

ФЕРМЕНТЫ - I

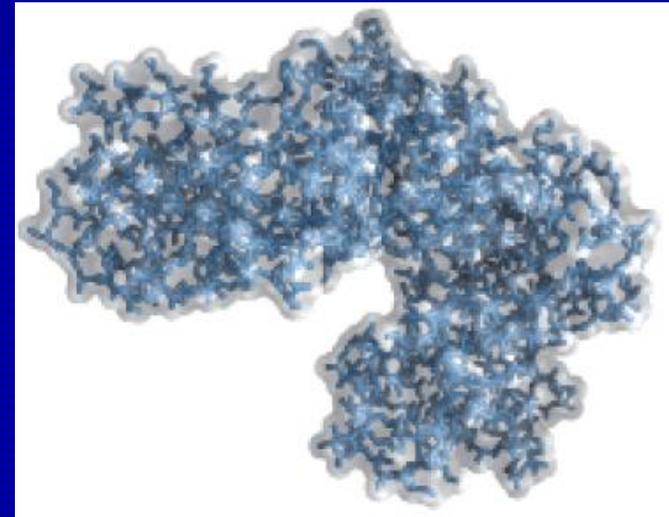
Наумов А.В.

«ЖИЗНЬ – сложная совокупность
химических реакций, катализируемых
специфическими ферментами»

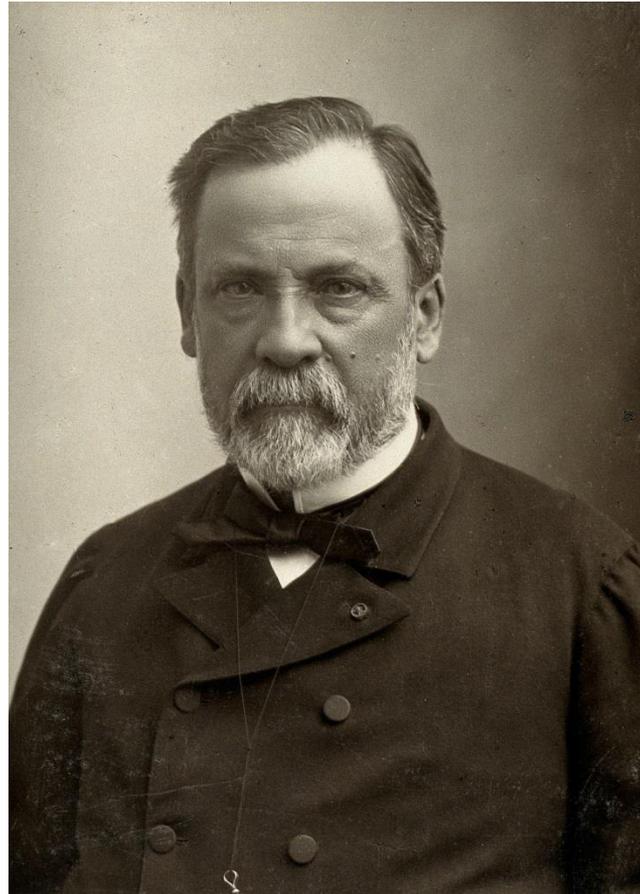
И.П. Павлов

Ферменты – это специфические белки клеток, выполняющие роль биологических катализаторов.

За исключением **рибозимов** – молекул РНК, имеющих ферментативную активность – все ферменты по природе – белки.



История изучения ферментов



- 50-е г 19 века **Луи Пастер** – показал микробиологическую сущность брожения.

История изучения ферментов

- В 1877 немецкий физиолог **Wilhelm Kühne (Кюне)** предложил термин «ЭНЗИМ».
- 1897 **Бухнер** – сахар превращается в спирт экстрактом из дрожжевых клеток.
- Начало 20 века **Э. Фишер** – применение ферментов для синтеза химических соединений.
- 1913 **Михаэлис, Мэнтен** – кинетика ферм. реакций.
- 1926 **Дж. Самнер** – выделил уреазу (белок).
- 1930 **Дж. Нортроп** – кристаллизировали **пепсин** и **трипсин**.

Рибозимы

Рибозимы – молекулы РНК, обладающие каталитической активностью (РНК-ферменты)

рибозимы

малые

(< 200 нуклеотидов)

вируса гепатита D,
сателлитной РНК Варкуда
нейроспоры

репликация вирусов

большие

(> 200 нуклеотидов)

интроны группы I
интроны группы II

автосплайсинг РНК в
органеллах

Созревание тРНК

рибонуклеаза Р

рибосомальная РНК

синтез полипептидной цепи

Химическая природа ферментов

- При гидролизе распадаются до **аминокислот**.
- Инактивируются при денатурации (кипячение).
- Ферментативная активность пропорциональна количеству белка.
- Обладают физико-химическими свойствами белков.
- Получены в виде кристаллов белка.
- Обладают высокой специфичностью действия.

Свойства ферментов

- **Не расходуются** в реакции.
- Проявляют эффект в **малых** концентрациях.
- **Не влияют** на величину **констант равновесия** реакции.
- Их действие подчиняется **закону действующих масс**.
- Не изменяют **направление** реакции

Отличие от **неорганических** катализаторов

- ферменты **термолабильны**;
- активность зависит от **pH**;
- обладают **специфичностью** действия;
- скорость ферментативных реакций имеет определенные **кинетические закономерности**;
- активность зависит от действия регуляторов – **активаторов** и **ингибиторов**.
- некоторые ферменты при формировании III и IV структур подвергаются **посттрансляционной модификации**;
- **размеры** молекулы фермента значительно больше субстрата.

