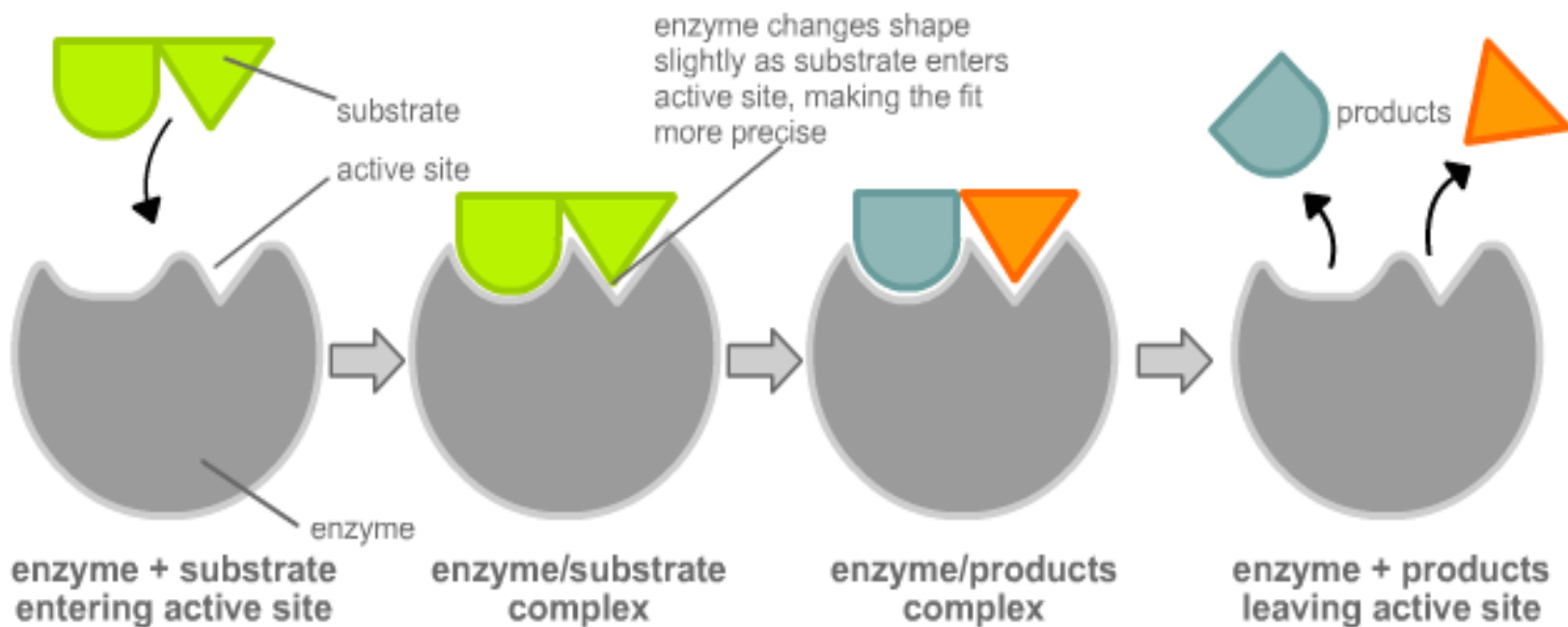


Лекция «СТРОЕНИЕ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ»

Автор: доцент Маглыш

Сабина Степановна



ВОПРОСЫ ЛЕКЦИИ

- 1. Химическая природа и свойства ферментов.**
- 2. Активный и аллостерический центры фермента. Специфичность действия ферментов.**
- 3. Кофакторы ферментов и коферменты. Коферментные функции витаминов.**
- 4. Механизм действия ферментов. Характеристика ферментативной реакции.**
- 5. Представление об изоферментах. Органоспецифичность ферментов.**
- 6. Классификация и номенклатура ферментов.**
- 7. Определение активности ферментов и единицы ее измерения (УСРС).**

1. Химическая природа и свойства ферментов

Ферменты (E) – биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие биохимические реакции.

Фермент = Энзим

от лат. *fermentum* – закваска от греч. *enzyme* – дрожжи

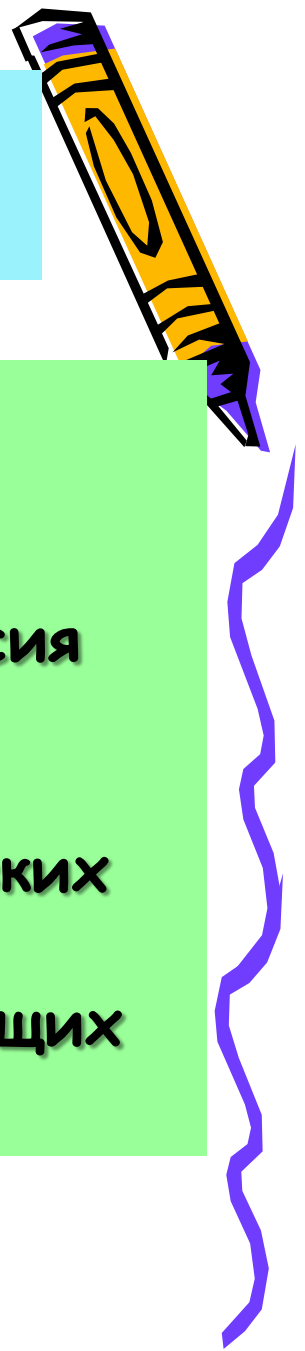
Субстрат (S) – вещество, на которое действует фермент (химическое превращение которого ускоряется ферментом).

Продукт (P) – вещество, которое образуется в результате реакции под действием фермента.



Особенности ферментов, общие с химическими катализаторами:

1. Ускоряют только термодинамически (энергетически) возможные реакции.
2. Не изменяют направление реакции.
3. Не изменяют величину константы равновесия обратимой реакции.
4. Не расходуются в процессе реакции.
5. Оказывают эффективное действие при низких концентрациях.
6. Их действие подчиняется закону действующих масс.



Отличительные особенности ферментов:

1. Высокая специфичность (избирательность) действия.

Способность фермента ускорять лишь определенную реакцию с участием определенного субстрата.

2. Высокая каталитическая активность.

Молекула каталазы расщепляет $\sim 10^7$ молекул H_2O_2 за 1с.

3. «Мягкие» условия катализа.

Нормальное давление (1 атм.) – чувствительность к давлению.

Умеренная температура ($\sim 37^\circ C$) – высокая термолабильность.

Умеренные значения pH ($\sim 7-8$) – зависимость от pH среды.

В экстремальных условиях ферменты теряют каталитическую активность (происходит их инактивация).

4. Скорость ферментативных реакций подчиняется кинетическим законам.

Скорость реакции описывается графиком и уравнением Михаэлиса-Ментен.

5. На активность фермента оказывают действие регуляторы.

Активаторы ускоряют действие фермента, а ингибиторы подавляют его активность.

6. Размеры молекул фермента намного превышают размеры молекул субстрата.

7. Для ферментов характерна постсинтетическая модификация.

После синтеза фермента его молекула претерпевает ряд изменений, прежде чем приобретет активность.

Химическая природа ферментов



- **1.** При действии денатурирующих факторов ферменты теряют активность, то есть как и белки они подвержены денатурации.
- **2.** При гидролизе ферменты, как и белки, распадаются на аминокислоты.
- **3.** Наблюдается прямая зависимость активности ферментов от концентрации белка.
- **4.** В чистом виде ферменты, как и белки, способны к кристаллизации.
- **5.** Ферменты, как и белки, обладают амфотерностью.
- **6.** Ферменты, как и белки, обладают электрофоретической подвижностью, неподвижны в изоэлектрической точке.
- **7.** Ферменты, как и белки, не способны к диализу через полупроницаемую мембрану.
- **8.** Ферменты, как и белки, имеют большую молекулярную массу.
- **9.** Ферменты, как и белки, способны к высаливанию без потери каталитических свойств.
- **10.** Искусственно синтезированная из аминокислот рибонуклеаза поджелудочной железы не отличалась от природного фермента (**главное доказательство белковой природы ферментов**).

