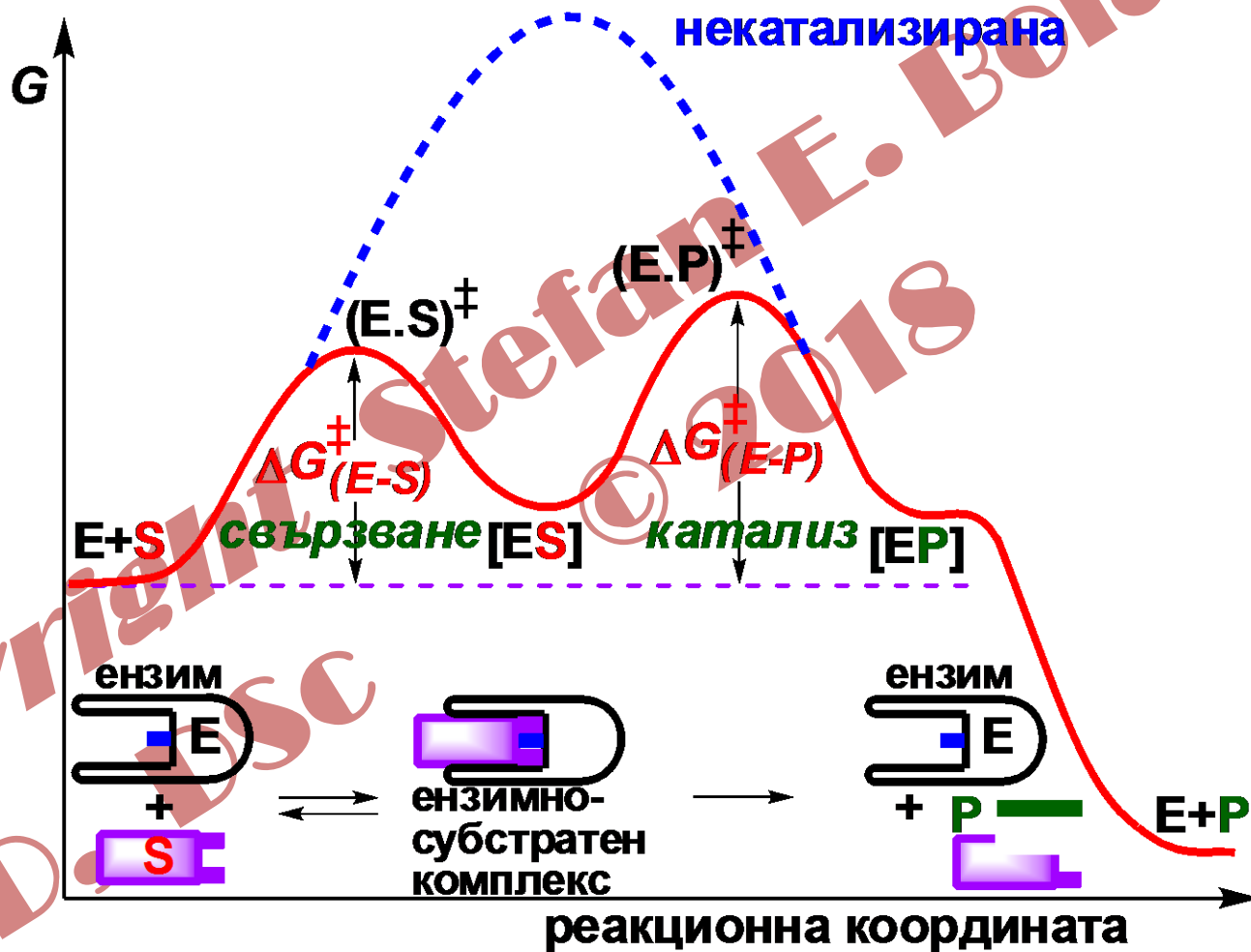
- **изомеразы**, клас EC 5 – катализират изомеризации, напр. епимеразы, рацемази.



- **лигази (синтетази)**, клас EC 6 – катализират синтетични реакции за образуване на C–C, C–O, C–N и други връзки. Те задължително са спрегнати с разграждане на макроергична връзка, обикновено в АТФ, напр. ацетил-СоА-синтетаза, глутаминсинтетаза.



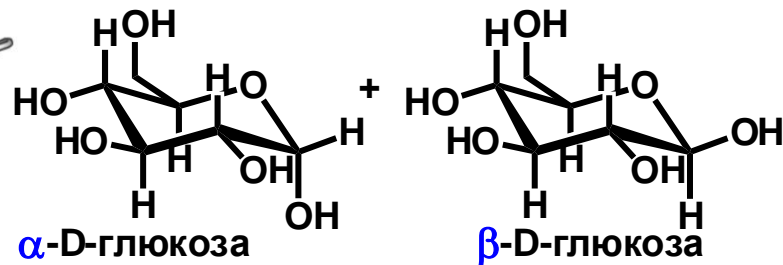
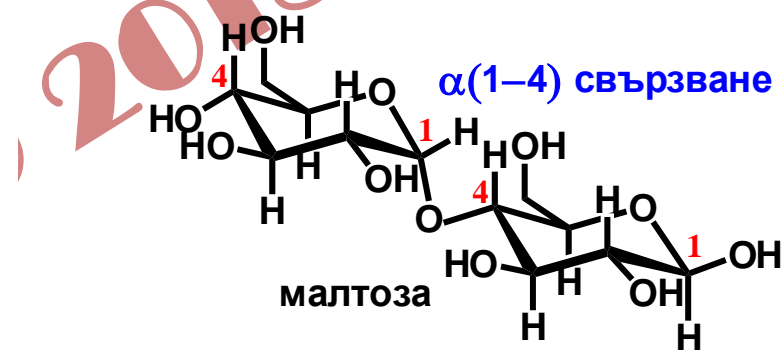
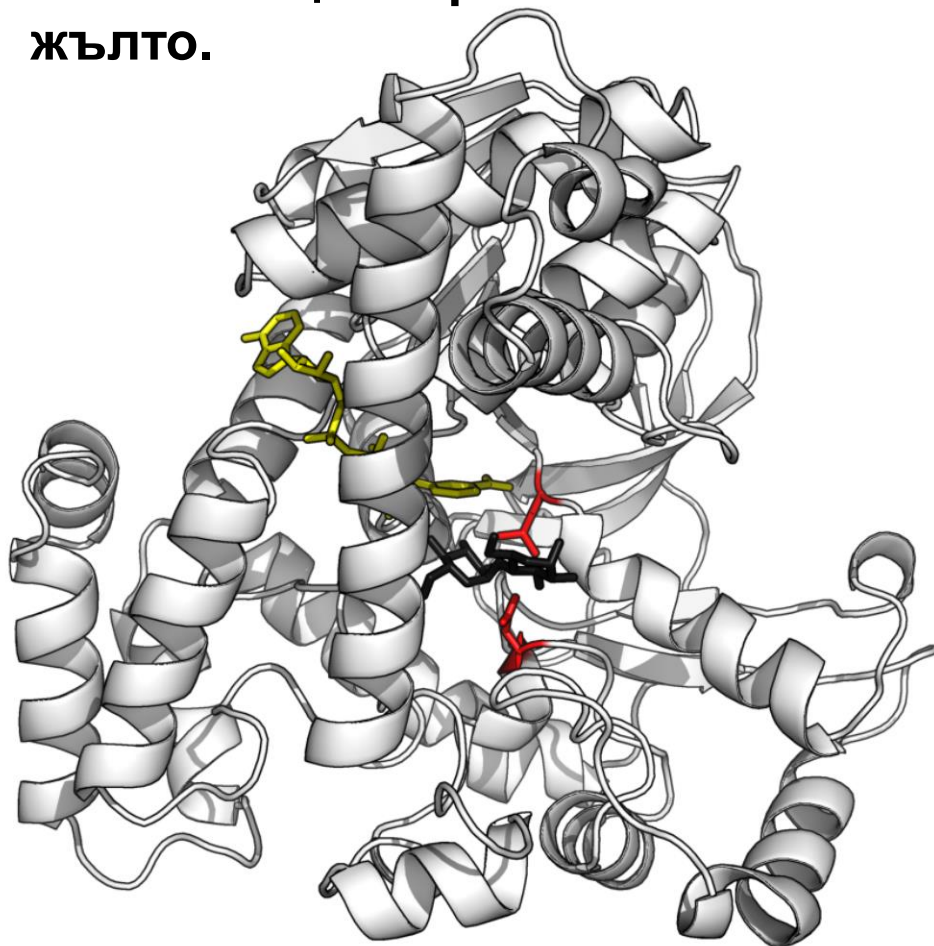
Ензимното действие се дължи на значително понижение на активиращата енергия за дадена реакция (в общия случай, на елементарен стадий). Активиращата енергия за свързване е много преувеличена в графиката.