Механизм действия ферментов

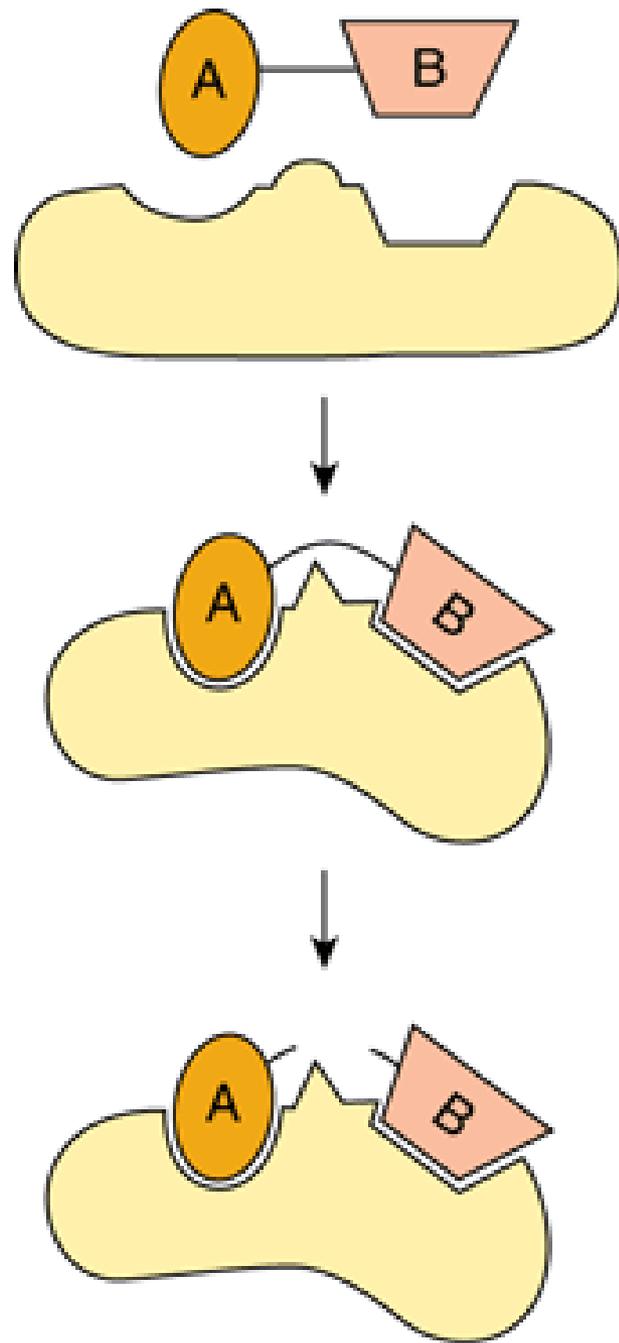


- **E** – фермент
- **S** - субстрат
- **[ES]** – фермент-субстратный комплекс
- **P** – продукт реакции.

Связи фермент-субстратного комплекса – ковалентные и нековалентные (ионные, водородные, гидрофобные).

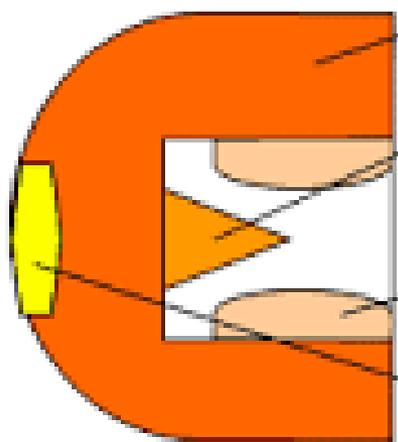
Механизмы, облегчающие ферментативный катализ.

1. **Пространственный (конформационный)** (сближением).
2. **Кислотно-основной катализ** (семейство аспартатных протеаз – пепсин, лизосомальные катепсины, HIV).
3. **Катализ напряжением** (стадия промежуточного интермедианта) – литические реакции.
4. **Ковалентный катализ** (сериновые протеазы – химотрипсин, реакции трансаминирования – «пинг-понг»).



Строение фермента

Строение фермента



1. Апофермент – тело фермента (белковая часть)
2. Каталитический центр
3. Субстратный центр (контактные площадки)
4. Активный центр фермента
5. Аллостерический центр

Активный центр фермента

- участок молекулы фермента, который специфически взаимодействует с субстратом.



В активном центре различают:
участок связывания;
каталитический участок.

Аллостерический центр

- участок молекулы фермента, с которым связываются **активаторы** или **ингибиторы**.

В результате происходят **конформационные изменения** в активном центре фермента, что приводит к повышению \uparrow или понижению \downarrow ферментативной активности.

Структура фермента

- Простые ферменты – состоят только из аминокислот.

Сложные ферменты – кроме белковой части содержит небелковый компонент (простетическую группу).

Простетическая группа

– небелковая часть, которая плотно и стабильно встраивается в белковую структуру фермента с помощью ковалентных и нековалентных связей.

- ✓ пиридоксальфосфат (**B₆**), флаavin моноклеотид (ФМН), флаavin аденин динуклеотид (ФАД) (**B₂**), тиамин пирофосфат (**B₁**), биотин (**B₇**) и пр.
- ✓ ионы металлов: **Co**, **Cu**, **Mg**, **Mn**, и **Zn** - металлоферменты.
- ✓ могут входить: **гем** и **железо-серные кластеры** и пр.

Простетические группы — это подкласс **кофакторов**.

Кофакторы

– выполняют такую же функцию как и простетические группы, но находятся в **нестабильной, диссоциированной** форме по отношению к ферменту либо субстрату.

В отличие от стабильно связанных простетических групп, для протекания реакции **кофактор должен присутствовать в растворе, окружающем фермент.**

Ферменты, которым необходим ион металла в качестве **кофактора** носят название **ферменты, активируемые металлом.**

Коферменты

группа транспортных агентов (рециклические переносчики), которые переносят многие **субстраты** для ферментативных реакций в пределах клетки.

Коферменты отличаются от простетических групп тем, что связаны с ферментами **непостоянно**.

Выполняют две функции:

- 1) **стабилизируют** и **переносят протоны** в содержимом клетки (ФАД H_2 , НАД H_2);
- 2) распознают и **связывают** некоторые **химические группировки** необходимые для ферментов-мишеней:
 - *ацетат* (кофермент А),
 - *метильные группы* (тетрагидрофолаты (**B₉**),
 - *олигосахариды* (долихол).

Некоторым ферментам и ферментным комплексам требуется несколько **кофакторов**.

Мультиферментному пируват дегидрогеназному комплексу - требуется **5** органических **кофакторов** и один **ион металла**:

- прочно связанный тиамин пирофосфат (**ТДФ**);
- ковалентно связанный **липоамид** ;
- флаavin аденин динуклеотид (**ФАД**) ;
- никотинамид аденин динуклеотид (**НАД**)
- коэнзим А (**КоА**) ;
- ион металла (**Mg²⁺**).