2. Активный и аллостерический центры фермента. Специфичность действия ферментов

Активный центр – место в молекуле фермента, в котором связывается и превращается субстрат.

У **простых** ферментов формируется из ~ 12-16 аминокислотных остатков полипептидной цепи.

У **сложных** ферментов – аминокислотные остатки полипептидной цепи + небелковый компонент.

В активном центре различают:

1. Связывающий (контактный) участок активного центра – обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом.

2. Каталитический участок активного центра – обеспечивает превращение субстрата после его связывания.



Аллостерический (регуляторный) центр - участок молекулы фермента, с которым связываются регуляторные вещества (аллостерические эффекторы), которые отличаются по строению от субстратов.

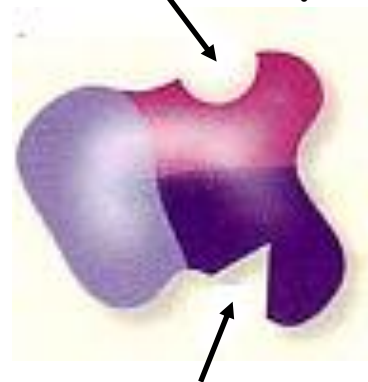


Положительные эффекторы (активаторы)
- облегчают функцию активного центра.

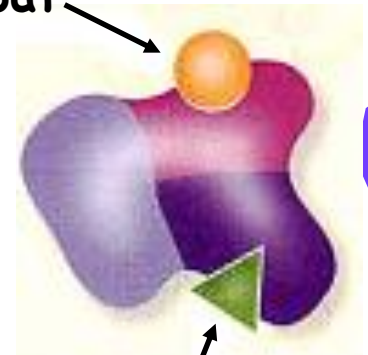
(от греч. *allos* - чужой, иной, *steros* - попространственный, структурный)

Отрицательные эффекторы (ингибиторы)
- затрудняют функцию активного центра.

активный центр



субстрат



аллостерический центр

аллостерический эффектор



Специфичность действия ферментов

Активный центр фермента

Связывающий участок

↓
Обеспечивает **субстратную специфичность**
(выбор субстрата)

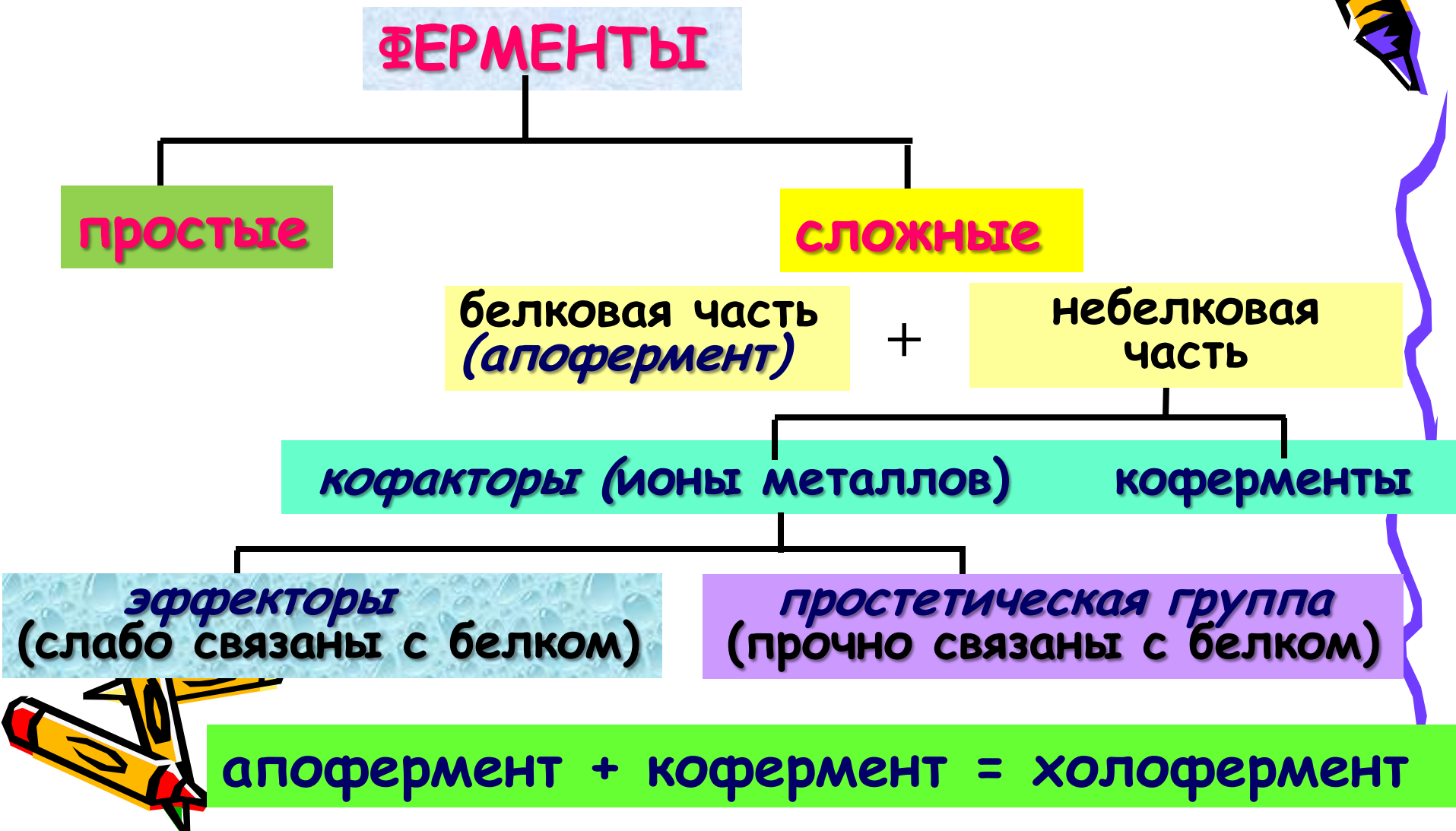
- 1. Абсолютная субстратная специфичность.
- 2. Относительная субстратная специфичность.
- 3. Групповая субстратная специфичность.
- 4. Стереоспецифичность.

Каталитический участок

↓
Обеспечивает **каталитическую (реакционную) специфичность**
(выбор пути превращения)

↓
Специфичность пути превращения

3. Кофакторы ферментов и коферменты. Коферментные функции витаминов



Кофакторы - ионы металлов



- 1. Стабилизаторы молекулы субстрата (Mg^{2+} - АТФ). Образуется комплекс S-Me.
- 2. Стабилизаторы активного центра фермента. Образуется комплекс E-Me.
- 3. Стабилизаторы структуры фермента. Для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы нужен Zn^{2+} .
- 4. Стабилизаторы переходного состояния E-Me-S.
- 5. Ионы металлов с переменной валентностью могут участвовать в переносе электронов (выполняют роль кофермента).



Коферменты – вспомогательные низкомолекулярные органические соединения, которые участвуют в реакции и выполняют функцию промежуточных переносчиков атомов или функциональных групп в ферментативных реакциях.