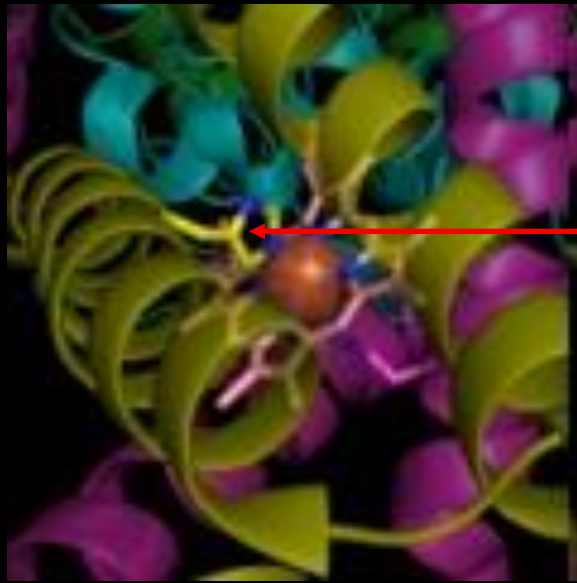
## Функционална конформация на ензими

Ензимът трябва да притежава определена 3D форма за да функционира. Тази форма се нарича функционална конформация.

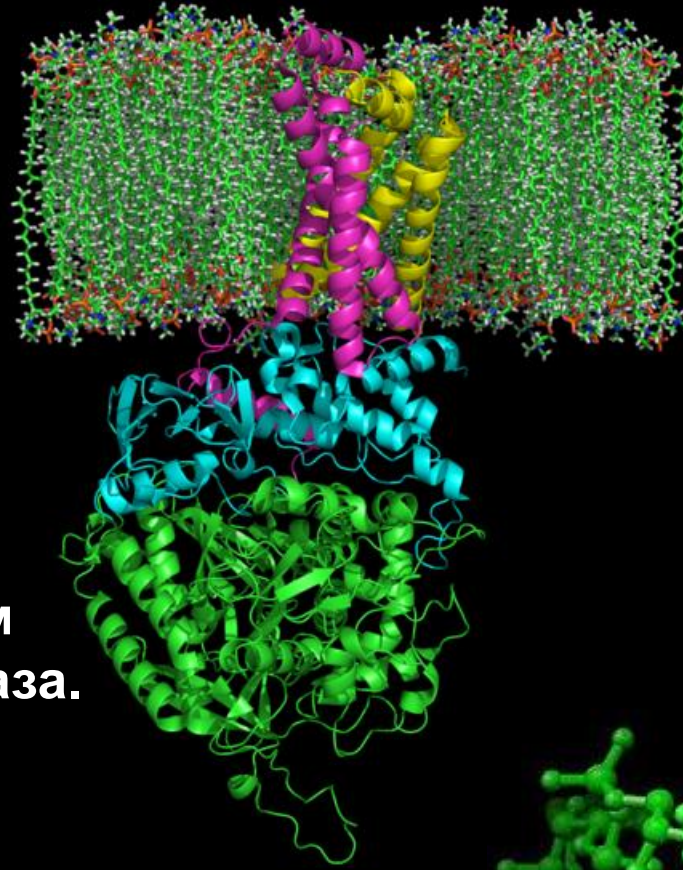
Диаграма на ензима глюкозидаза, който хидролизира малтоза (в черно) до две молекули глюкоза. Аминокиселинните остатъци в активния център са показани в червено и кофакторът, НАД – в жълто.



# Сукцинат дехидрогеназа



His



митохондриална мембрана

Хистидин, координиран към хем в сукцинат дехидрогеназа.

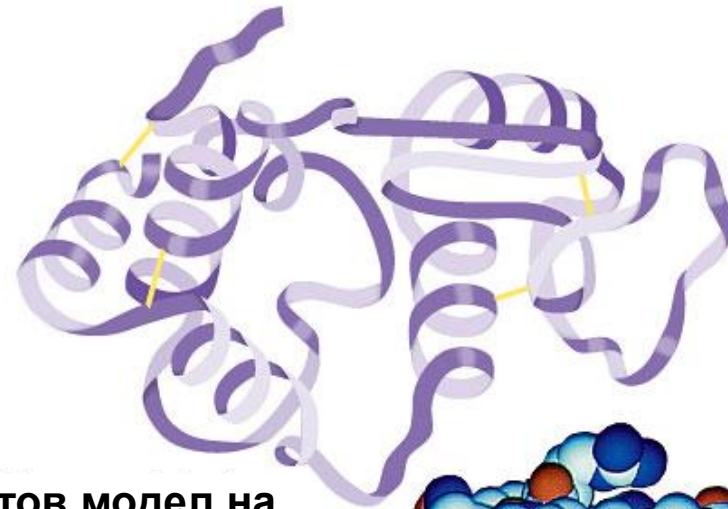
Този ензим е единственият участник и в цикъла на трикарбоксилните к-ни и в митохондриалната верига за електронен транспорт. Окислява сукцинат или редуцира коензим Q.



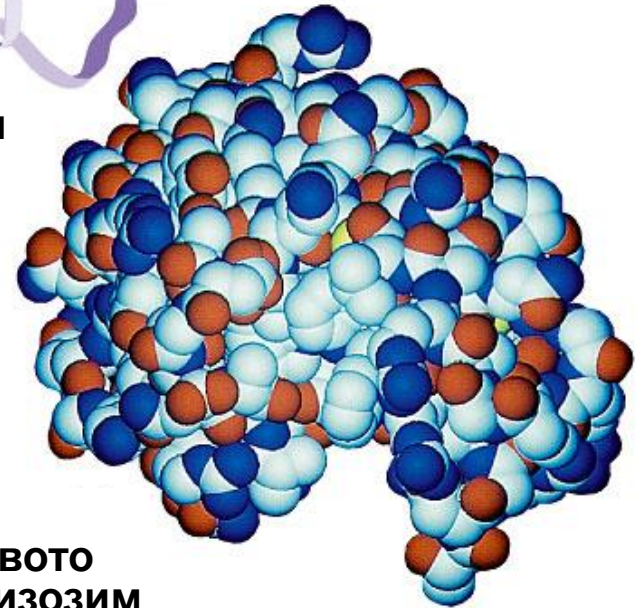
окисление на сукцинат до фумарат

## Лизозим (лизоцим)

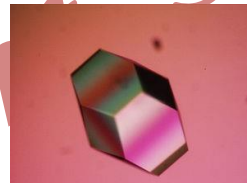
Антимикробен ензим, който поврежда бактериалната клетъчна стена чрез катализирана хидролиза на 1,4- $\beta$ -връзките между N-глюкозамини. Изобилни на лизозим са: слюнка, човешко мляко, яйчен белтък.



Лентов модел на протеина лизозим



Запълващ пространството модел на лизозим



Монокристал лизозим

Доказване на първичната структура (секвениране) на голям протеин по класически методи е дори по-трудно от синтез. Днес се извършва главно с **рентгеноструктурен анализ** или **ДНК анализ**.