К коферментам относятся :

производные витаминов (группы В):

никотинамид (**B₃**, **PP**) – кофермент НАД и НАДФ;

рибофлавин (**B₂**) – кофермент ФМН и ФАД;

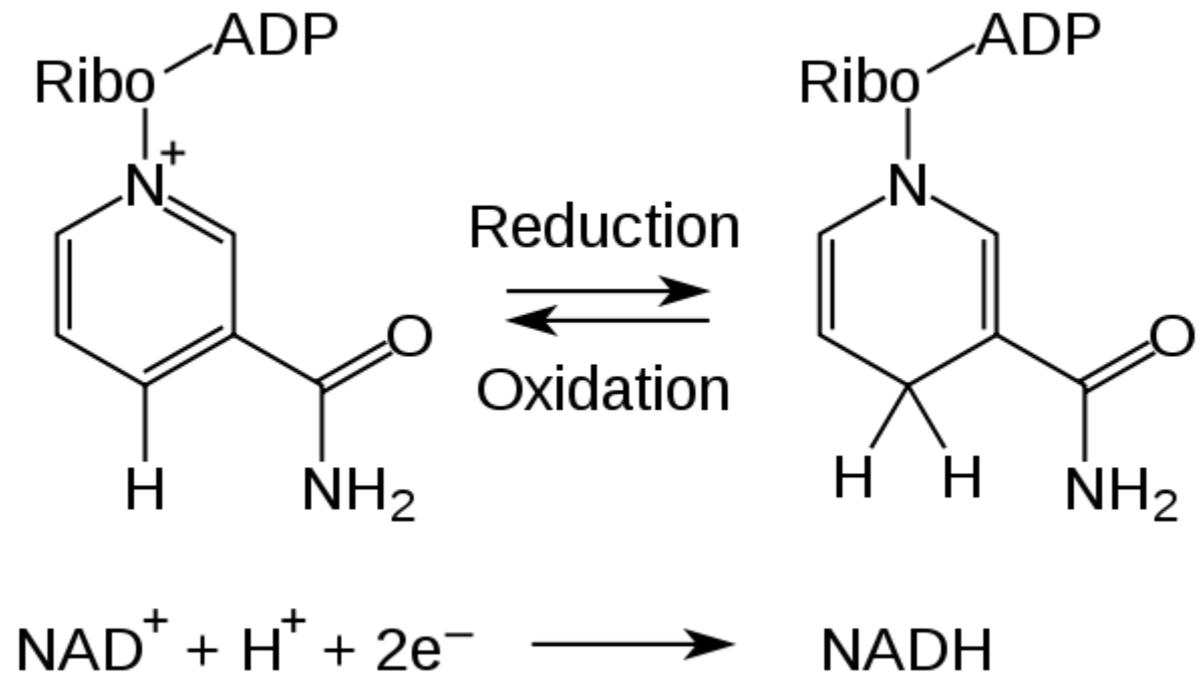
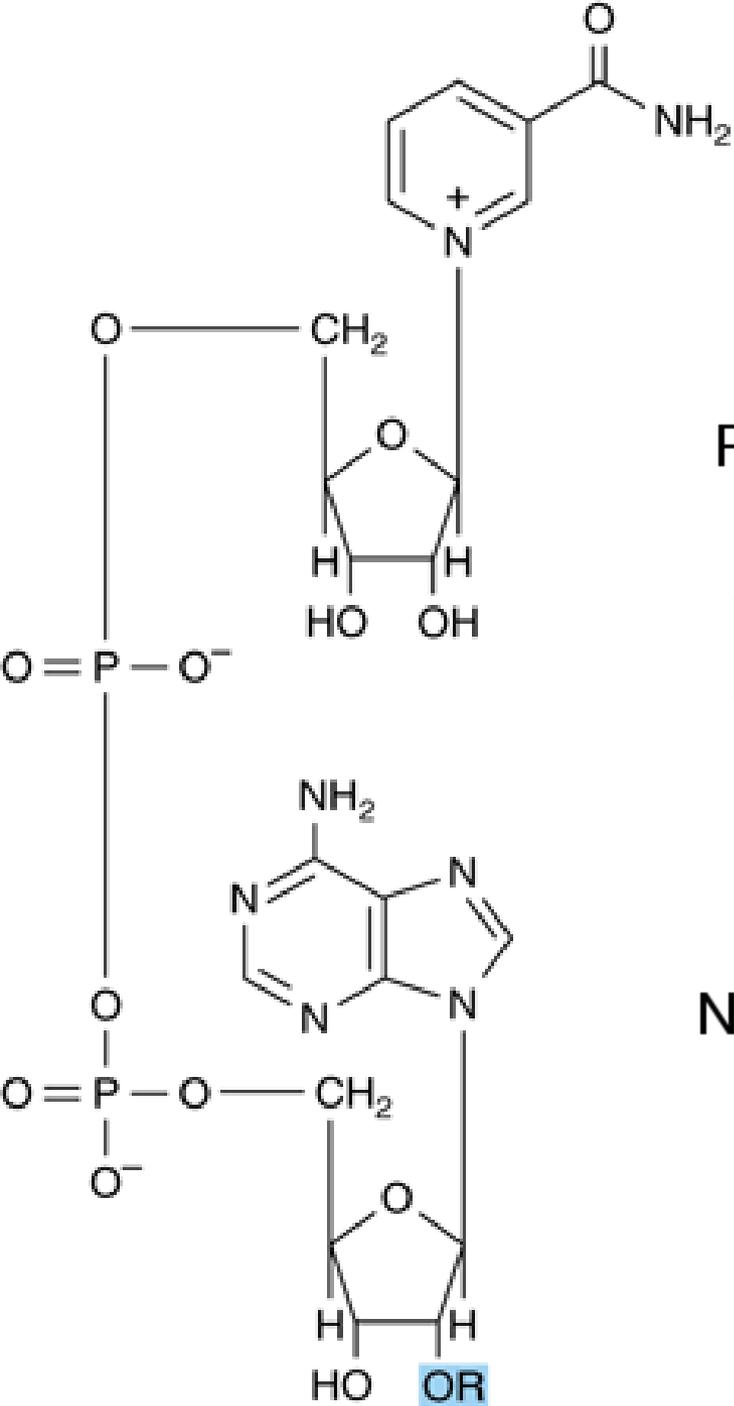
пантотеновая кислота (**B₅**) - кофермент А (CoA);

тиамин (**B₁**) - ТПФ – кофермент декарбоксилирования ПК,

α-кетокислот;

фолиевая кислота (**B₉**) и кобаламин (**B₁₂**) - коферменты
одноуглеродного обмена.

- **нуклеотиды;**
- **убихинон** или **кофермент Q;**
- **фосфоаденозинфосфосульфат (ФАФС);**
- **глутатион (GSH)**, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях.