коферменты

*косубстраты
(растворимые коферменты)*

*простетические
группы*

присоединяются во время реакции к ферменту, а затем диссоциируют

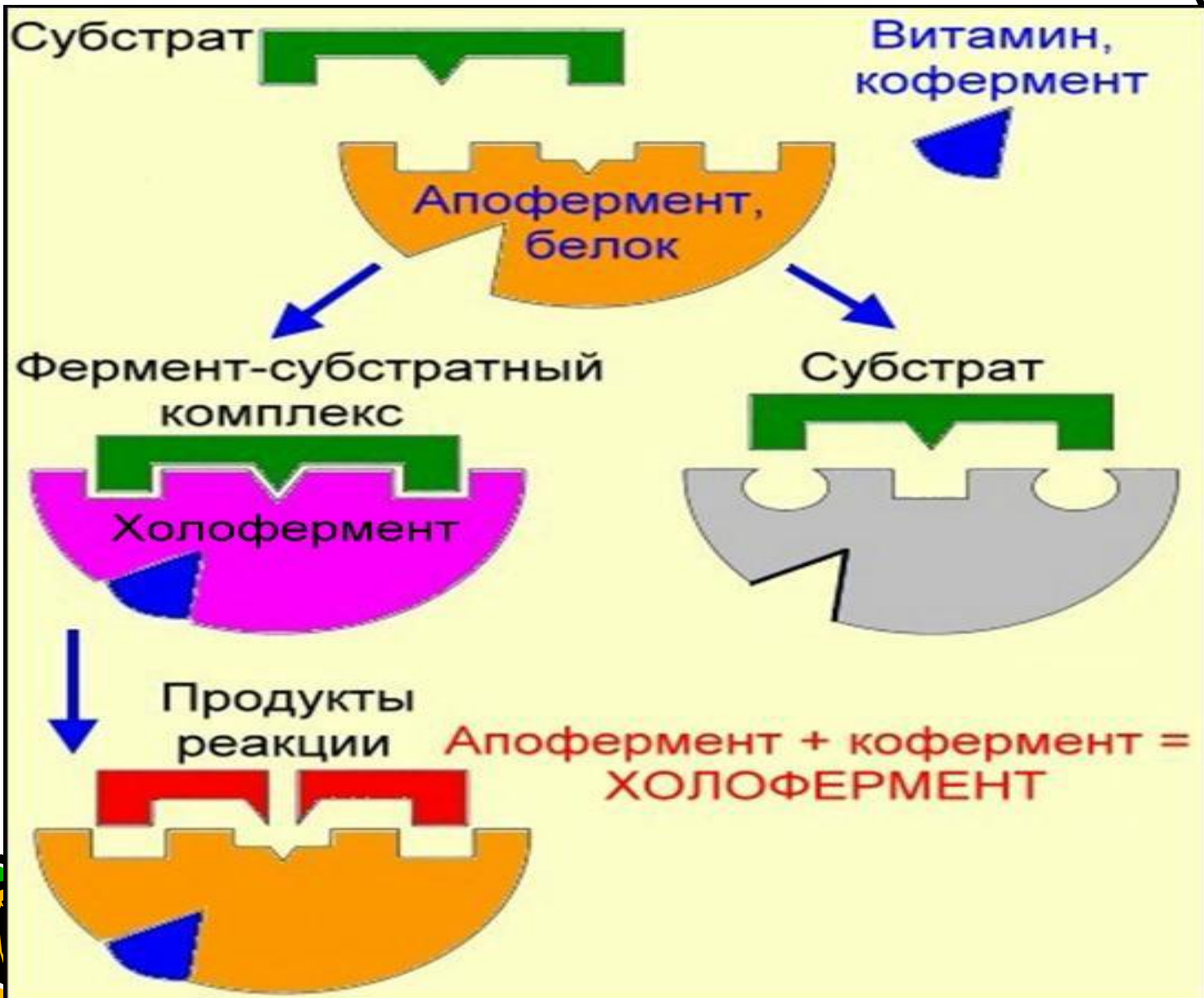
прочно связаны с ферментом и во время реакции не диссоциируют



Коферментами могут быть:

- производные витаминов;
- гемы в составе цитохромов, каталазы, пероксидазы;
- доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты;
- кофермент Q (убихинон);
- фосфоаденозилфосфосульфат (ФАФС);
- глутатион.





Коферментные функции витаминов



ВИТАМИН	Коферментная форма	ФЕРМЕНТ
B_1 - тиамин	Тиаминдифосфат (ТДФ, ТПФ)	Транскетолаза, пируватдегидрогеназа
B_2 -рибофлавин	ФМН, ФАД	Сукцинатдегидрогеназа
B_3 - пантотеновая кислота	Кофермент А (КоА)	Реакции ацилирования
B_6 - пиридоксин	Пиридоксальфосфат	Аминотрансферазы
РР - никотинамид	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	НАД ⁺ (НАДФ ⁺)-зависимые дегидрогеназы
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая к-та (ТГФК)	Перенос одноуглеродных групп

4. Механизм действия ферментов. Характеристика ферментативной реакции

Общая теория ферментативного катализа

(Л. Михаэлис, М. Ментен, 1913 г.)

В процессе ферментативного катализа образуется фермент-субстратный комплекс



фермент-субстратный комплекс



Леонор Михаэлис
(1875-1949)



Мод Ментен
(1879-1960)

Современное представление:



переходное состояние

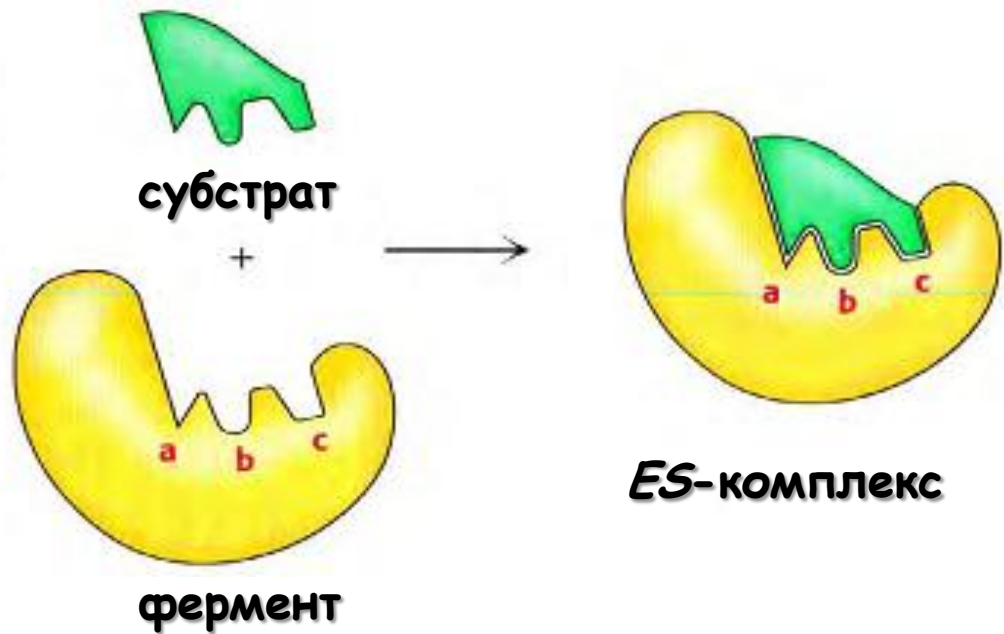
переходное состояние



ES-комплекс образуется благодаря *стерическому* сходству структуры активного центра фермента молекулярной структуре субстрата.