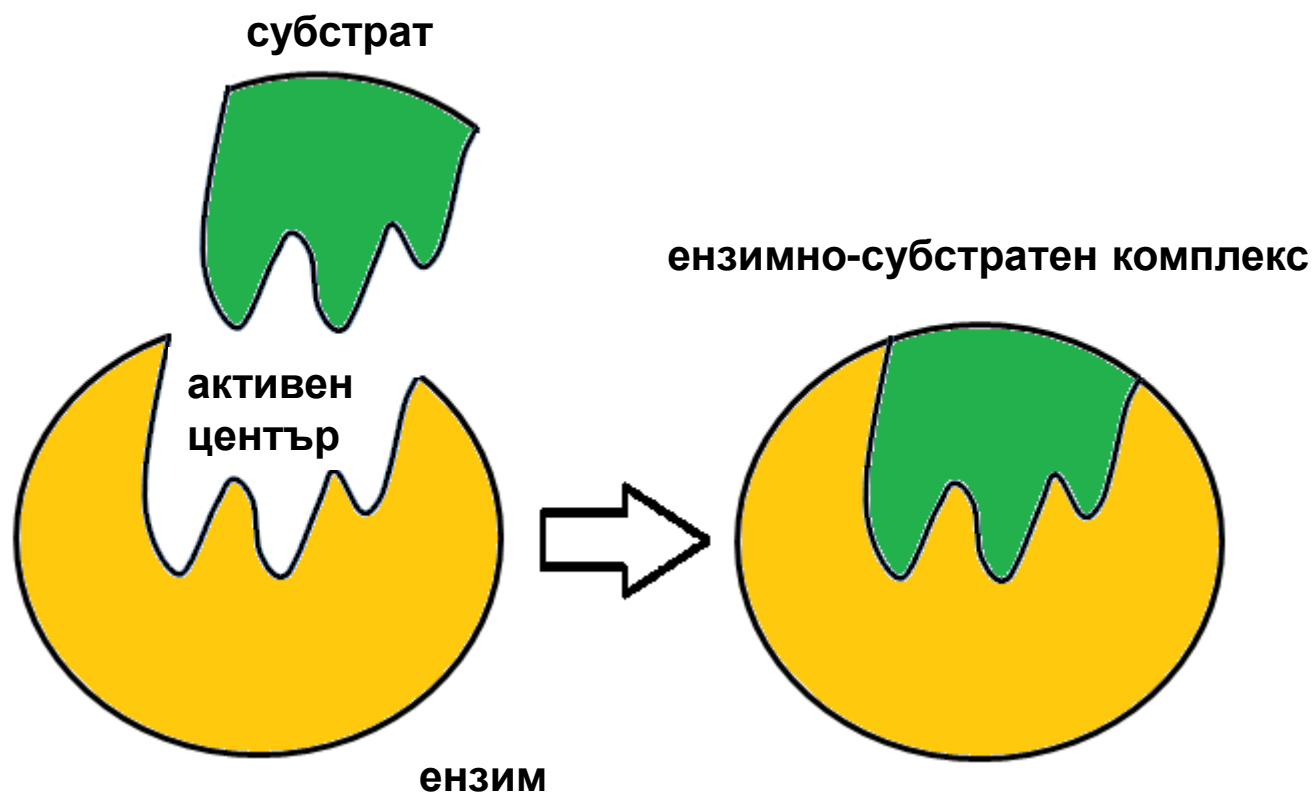
## Активен център

Ензимът разпознава специфична молекула, субстрат, и се свързва с нея в определен, специфичен участък, наречен активен център. Свързването не е трайно и постоянно, а е динамично и зависи от редица фактори.

**Ензимите са изключително селективни – един ензим се свързва само с един субстрат (или група сходни) и катализира една единствена реакция.**

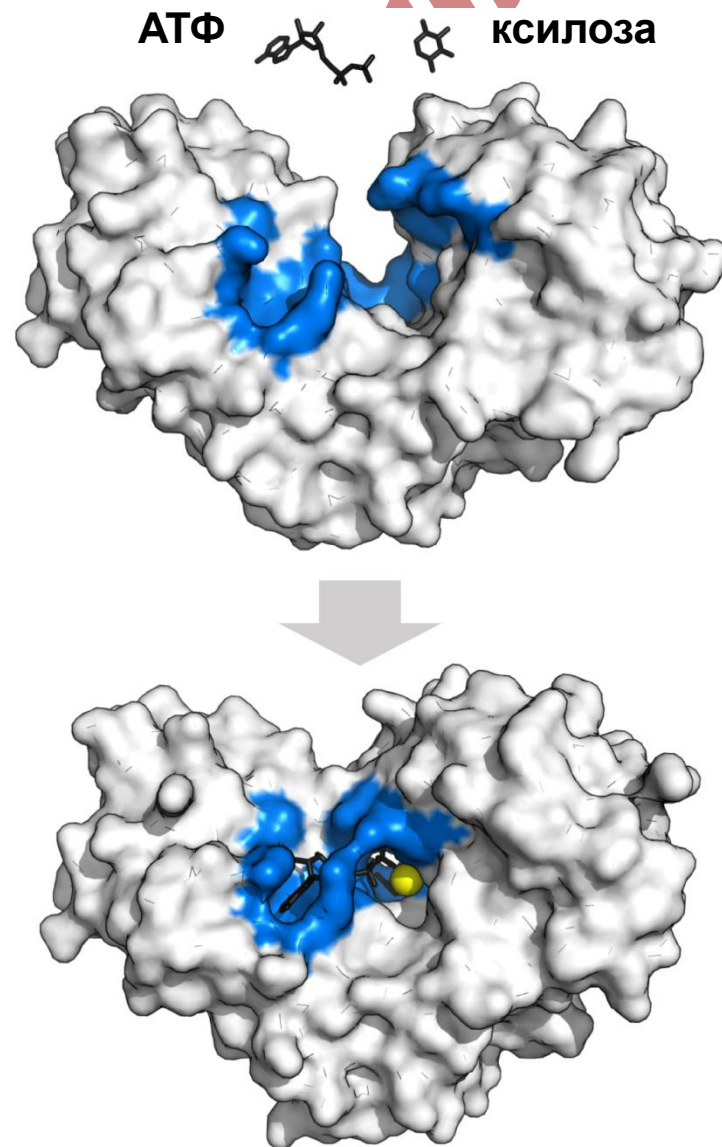
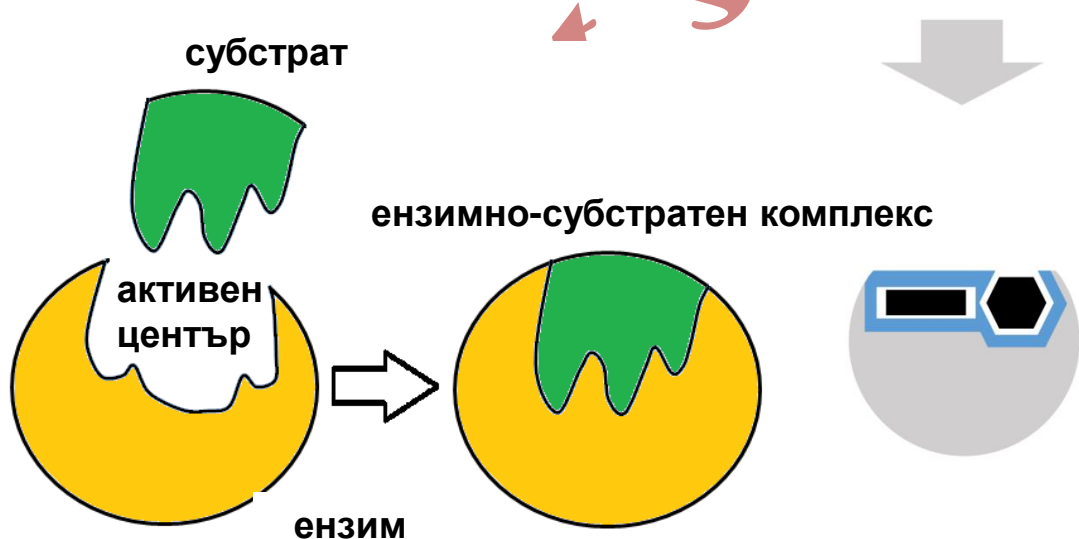
Активният център се състои от няколко АК остатъка, които формират временни връзки (водородни, ван дер Ваалсови, хидрофобни) със субстрата, и АК остатъци, които катализират реакцията. Обикновено активният център е триразмерно, тясно пространство, вдлъбнатина или „джоб“, побиращо само молекула субстрат или две в случаи на дисубстратни реакции.

Активният център се формира в третичната структура, т.е. в него се включват отдалечени в секвенцията АК остатъци. За да се обясни високата ензимна специфичност Е. Фишер, 1894 г., предлага модел "ключ – ключалка", в който се акцентира на необходимата геометрична (по-късно – електронна) комплементарност между ензим и субстрат.



Ензимите са гъвкави и променят конформацията си по време на свързване. Д. Кошланд предлага модификация на модела, 1958 г., в която пълното съответствие се индуцира по време на каталитичния акт.

Фосфорилираният ензим хексокиназа променя формата си, индуцирано от свързване на субстратите ксилоза и АТФ. Активният център е означен в синьо.



Групите в активния център се разглеждат като:

- каталитични, които осъществяват катализата;
- контактни, които свързват и ориентират субстрата;
- помощни, които стабилизират конформацията на активния център.

За да се реализира ефективно свързване на субстрата към активния център **трябва поне три-точково взаимодействие**, което въпреки слабите междумолекулни взаимодействия стабилизира достатъчно ензимно-субстратния комплекс.

Ензимната кинетика е описана математично от Л. Михаелис и М. Ментен, 1913 г.