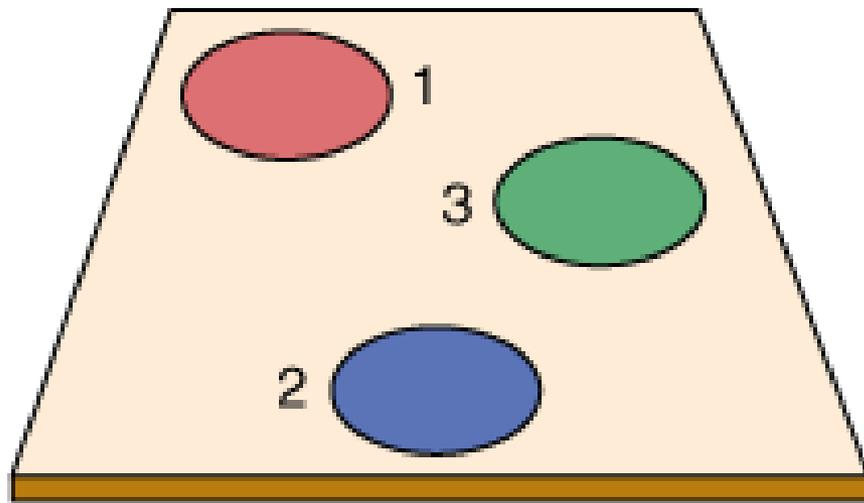
НАД

Гипотезы взаимодействия фермента с субстратом

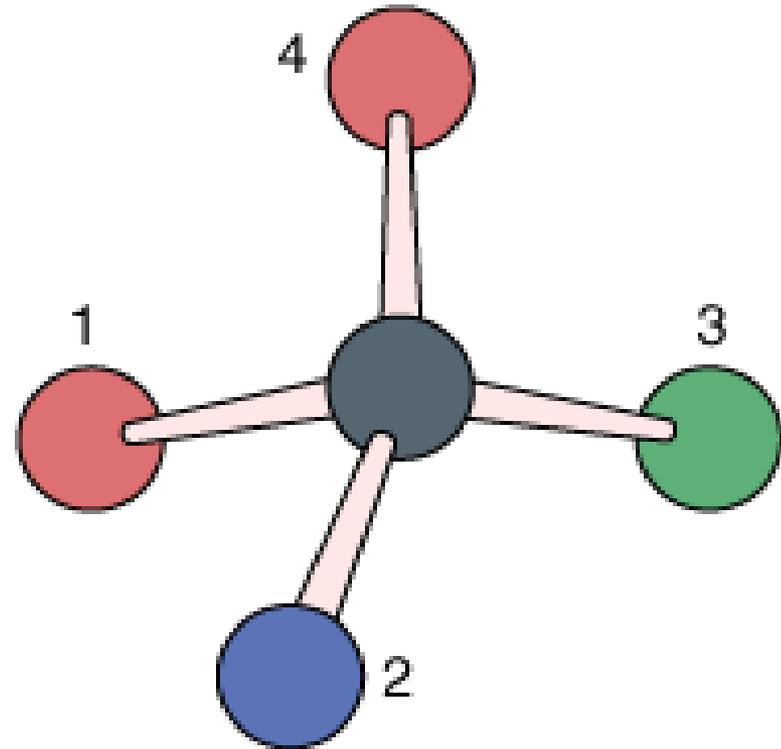
I. Теория Фишера – «ключ - замок»

- Строгое соответствие конформации субстрата и активного центра фермента.





Enzyme site

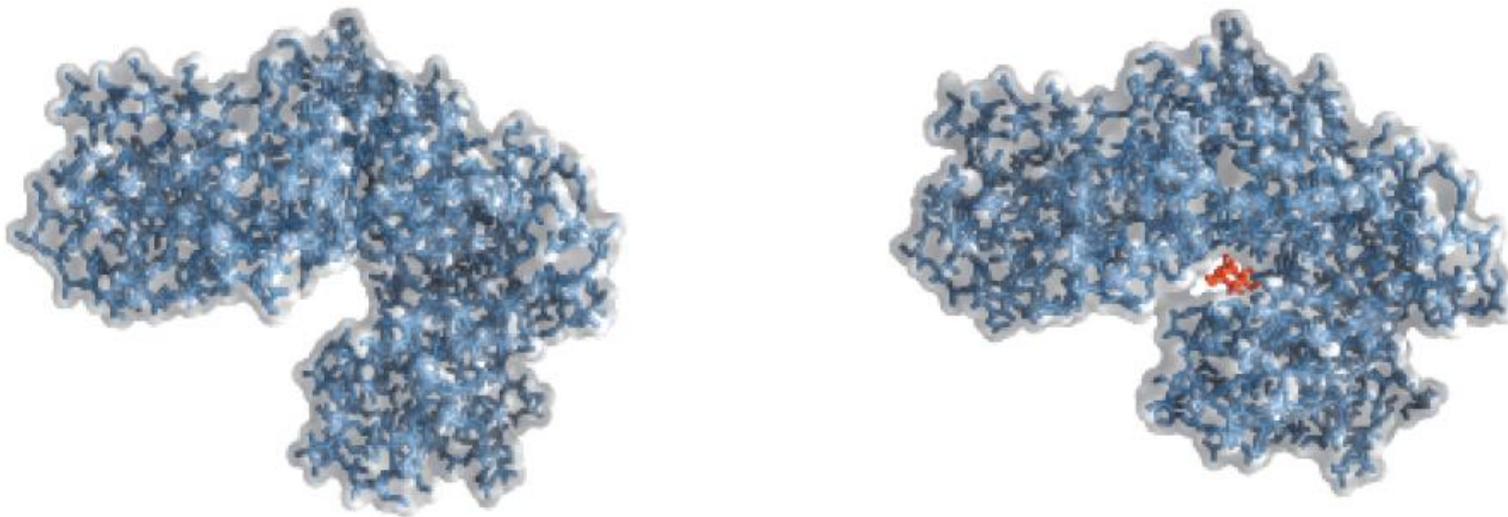


Substrate

Source: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA: *Harper's Illustrated Biochemistry, 29th Edition*: www.accessmedicine.com

- **II. Теория Кошленда** – «рука - перчатка»

Активный центр фермента может подстраиваться под форму субстрата.