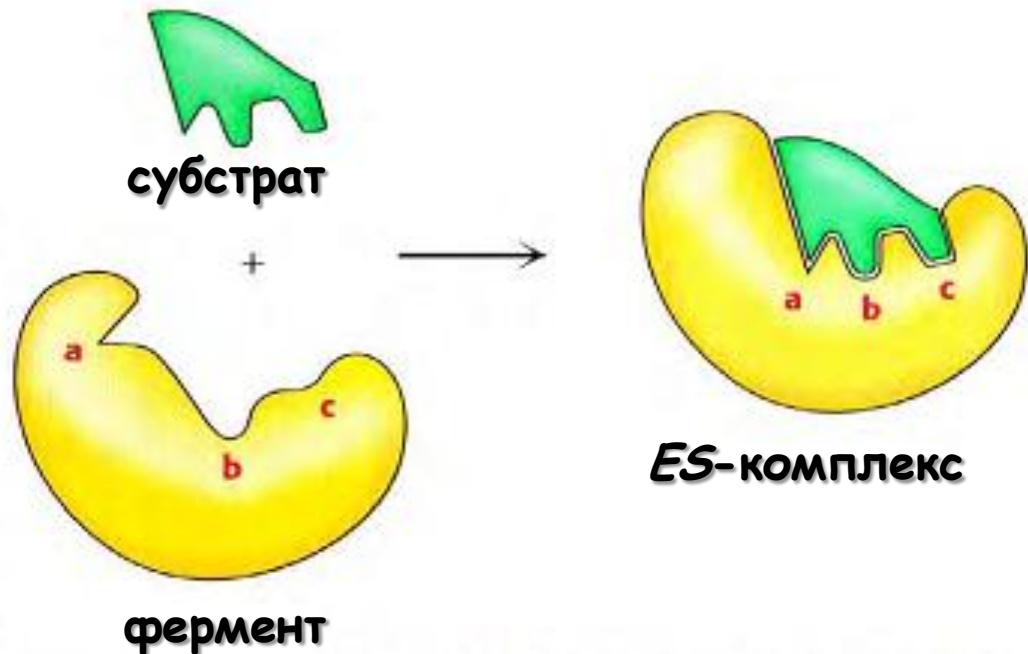
Теория «**КЛЮЧ-ЗАМОК**» (Э. Фишер, 1894 г.)

Фермент – *жесткая матрица*, комплементарная структуре субстрата.

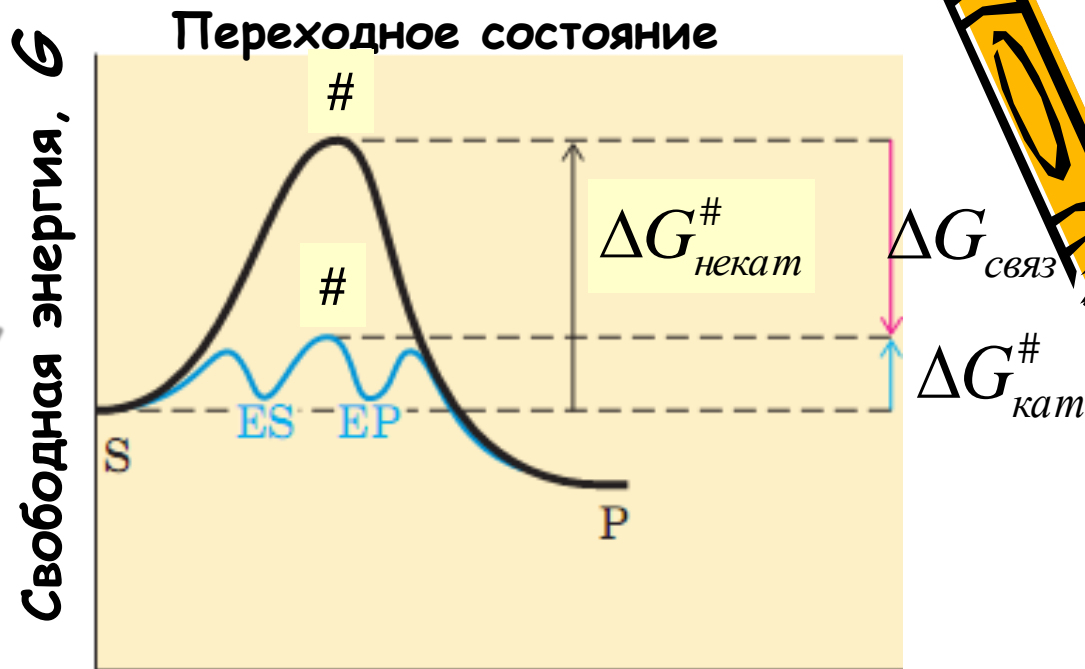


Теория «ИНДУЦИРОВАННОГО СООТВЕТСТВИЯ» (Д. Кошланд, 1958 г.)

При взаимодействии с субстратом *изменяется* конформация фермента и его активного центра так, что обеспечивается точная ориентация каталитических групп, необходимая для связывания субстрата и протекания реакции.



Ферменты ускоряют химические реакции, снижая энергию активации.



Фермент снижает энергию активации благодаря свободной энергии, высвобождающейся при образовании ES -комплекса (энергия связывания, $\Delta G_{\text{связ}}$).



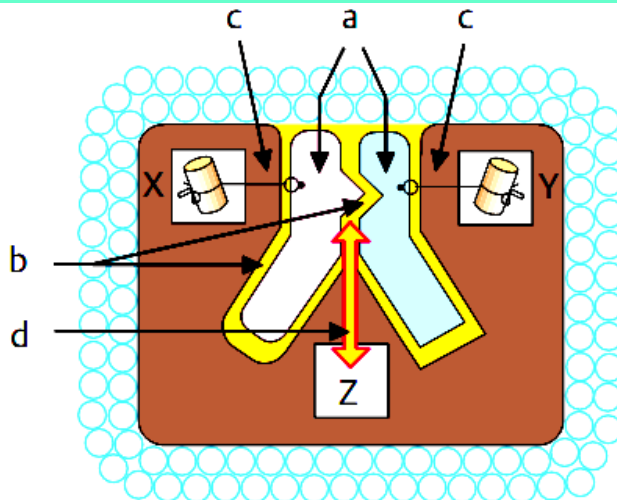
$\Delta G_{\text{связ}}$ максимальна в переходном состоянии, т.е. активный центр фермента комплементарен переходному состоянию субстрата.

В образовании ES-комплекса участвуют **множественные слабые (нековалентные) взаимодействия**:

- водородные связи
- ионные связи
- гидрофобные взаимодействия

Факторы (каталитические эффекты) ускорения

- a. Сближение и деформация субстрата.
- b. Исключение воды.
- c. Стабилизация переходного состояния.
- d. Перенос группы (кислотно-основный и ковалентный катализ).



5. Представление об изоферментах. Органоспецифичность ферментов

Изоферменты - группа ферментов, которые катализируют одну и ту же реакцию, но имеют различия по первичной структуре: 1) по молекулярной массе, 2) по суммарному заряду, 3) по тканевой локализации, 4) по субклеточной локализации, 5) по максимальной скорости, 6) по K_m , 7) по чувствительности к активаторам и ингибиторам.

Это разные молекулярные формы одного и того же фермента, возникшие вследствие отличий на генетическом уровне, а не в результате постсинтетической модификации.

Органоспецифические ферменты и изоферменты

Фермент	Орган
ЛДГ ₁ , ЛДГ ₂	Миокард
ЛДГ ₃	Легкие
ЛДГ ₄ , ЛДГ ₅	Печень, мышцы
Амилаза	Поджелудочная железа
Липаза	Поджелудочная железа
АлАТ	Печень
АсАТ	Миокард
Кислая фосфатаза	Предстательная железа
Щелочная фосфатаза	Кости

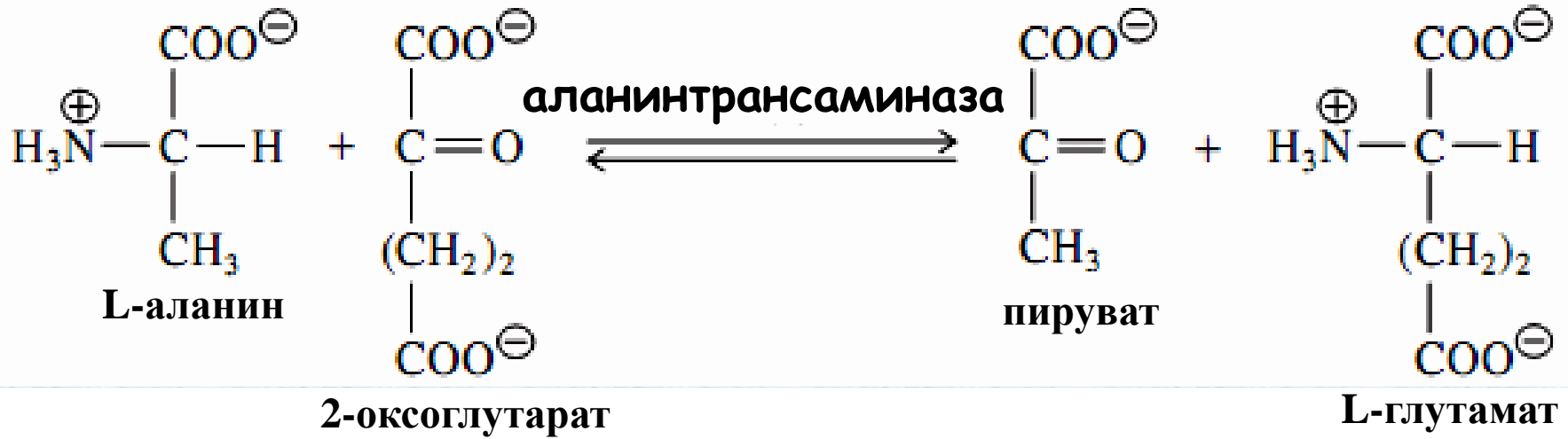
6. Классификация и номенклатура ферментов