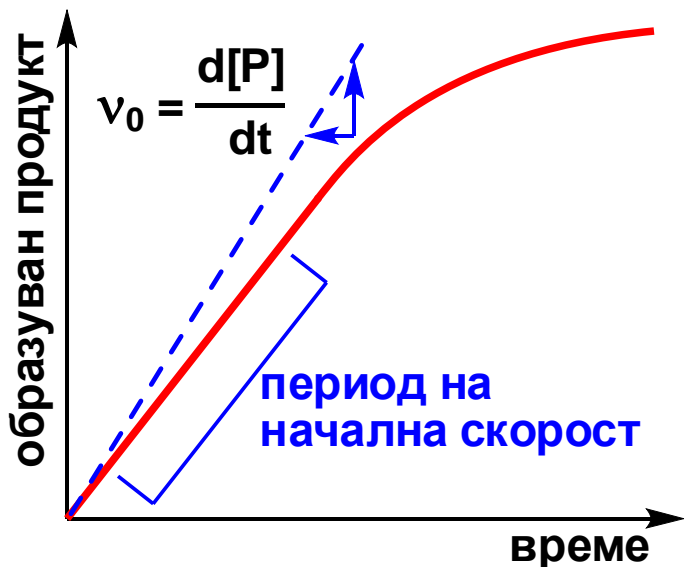


Leonor Michaelis



Maud Menten

Припомняне: химична кинетика **субстрат**  $\xrightarrow{k}$  **продукт**

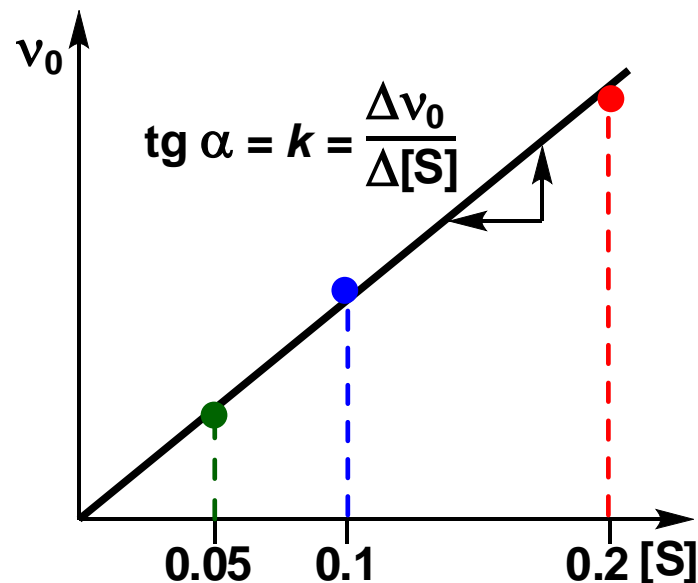
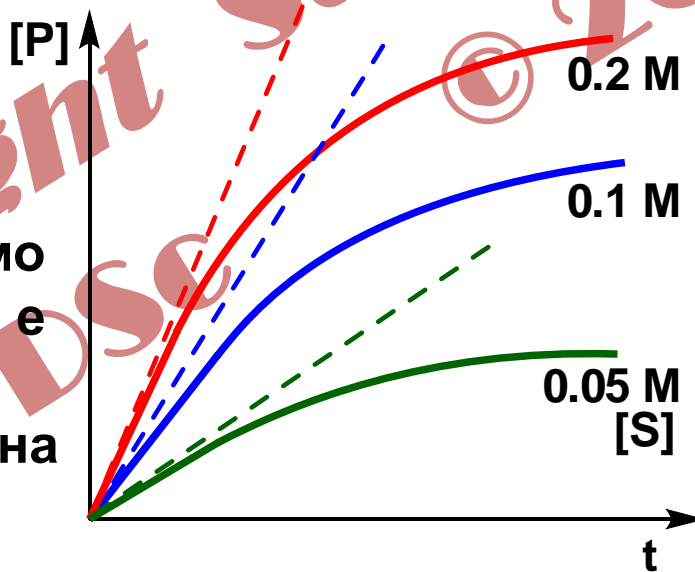


Скорост: количество образуван продукт за една секунда.  
Скоростта намалява с времето поради намаляване концентрацията на субстрата. Измерва се началната скорост  $v_0$ .

Когато се увеличава началната концентрация на субстрата, линейно нараства началната скорост с  $[S]$ .

$$[P] = [P]_0 \cdot e^{-kt}$$

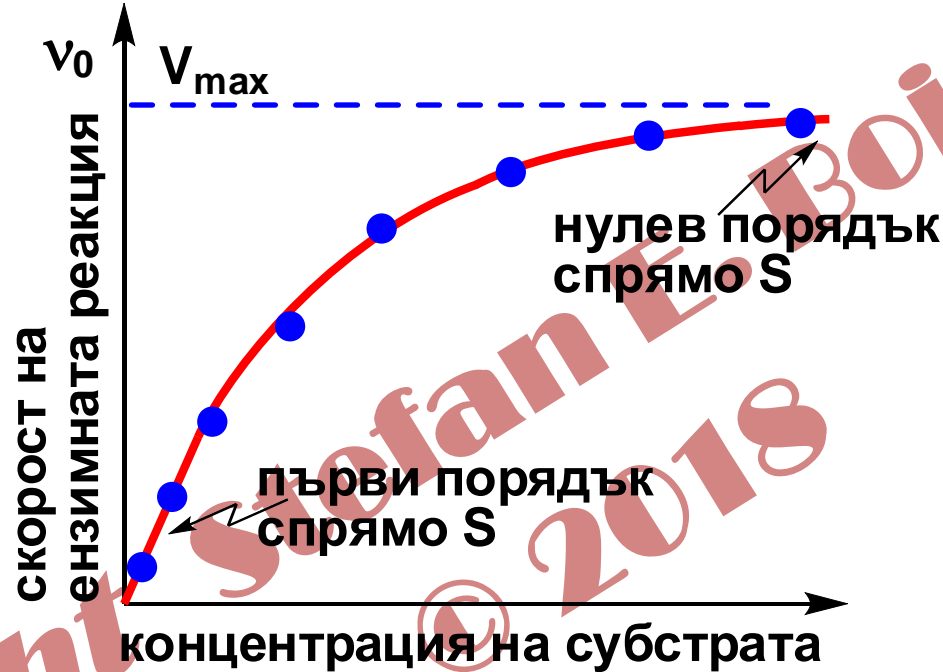
Реакция от първи порядък спрямо  $[S]$  – скоростта е право-пропорционална на  $[S]$ .



## Ензимна катализа, ензимна кинетика

Не се наблюдава линейна зависимост на  $v_0$  от  $[S]$ !

Експериментално е установена общата зависимост:



- Ниска  $[S]$  – скоростта нараства пропорционална на  $[S]$
- Висока  $[S]$  – скоростта е независима от  $[S]$

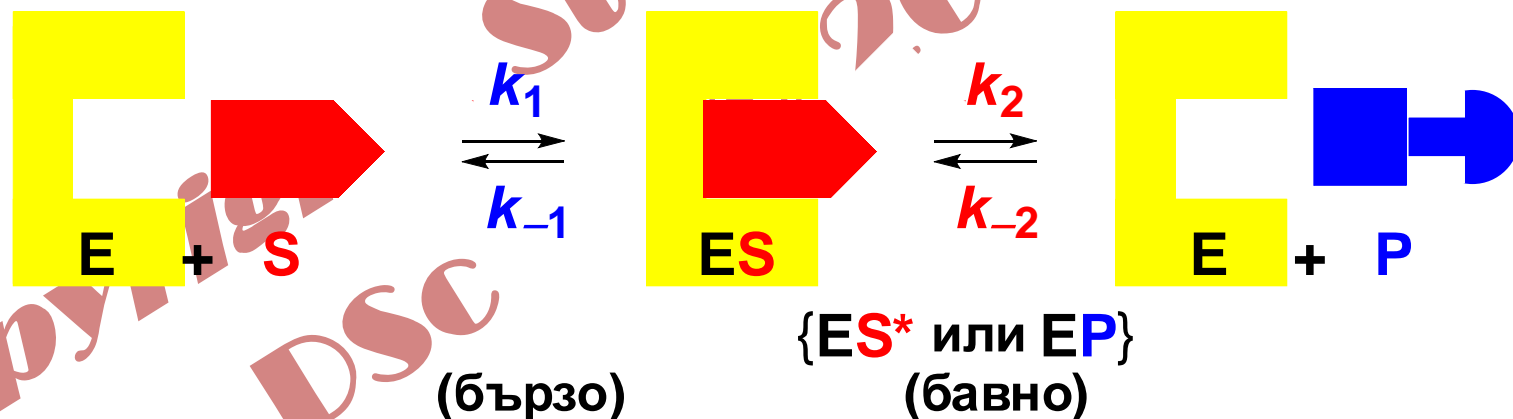
Тази особеност се дължи на **насищане на ензима когато  $[S]$  е висока**. В тези условия ( $[S] \gg [E]$ ) концентрацията на ензима определя скоростта.

Усложнението се дължи на двата компонента, E и S, разглеждани поотделно: (1) с увеличаване [E] до известна степен, нараства  $v_0$  когато [S] е висока; (2) когато общата концентрация [E] = const и е ниска, с нарастване на [S] се установява показаната крива –

хипербола  $y = \frac{ax}{b+x}$ ,  $x = [S]$ .