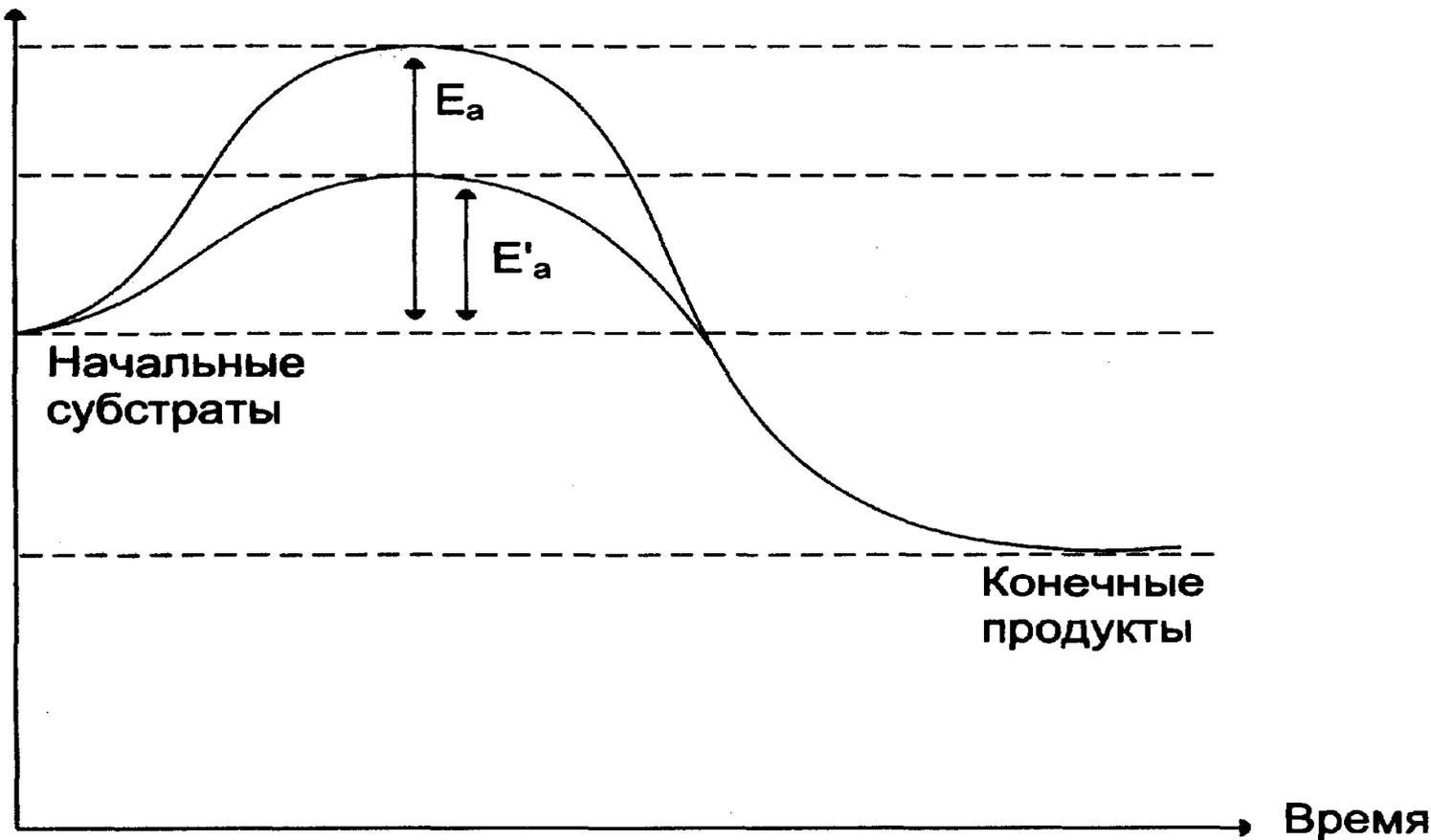


Механизм действия ферментов

Снижают **энергию активации** молекул субстрата.

Энергия активации – энергия, необходимая для перевода молекул 1 моля субстрата в активированное состояние.

Свободная энергия



E_a - энергия активации некатализируемой реакции

E'_a - энергия активации катализируемой ферментами реакции

Специфичность действия ферментов

- абсолютная (уреаза);
- относительная (липаза) ;
- относительная групповая (трипсин);
- стереохимическая (фумараза)- продукт только L-малат.

Классификация ферментов

1. **О**ксидоредуктазы;
2. **Т**рансферазы;
3. **Г**идролазы;
4. **Л**иазы;
5. **И**зомеразы;
6. **Л**игазы (**с**интетазы).

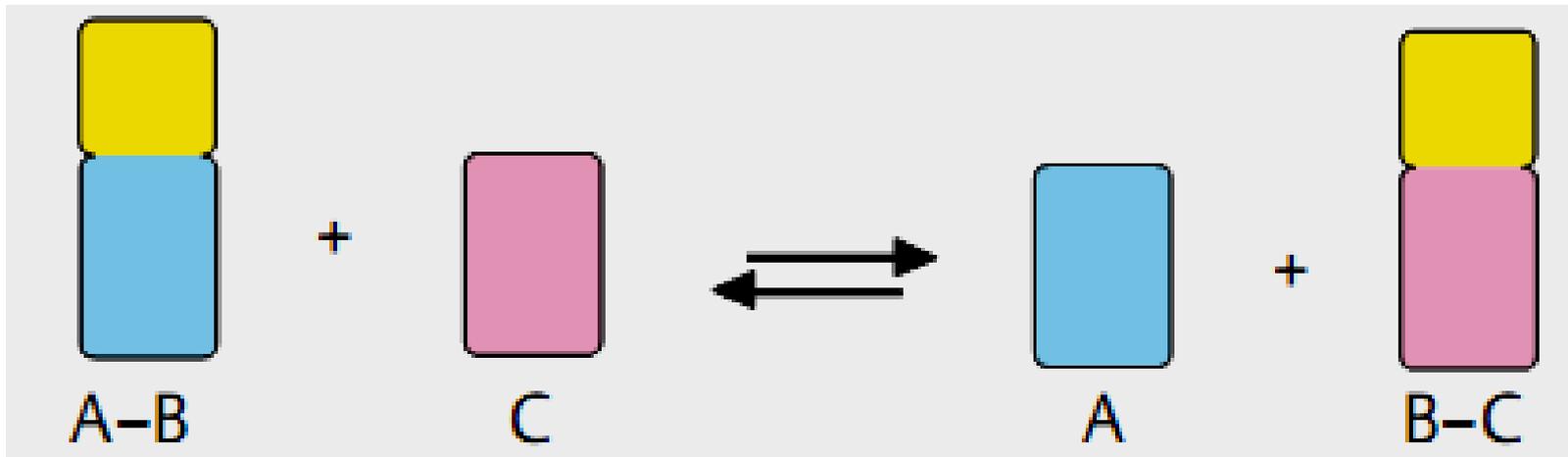
Класс 1. Оксидоредуктазы – катализируют окислительно-восстановительные реакции.