Номенклатура ферментов:

1. тривиальная (по случайным признакам):
пепсин - от греч. *pepsis* - пищеварение;

2. рациональная (по названию субстрата + -
аза): уреаза - от греч. *urea* - мочевина;

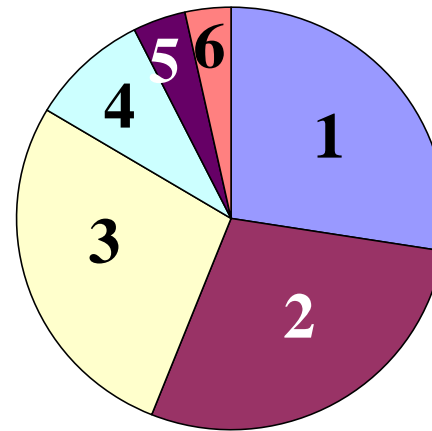
3. систематическая номенклатура (1961 г):
(названия субстратов + тип катализируемой
реакции + -аза):
L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза
(систематическое полное название фермента);
аланинтрансаминаза (краткое название).



L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза

Классификация: основана на *реакционной* и *субстратной* специфичности

- | | |
|---|-------------------------|
| 1 | оксидоредуктазы (1152) |
| 2 | трансферазы (1198) |
| 3 | гидролазы (1155) |
| 4 | лиазы (377) |
| 5 | изомеразы (167) |
| 6 | лигазы(синтетазы) (145) |

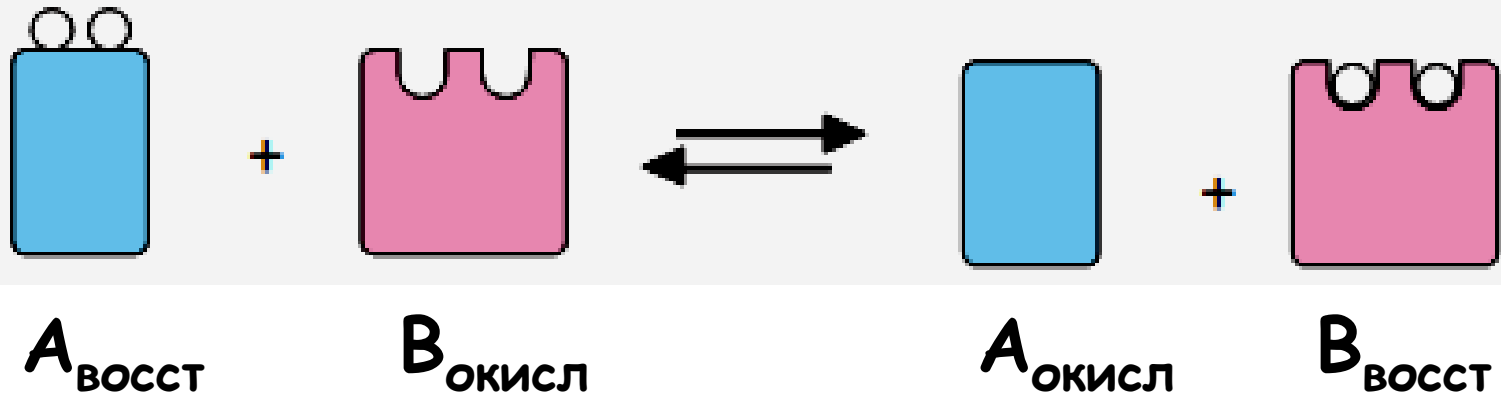


распределение ферментов по классам

Класс 1. Оксидоредуктазы – катализируют окислительно-восстановительные реакции.



○ = восстановительный эквивалент

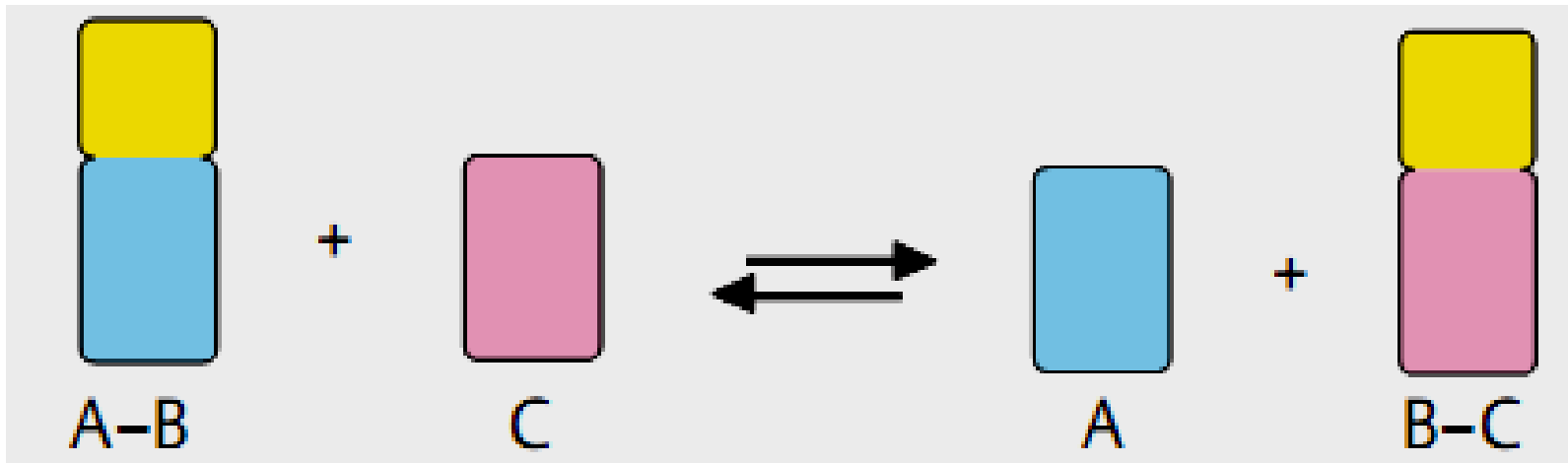


Важнейшие подклассы:

- дегидрогеназы
- оксидазы
- редуктазы
- оксигеназы (гидроксилазы)