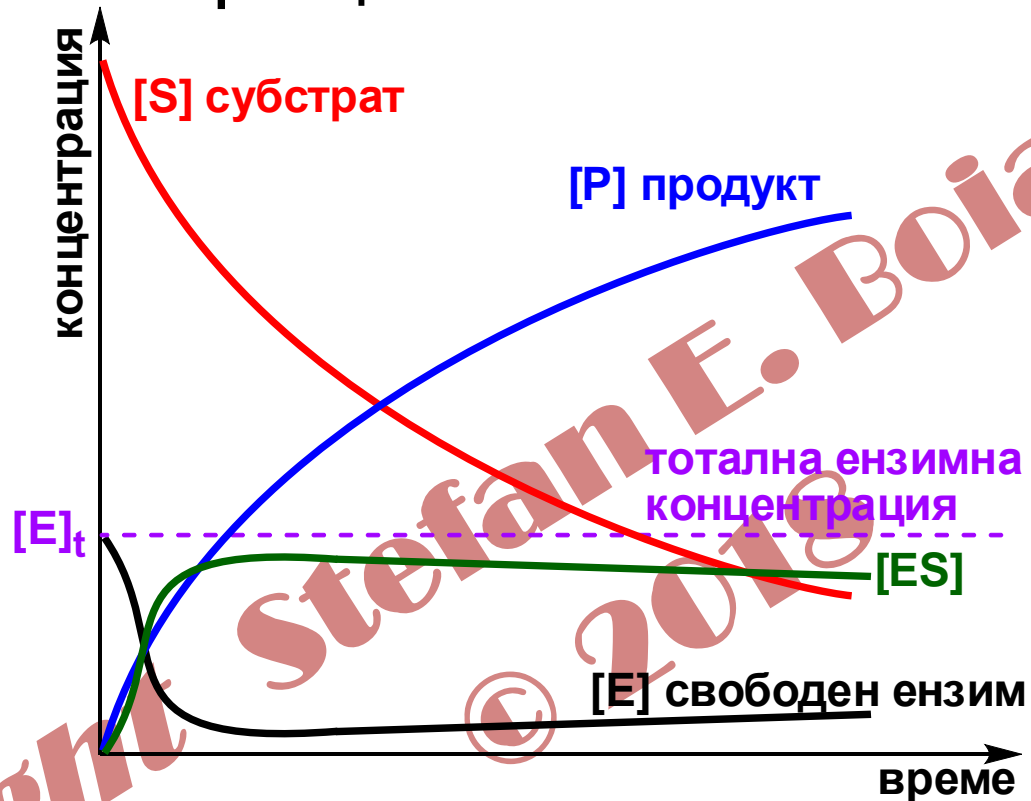
Как се изчисляват параметрите a и b ?

Л. Михаелис и М. Ментен, и по-късно Дж. Холдейн и Г. Бригс, използват квазистационарно (псевдостационарно) състояние за ензимно-субстратния комплекс, т.е. [E•S] = const.



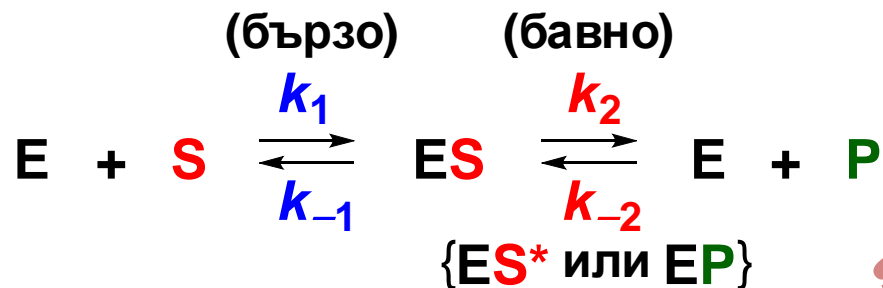
Обикновено се говори за кинетика на Михаелис-Ментен, въпреки че съвременните модели използват извода на Бригс-Холдейн.

Промяната на концентрациите на всички участващи компоненти с времето в ензимната реакция е:



В извода се приема:  $[S] \gg [E]$  и формиране на ES (който е в бързо установяващо се равновесие с E и S) е необходимо за образуване на P. Затова всичкият E ще е наситен и по-нататъшно прибавяне на S не води до по-бърза реакция, т.е.  $v_{\max}$  е параметърът "a". Скоростта като функция от [S] зависи само от дисоциацията на ES до E и S. Съответната равновесна константа (следва) е "b" в уравнението на хипербола.





В началния стадий [P] е ниска и  $k_{-2}$  се пренебрегва, т.е. необратимо каталитично превръщане.



Скоростта на формиране на ES е равна на скоростта на неговото разпадане – това е същността на квазистационарното състояние.

Отбележете: скоростта на формиране на ES е пропорционална на концентрацията на **свободния ензим**, която не може да се измери, но се знае общата [E]. Тогава  $[E]_{\text{св}} = [E] - [ES]$ .

Скоростта на образуване на ES е:

скорост на  
образуване на ES

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 ([E] - [ES]) [S]$$

Комплексът ES се консумира по два пътя: дисоциира обратно до E и S и се превръща в продукт P.

скорост на  
разпад на ES

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Приравняват се двете скорости.

$$k_1 ([E] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Преобразуване: 
$$\frac{[S] ([E] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

Новата константа  $K_m$  се нарича константа на Михаелис.

Изразява се [ES] в стационарно състояние: 
$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Началната скорост зависи от концентрацията на ензимно-субстратния комплекс:

$$v = k_2 [ES] \quad \text{и} \quad [ES] = \frac{v}{k_2}$$

Заместваме [ES] в по-горния израз до уравнението на Михаелис – Ментен.

$$v = \frac{k_2 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

От условието  $[S] \gg [E]$  следва, че всичкият ензим е ангажиран в комплекс и скоростта е максимална:  $v_{\max} = k_2 [ES] = k_2 [E]$

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Анализ (по-подробен в курса по биохимия): порядъкът зависи от стойностите на  $K_m$  и  $[S]$ .

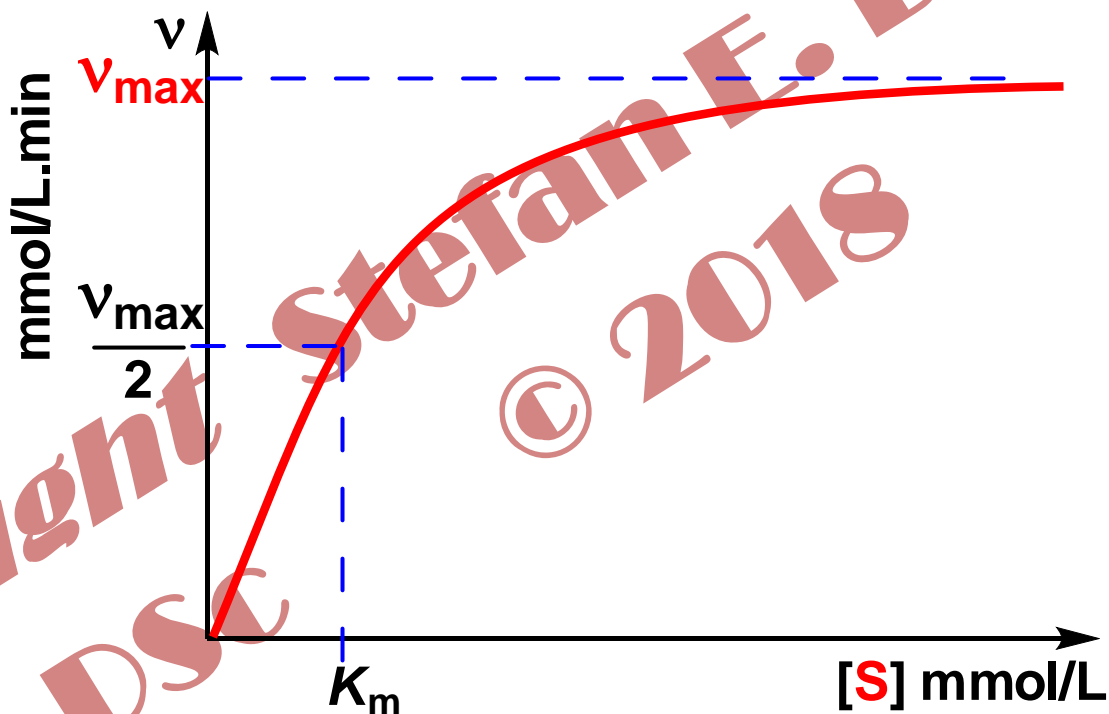
Когато е  $[S]$  много ниска,  $K_m \gg [S]$ , реакцията е от първи порядък спрямо  $S$  и скоростта нараства линейно с нарастване на  $[S]$ .

$$v = \frac{k_2 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m} = \text{const} \cdot [S]$$

Когато е  $[S]$  висока,  $[S] \gg K_m$ , реакцията е от нулев порядък спрямо  $S$  и скоростта доближава асимптотично максималната.

$$v = k_2 \cdot [E] = v_{\max}$$

Когато  $[S] = K_m$ , скоростта е  $1/2$  от максималната,  $v_{\max}$ .



$K_m$  е мярка за афинитета между  $S$  и  $E$ . Малка  $K_m$  означава висок афинитет – по-малка  $[S]$  е необходима за достигане до полумаксимална скорост.

## Механизъм на ензимно действие, серинова протеаза, протонна совалка

Изучените основни механизми в органичната химия са напълно и изцяло приложими и към биохимичните реакции, катализирани от ензими.

Припомнете от Тема 45: хистидинът е единствената аминокиселина с изоелектрична точка  $pI = 7.6$  около физиологично  $pH$ . Стойността означава, че около половината хистидинови остатъци в протеини са протонирани, а останалите са базични. Реакциите на протониране / депротониране са много бързи и затова хистидинът бързо и лесно приема / отдава протон.