Важнейшие подклассы:

- *дегидрогеназы*
- *оксидазы*
- *редуктазы*
- *оксигеназы (гидроксилазы)*

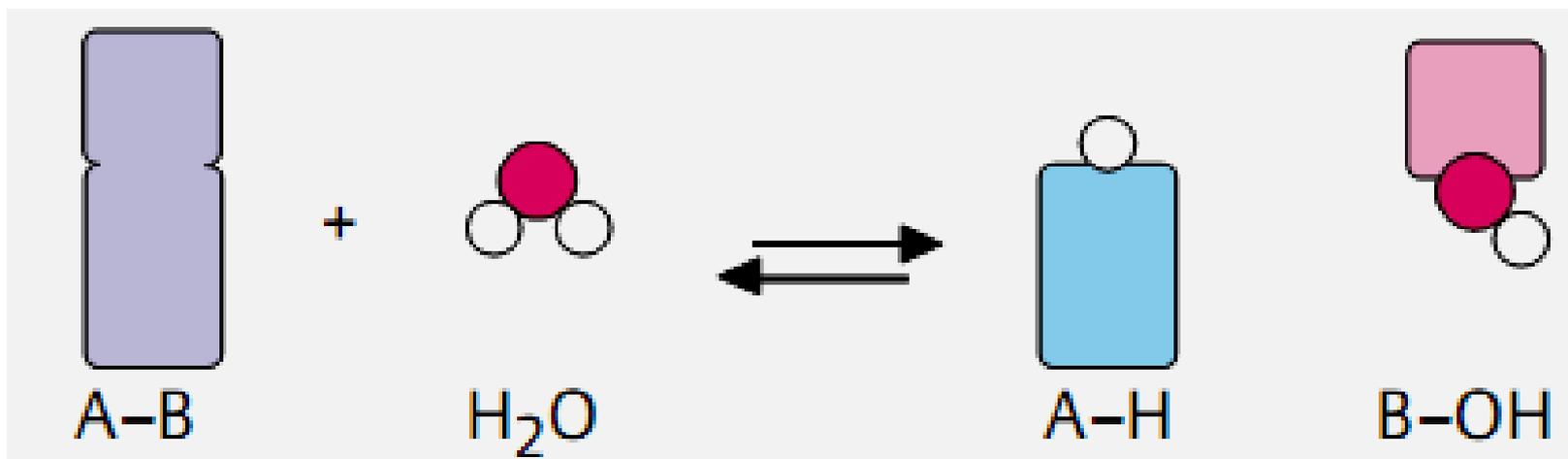
Класс 2. Трансферазы – катализируют реакции межмолекулярного переноса различных атомов и групп атомов.



Важнейшие
подклассы:

- *фосфотрансферазы (киназы)*
- *аминотрансферазы*
- *ацилтрансферазы*
- *гликозилтрансферазы*
- *метилтрансферазы*

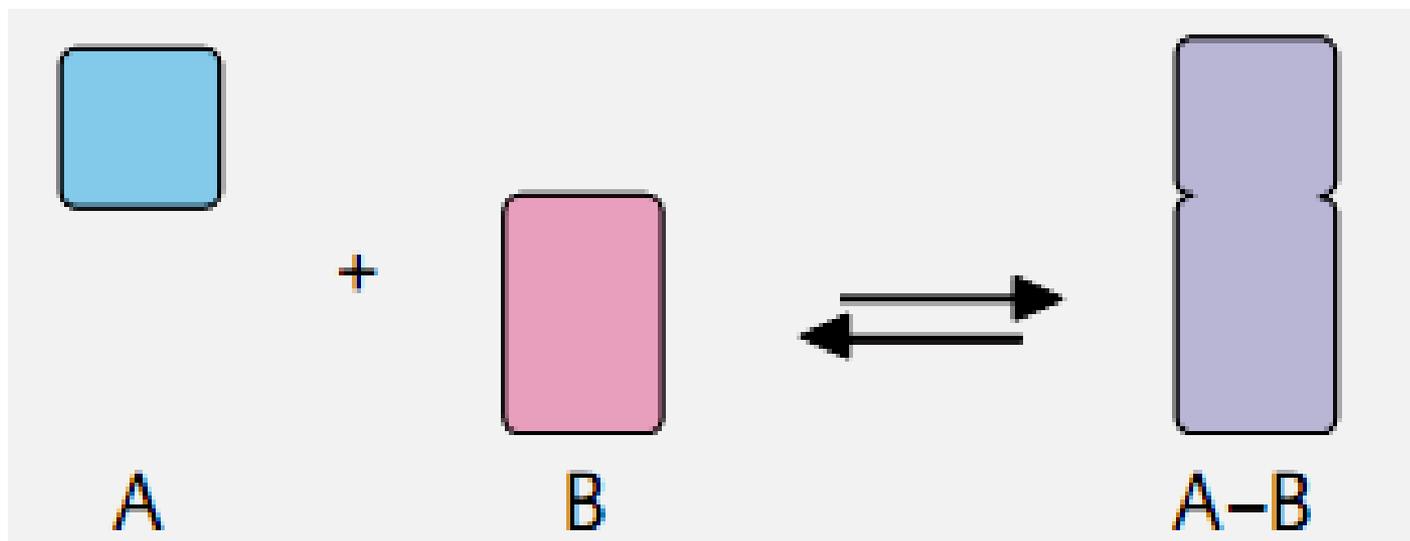
Класс 3. Гидролазы – катализируют расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекул воды (перенос групп на молекулу воды).



Важнейшие подклассы:

- *пептидазы*
- *эстеразы*
- *фосфатазы*
- *амидазы*
- *гликозидазы*

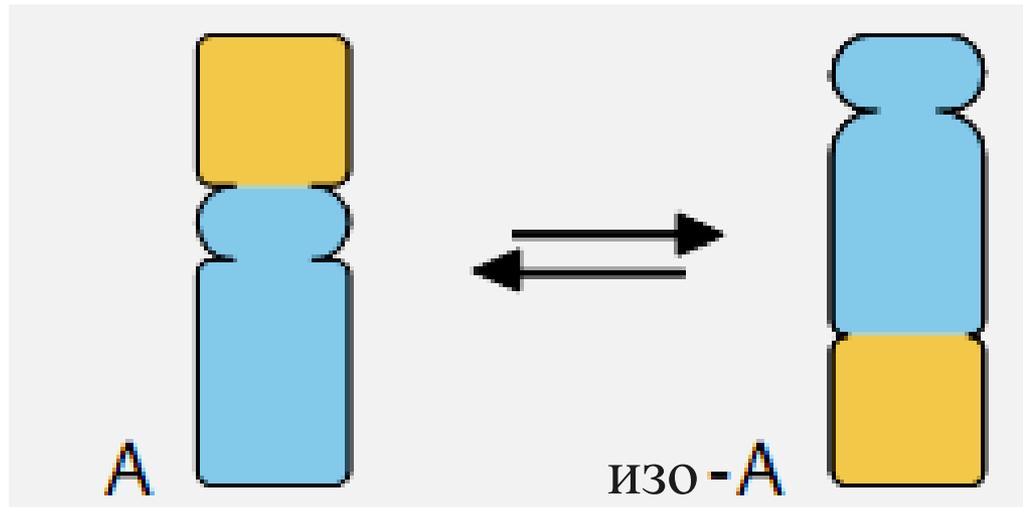
Класс 4. *Лиазы* – катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи.