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

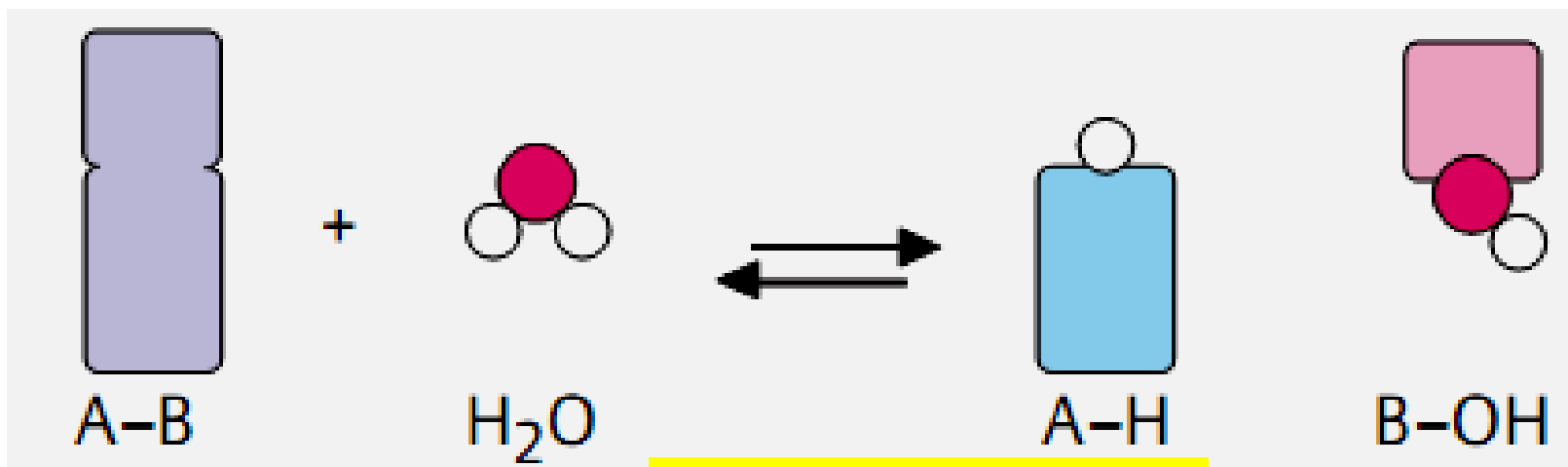


Важнейшие подклассы:

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



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

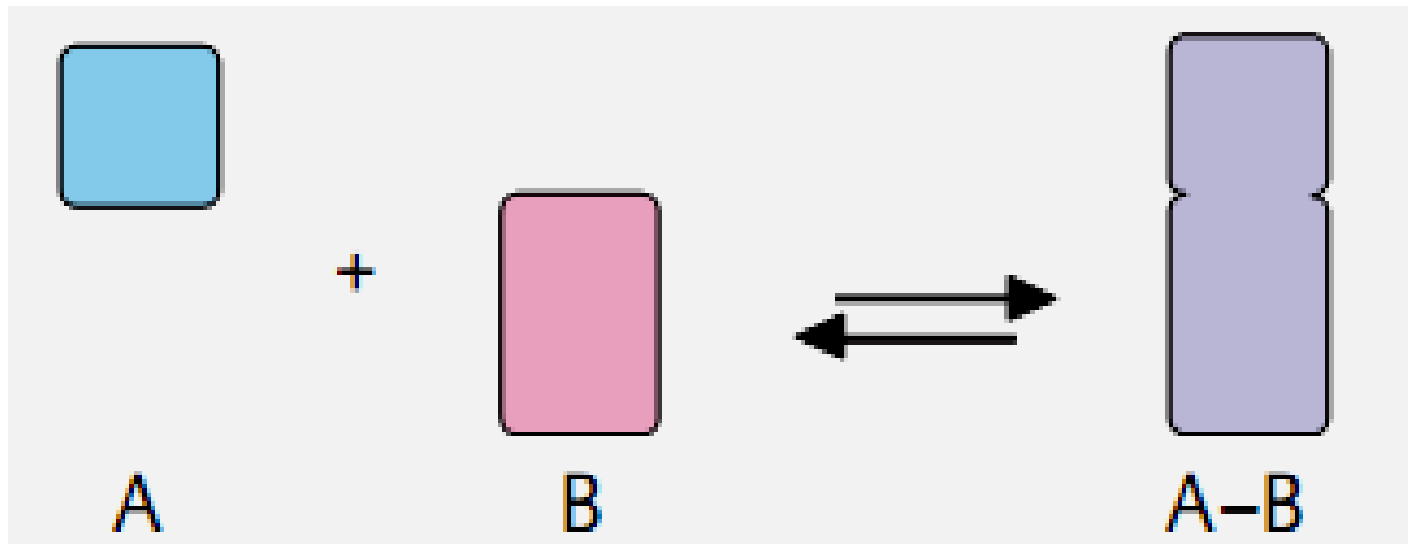


Важнейшие
подклассы:

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



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

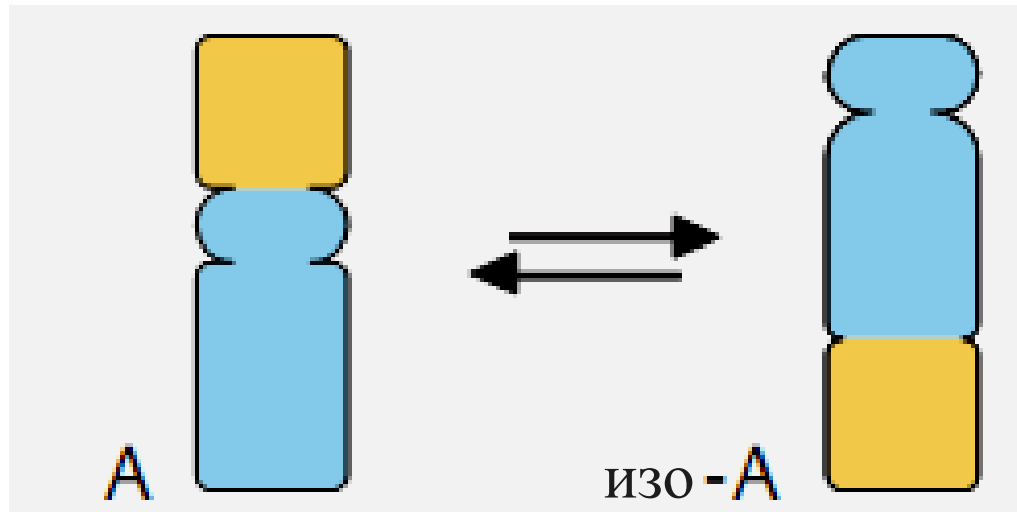


Важнейшие
подклассы:

- *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.

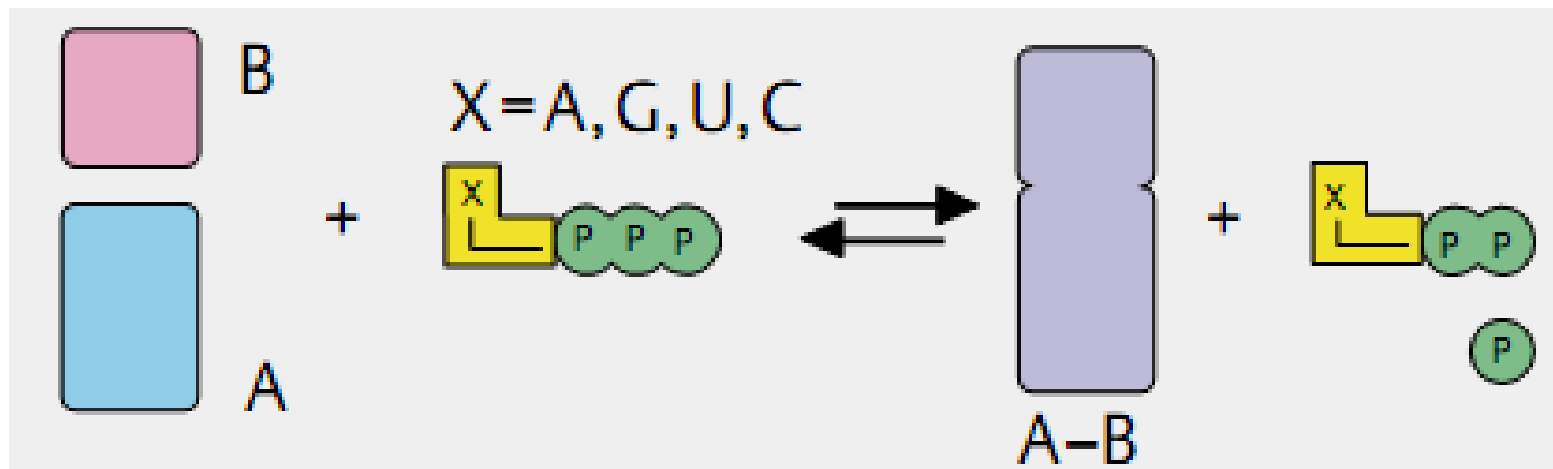


Важнейшие подклассы:

- *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*



В Списке ферментов IUBMB каждому ферменту присвоен свой **классификационный номер (КФ)** из четырех цифр.