В активния център на някои ензими се намира хистидинова "протонна совалка". Чрез нея в каталитични триади базичният азот на хистидина отнема протон от серин, треонин или цистеин, с което ги превръща в активни нуклеофили. Много бързо след това, хистидинът отдава протона на друга молекула и е готов за нов транспорт на протон в следващото каталитично превръщане.

**Сериновите протеази** са ензими, които разкъсват пептидни връзки в протеини започвайки катаболизма им. Серинът в активния център на серинова протеаза е нуклеофилът, който извършва катализираното превръщане – катализирана хидролиза на –CONH– връзки. Те, амидните, са здрави !

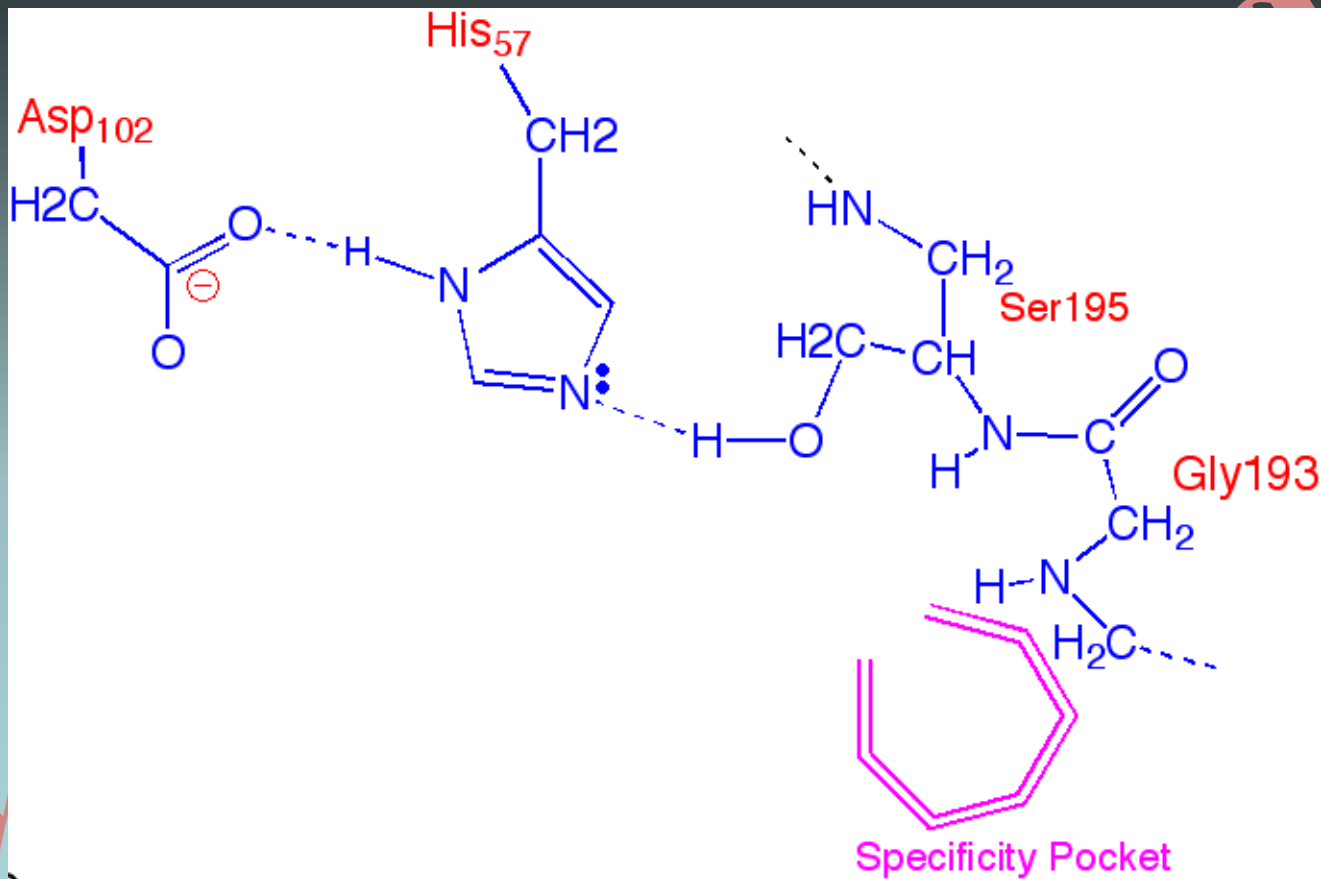
Типични серинови протеази са подобни на **субтилизин** или на **химотрипсин и трипсин**. Те са храносмилателни ензими в дуодендумата на хората, заедно с пепсин (аспартова протеаза).

Каталитичната триада в химотрипсина се състои от хистидин 57, аспартат 102 и серин 195. **Серинът се активира като нуклеофил от His 57** и чрез  $A_N$  реакция образува анионни междинни фрагменти в активния център.

В активния център са включени и още АК остатъци, означени като "свързващ джоб".

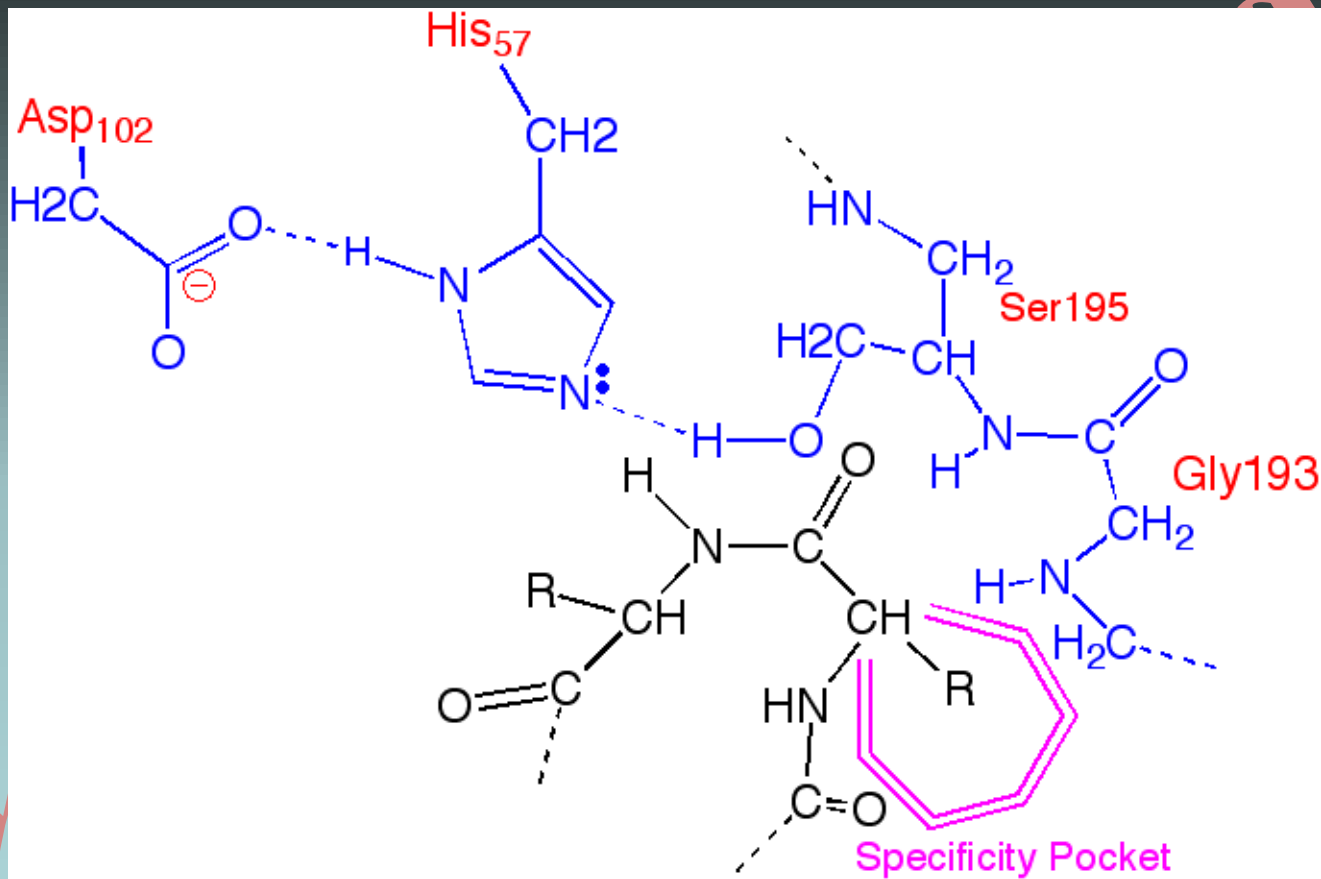
# Серинова протеаза в действие

## Пример с хидролитичния механизъм на химотрипсин



Протеинът субстрат се асоциира с  $k_1$  в активния център и се ориентира с C=O групата към серина за хидролиза.