Важнейшие
подклассы:

- *C–C- лиазы*
- *C–O- лиазы*
- *C–N- лиазы*
- *C–S- лиазы*

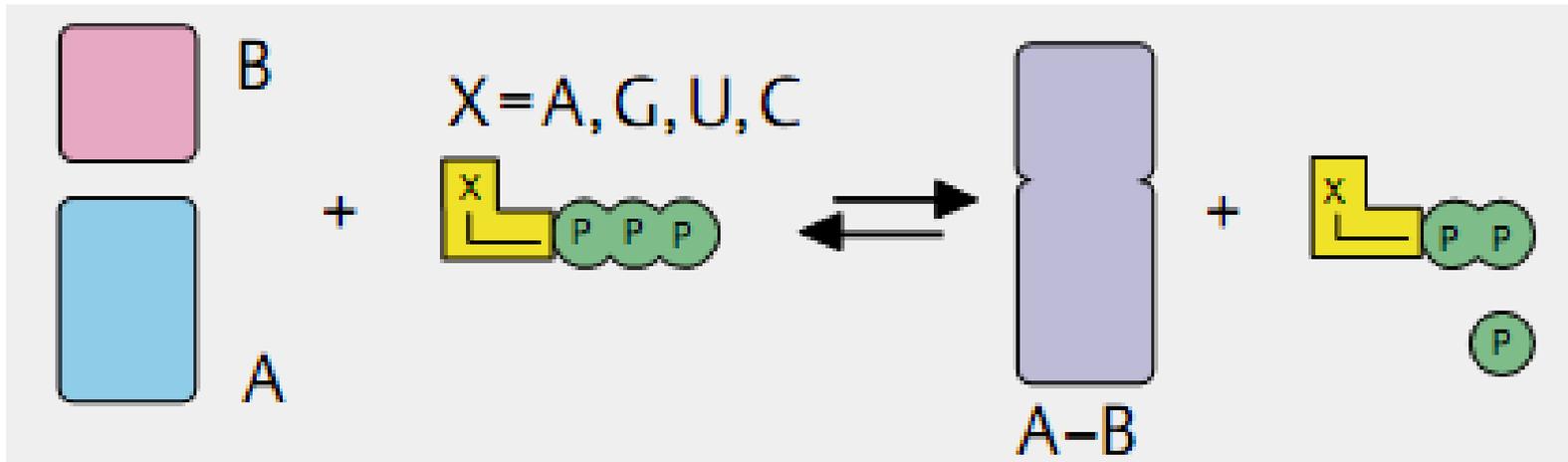
Класс 5. *Изомеразы* – перемещают группы в пределах молекулы без изменения общей формулы субстрата.



Важнейшие
подклассы:

- *эпимеразы*
- *цис-транс-изомеразы*
- *внутримолекулярные оксидо-редуктазы*
- *мутазы*

Класс 6. Лигазы (синтетазы) – катализируют энергозависимые реакции присоединения, сопряженные с гидролизом нуклеозидтрифосфата (чаще всего АТФ).



Важнейшие
подклассы:

- *C–O- лигазы*
- *C–S- лигазы*
- *C–N- лигазы*
- *C–C- лигазы*

Номенклатура ферментов

- Рабочее название.
- Систематическое название.
- Шифр фермента:
 - 1-ая цифра – класс фермента;
 - 2-ая – подкласс;
 - 3-я – под-подкласс;
 - 4-я – порядковый номер фермента в своем под-подклассе.

Гексокиназа

АТФ : D-гексоза 6 фосфотрансфераза

Гексоза 6 – фосфорилирование происходит по 6-му углеродному атому гексоз.

ЕС (КФ) 2.7.1.1.

Класс 2 – трансферазы

Подкласс 7 - перенос фосфатной группы

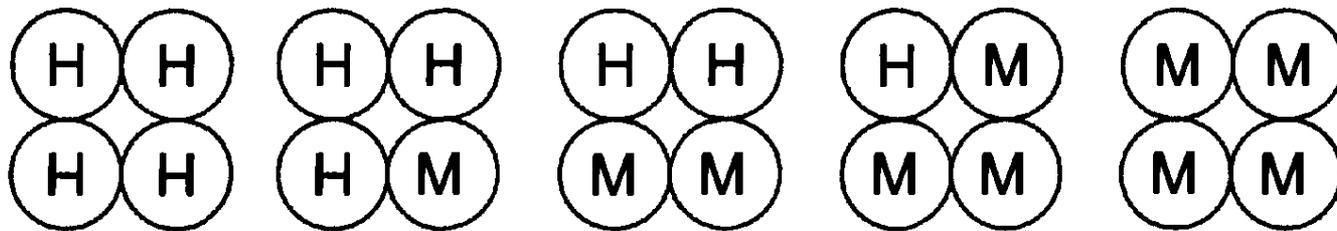
Под-подкласс 1 - акцептор фосфата спиртовая группа

ИЗОФЕРМЕНТЫ

Это множественные формы фермента,
с разной 1-ой структурой,
которые катализируют одну и ту же реакцию.

Могут отличаться:

- по структуре (первичной)
- по кинетическим параметрам;
- по физико-химическим свойствам.