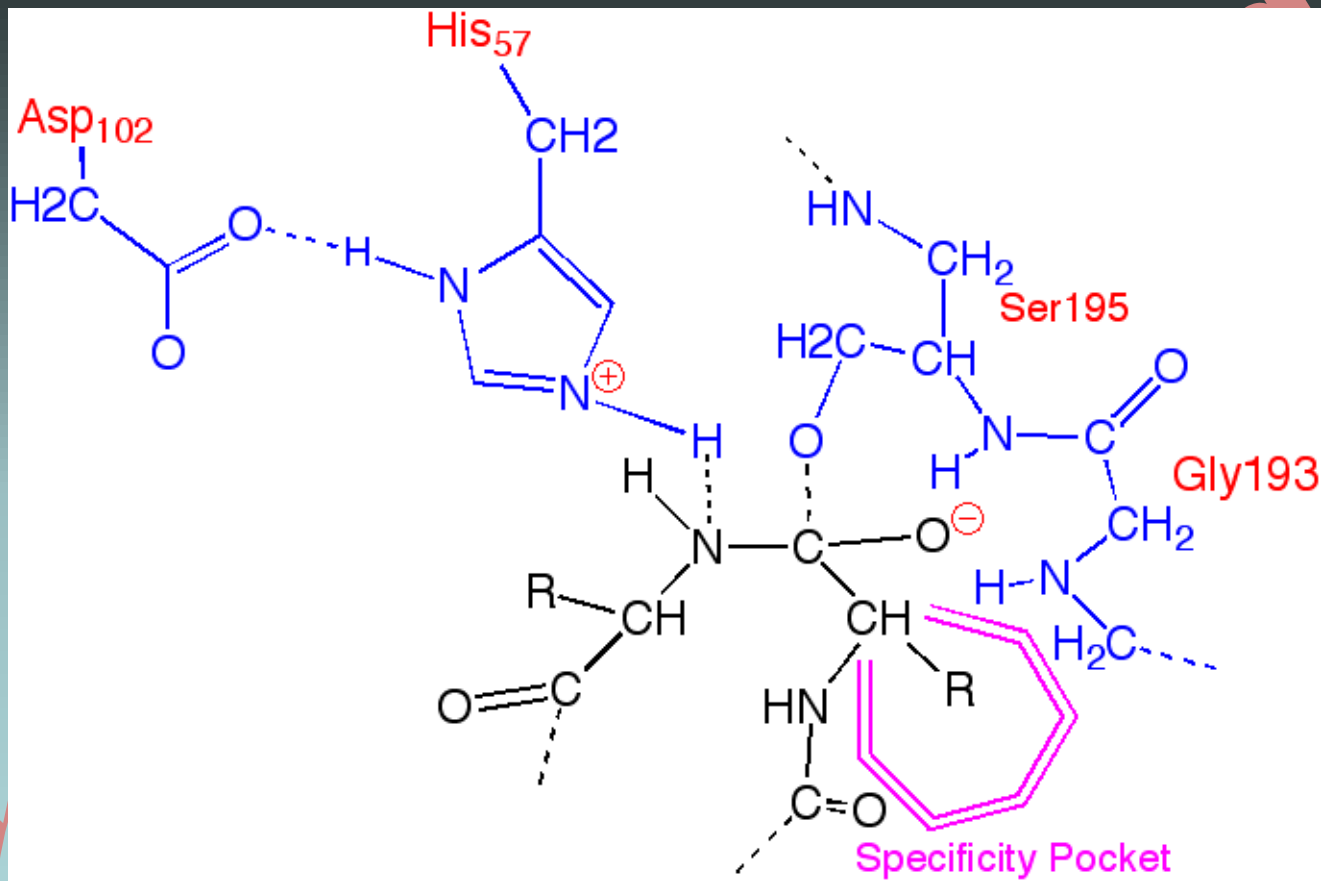
Хистидинът, подпомогнат от аспаратат, отнема  $H^+$  от серин и създаденият от него  $Nu$  се присъединява към  $C=O$ ,  $A_N$ .



Образува се тетраедричен интермедиат. Неговият  $O^-$  приляга плътно в така наречената "оксианионна дупка" от Gly 193 и Ser 195 и преходното състояние се стабилизира чрез водородни връзки.



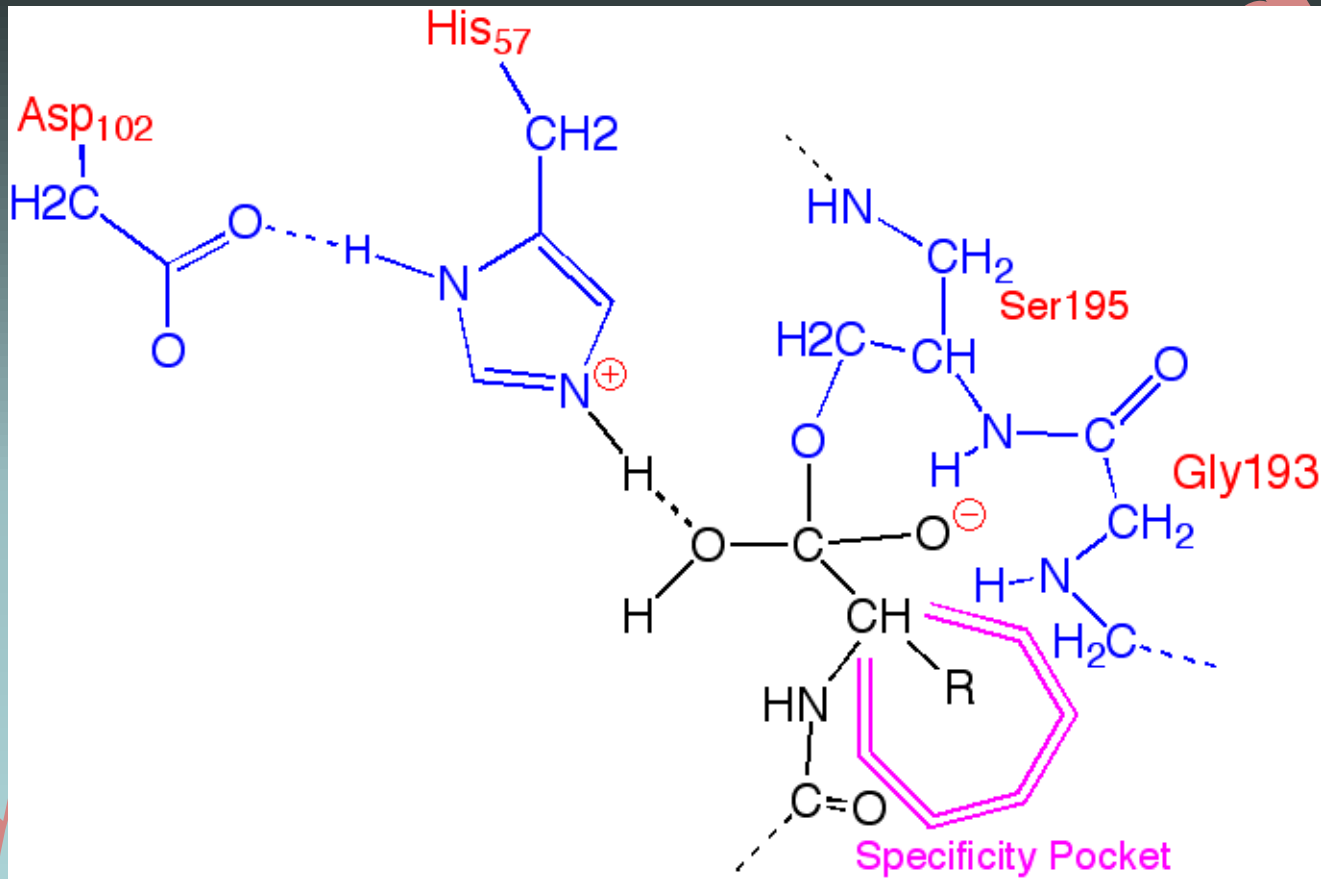
Разкъсва се връзката N–C(O), елиминиране, с добавяне на H<sup>+</sup> от His 57.



От O<sup>-</sup> се възстановява двойната връзка C=O.  
N-Крайт напуска и остава ацил-ензим.