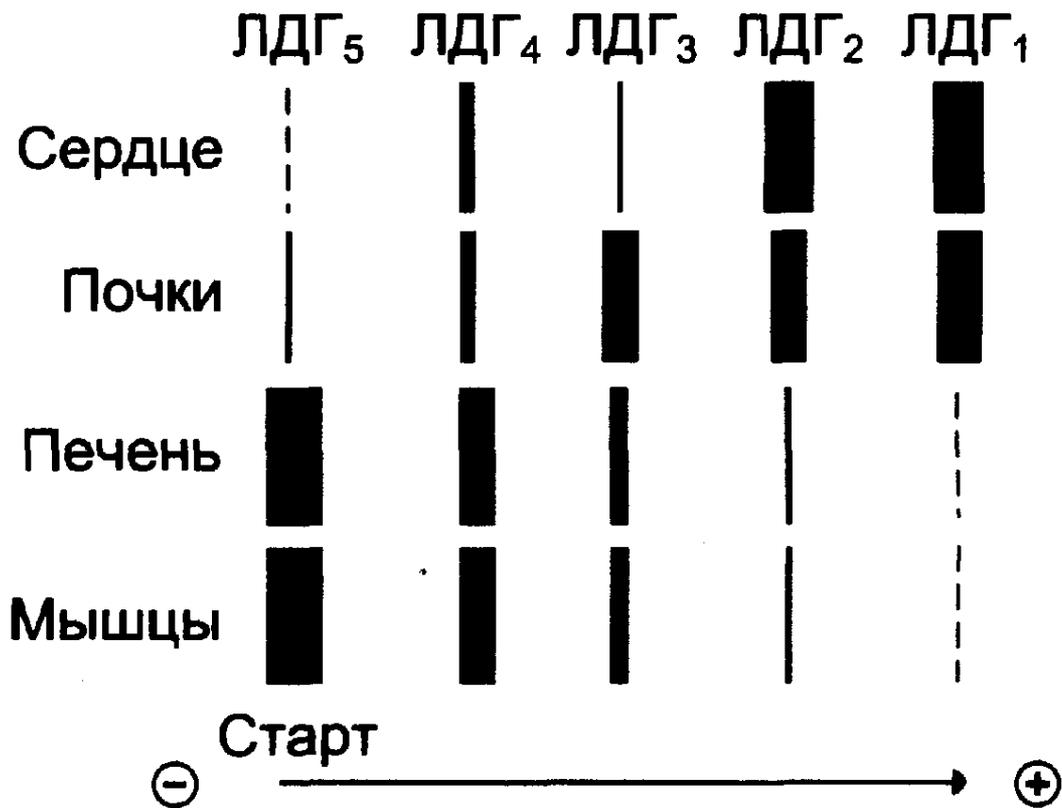
ЛДГ₁

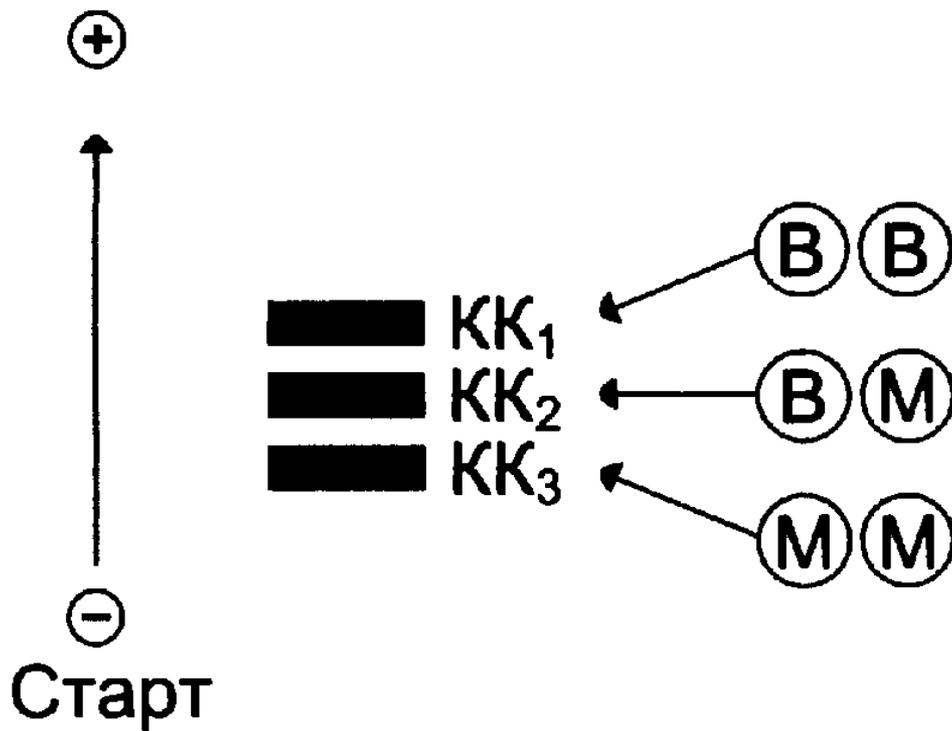
ЛДГ₂

ЛДГ₃

ЛДГ₄

ЛДГ₅





Креатинкиназа

Глюкоза



Глюкозо-6-фосфат

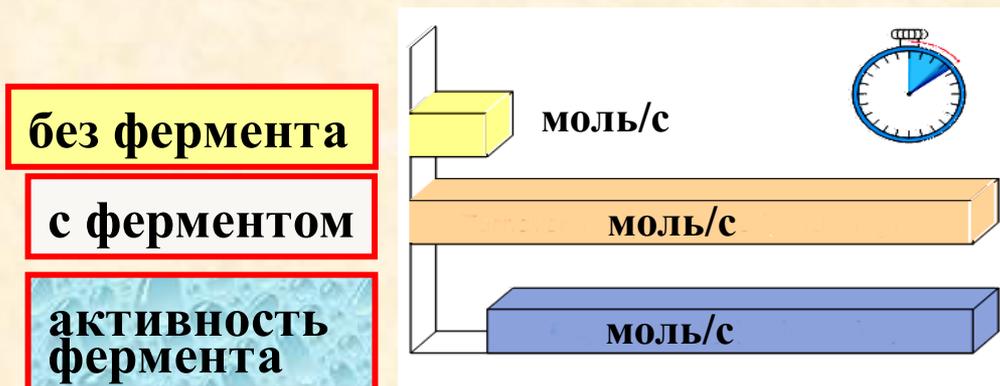
гексокиназа
глюкокиназа

Определение активности изоферментов в сыворотке крови используют для **дифференциальной диагностики** патологий органов и тканей

Определение активности ферментов и единицы ее измерения

Каталитическое действие фермента – активность – это изменение количества субстрата под влиянием фермента в единицу времени.

Ее определяют в стандартных условиях (давление – **1 атм.**, температура – **25°C**, оптимум pH)



Единицы измерения активности ферментов

❖ Кatal - (моль/сек)

$$n \text{ катал} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (моль)}}{\text{Время (с)}}$$

❖ IU – международная единица (мкмоль / мин)

❖ Удельная активность

$$\text{Уд. ак.} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)} \times \text{количество белка (мг)}}$$

Единицы активности фермента:

- 1 катал (кат) – количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение субстрата со скоростью 1 моль за 1 с.

$$1 \text{ кат} = 1 \cdot 10^7 \text{ Е.}$$

- 1 международная единица (IU/МЕ) – количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение субстрата со скоростью 1 мкмоль за 1 мин (60 сек).

$$1 \text{ Е} = 16,67 \text{ нкат.}$$

Спасибо за внимание

Спасибо за внимание