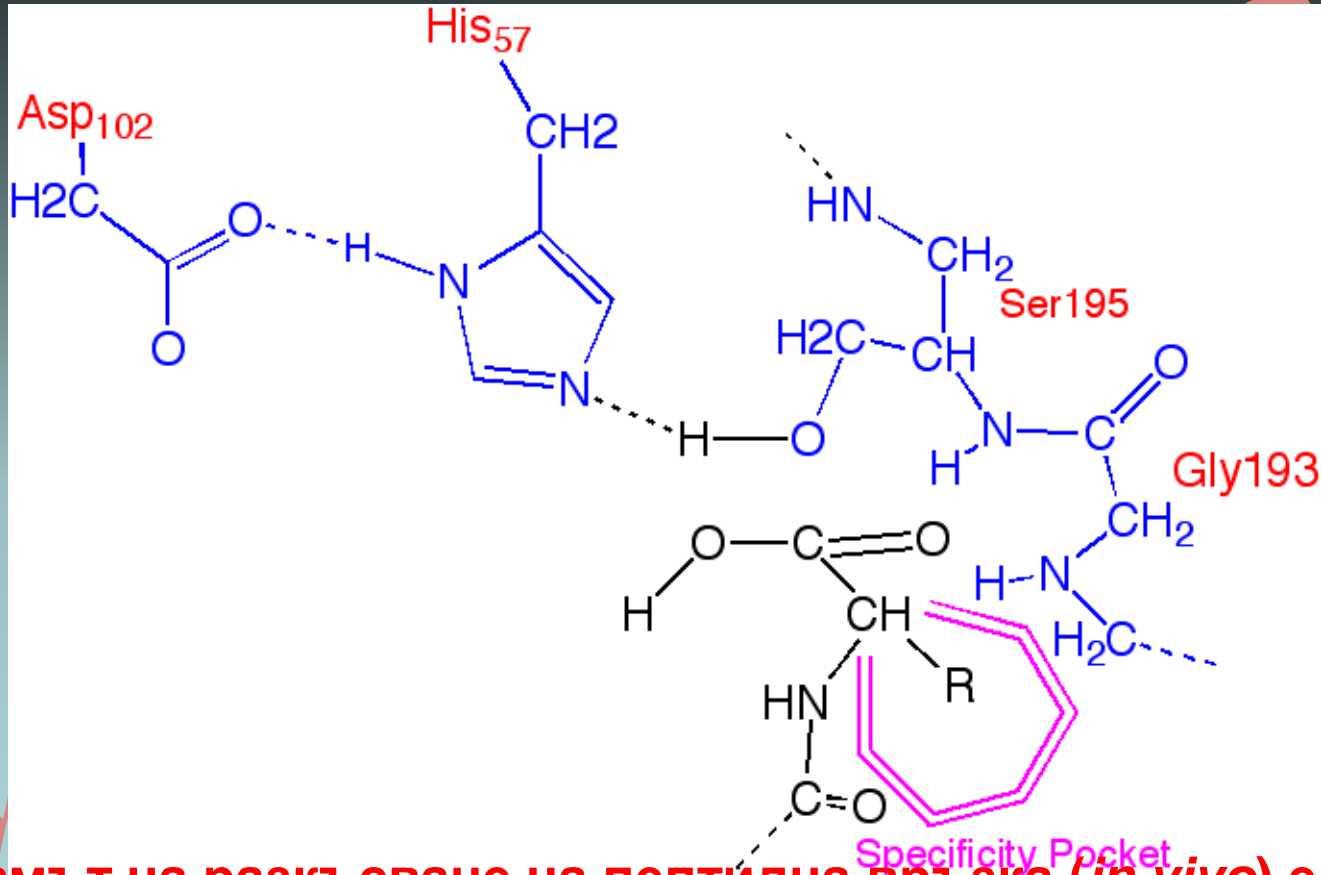


Хистидинът отдава протон на сериновия остатък и се разкъсва връзката ензим – пептид.



Стадият е елиминиране на сериновия остатък.  
Общо два пъти  $A_N - E$ .

**C-Краят напуска ензима и химотрипсинът е готов за следваща хидролиза. Имидазолът в хистидин е протонна совалка в каталитичната триада на серинови протеази.**



**Механизмът на разкъсване на пептидна връзка (*in vivo*) е същият, както обсъжданият в Теми 23 и 24 за образуване/хидролиза на производни на карбоксилни киселини: ацилно нуклеофилно заместване, което се състои от присъединяване–елиминиране,  $A_N - E$ .**

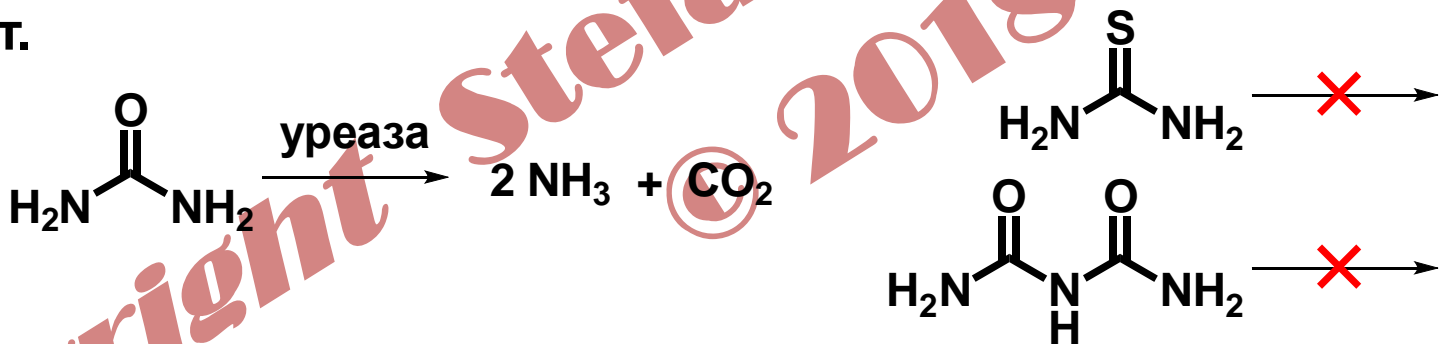
## Стереоспецифичност и стереоселективност

Ензимите са изключителни катализатори по своята хемоселективност, региоселективност и стереоспецифичност.

**Хемоселективност** означава получаване на един продукт от няколко възможни алтернативни реакции.

**Субстратна ензимна специфичност** е свързване с един единствен субстрат (абсолютна специфичност) или с няколко подобни по структура субстрати (групова специфичност).

Например, уреазата разгражда само уреа, но не тиоуреа или биурет.



Глюкокиназата фосфорилира само глюкоза, но не и други монозахариди.

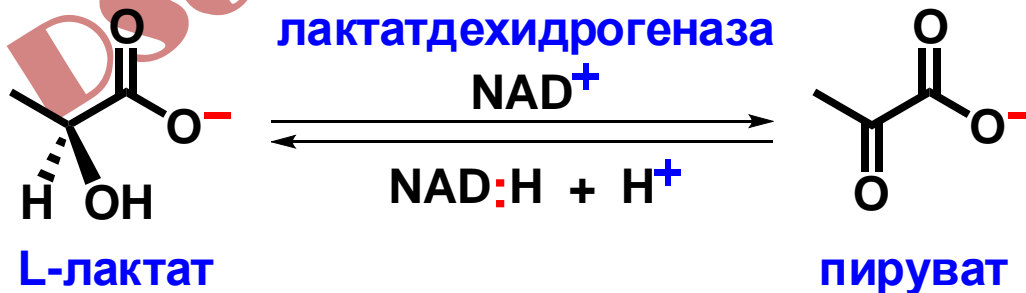
Гликолитичният ензим хексокиназа фосфорилира не само глюкоза, но и галактоза, маноза и фруктоза с групова специфичност.

**Стереоспецифичност** е свойство на реакционен **механизъм**, който води до различни стереоизомерни продукти от различни стереоизомерни реагенти или **който оперира само върху един от няколко стереоизомера**.

Ензимът от цикъла на трикарбоксилните киселини фумарат хидратаза използва само фумарова киселина (*транс*-) като субстрат, но не и стереоизомерната малеинова киселина (*цис*-).



Лактатдеhydroгеназата у млекопитаещи превръща само L-лактат в пируват, но не и енантиомерния D-лактат. D-лактатдеhydroгеназа се среща у бактерии, гъбички и някои животни.



**Стереоселективност** е свойство на **химична реакция**, в която **единствен реактант дава предпочетено един от няколко възможни стереоизомера** когато се създава нов стереоцентър или се трансформира вече съществуващ стереоцентър. Селективността се дължи на стерични и електронни ефекти в някои стадии от механизма, които водят до различни продукти.

**Енантиселективна е една реакция**, в която се получава предпочетено единият енантиомер от ахирален реактант.

**Ензимите са напълно стереоселективни и в частност – напълно енантиселективни.**

Само D-въглезахидрати и L-аминокиселини се биосинтезират посредством ензими в преобладаващото мнозинство живи организми.

Произходът на природната стереоселективност е все още обект на изследвания и спорове.

Малки хирални молекули, като фосфолипиди, стероиди, алкалоиди също се биосинтезират със 100% енантиселективна ензимна катализа.

Ензими се използват в химичната индустрия когато се изисква екстремна каталитична специфичност и стереоселективност. Приложението на ензими се ограничава от тяхната нестабилност при по-висока температура и в органични разтворители.

Ограничението започва да се преодолява чрез **протеиново инженерство**, с което се създават нови ензими работещи *in vitro* в непознати в природата реакции.

Copyright  
PhD, DSC

Stefan E. Bojadiev  
© 2018



***Copyright* Stefan E. Boiadjev, PhD**  
**© 2018**