L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза

КФ 2.6.1.2

класс

подкласс

подподкласс

номер в подподклассе

2 - класс - трансферазы

2.6 - подкласс - переносят азотсодержащие группы

2.6.1 - подподкласс - аминотрансферазы

Класс указывает на каталитическую специфичность, подкласс и подподкласс - на субстратную специфичность.

7. Определение активности ферментов и единицы ее измерения

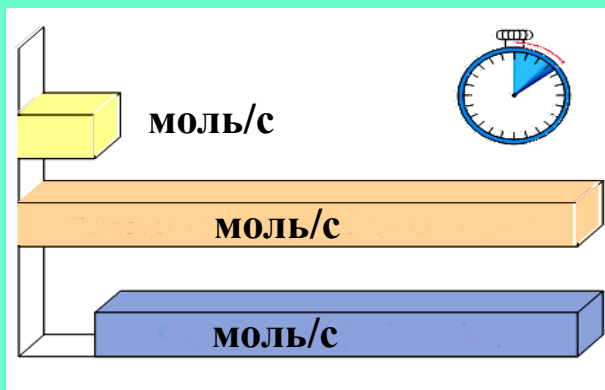
Каталитическое действие фермента - активность - это изменение количества субстрата под влиянием фермента в единицу времени.

Ее определяют в стандартных условиях (давление - **1 атм.**, температура - **25°C**, оптимум pH) по возрастанию скорости химической реакции в присутствии фермента

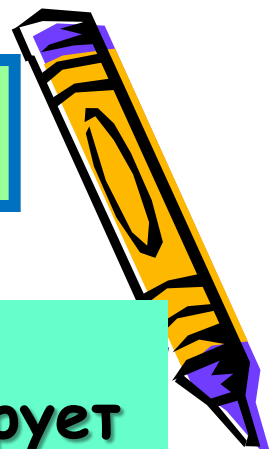
без фермента

с ферментом

активность фермента



Единицы активности фермента:



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

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

- 1 международная единица (U, E) - количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение субстрата со скоростью 1 мкмоль за 1 мин.

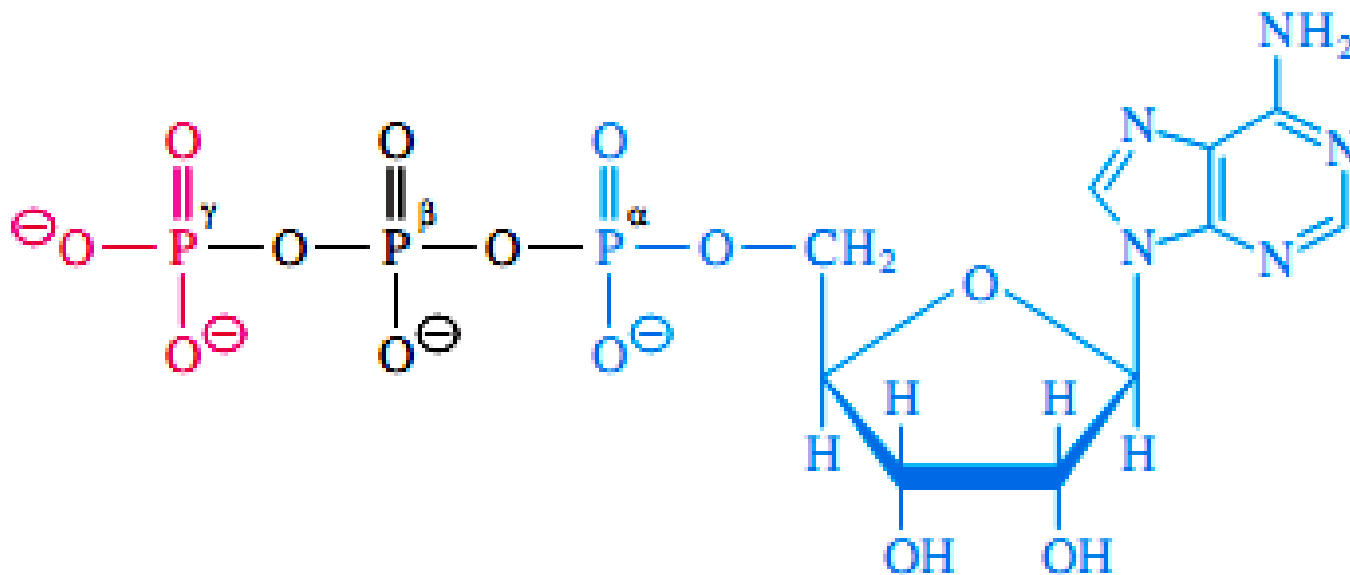
$$1 \text{ E} = 16,67 \text{ нкат.}$$



**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ**



Коферменты переноса групп



Аденозинтрифосфат (АТФ)

Переносимые группы:



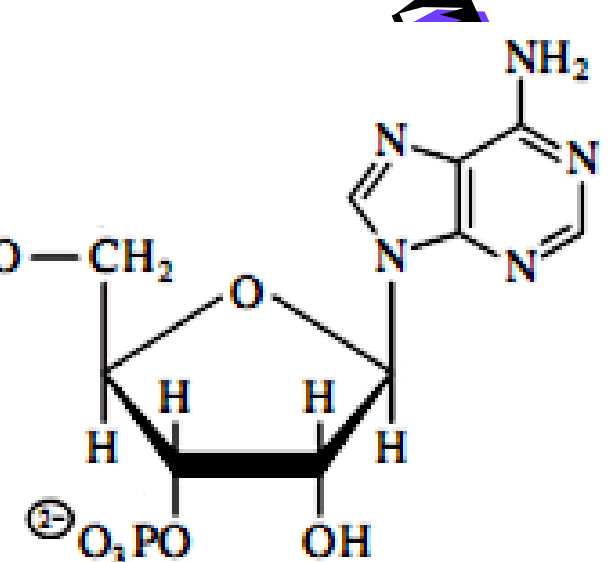
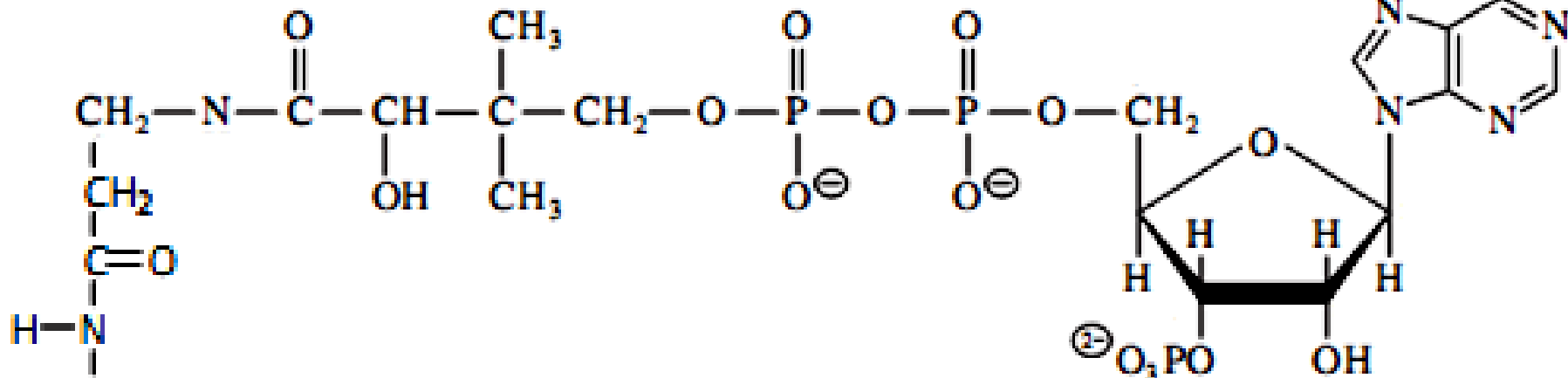
Наиболее важные ферменты:

фосфотрансферазы (КФ 2.7.n.n)

нуклеотидилтрансферазы (КФ 2.7.n.n)

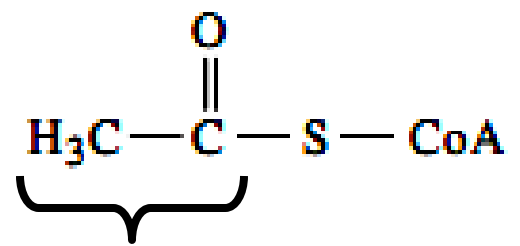
лигазы (КФ 6.n.n.n)





Кофермент А

Переносимые группы:
ацильные остатки

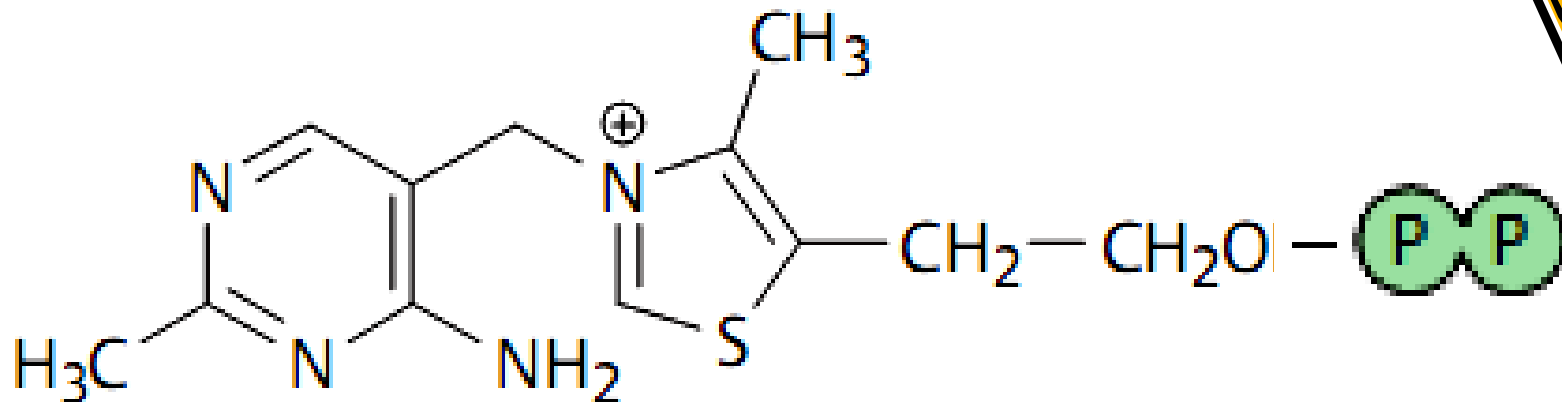


Ацетилкофермент А

Наиболее важные ферменты:

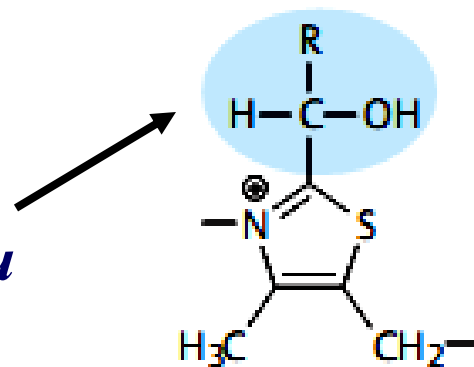
ацилтрансферазы (КФ 2.3.n.n) *CoA-трансферазы* (КФ 2.8.3.n)

Тиаминдифосфат (предшественник B_1)



Переносимые группы:

гидроксиалкильные остатки



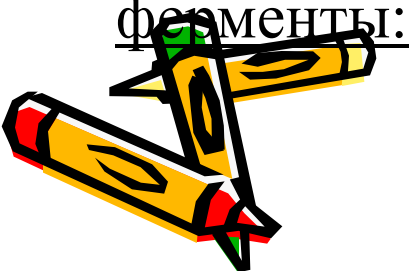
Наиболее важные

ферменты:

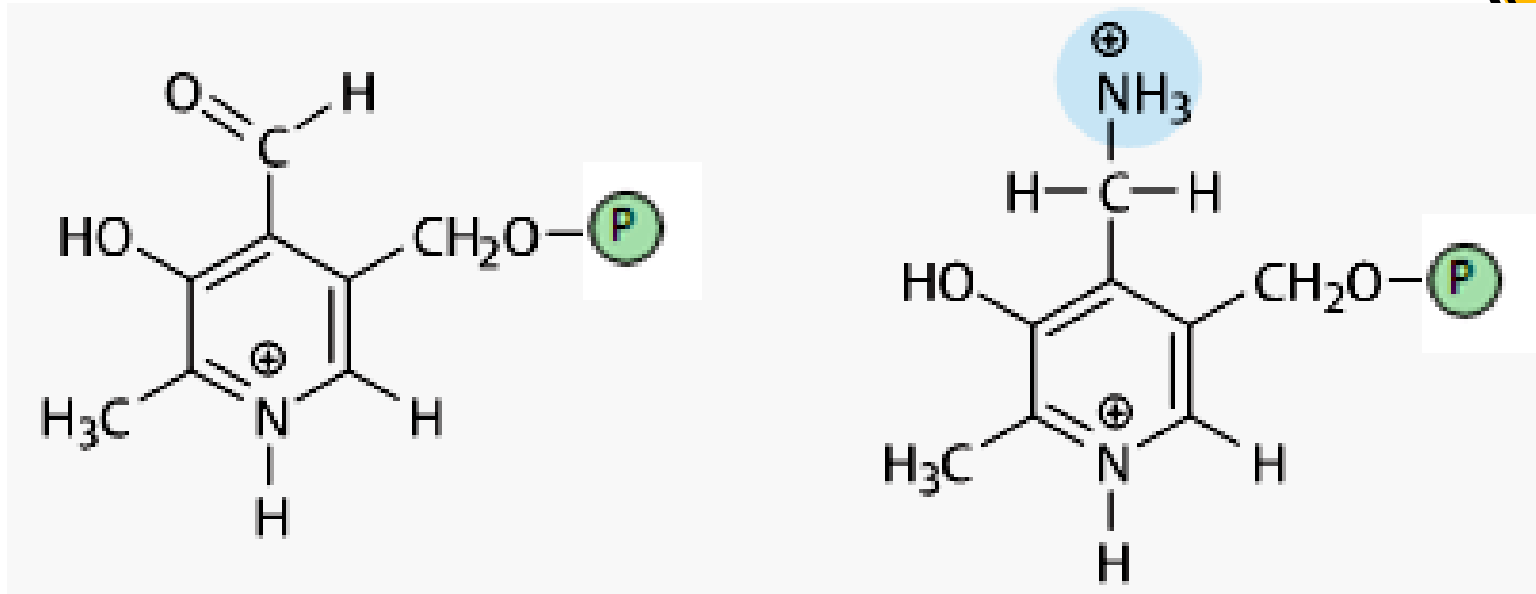
декарбоксилазы (КФ 4.1.1.n)

дегидрогеназы оксокето кислот (КФ 1.2.4.n)

транскетолаза (КФ 2.2.1.1)



Пирдоксальфосфат



Переносимые группы:

аминогруппа

аминокислотные остатки

Наиболее важные

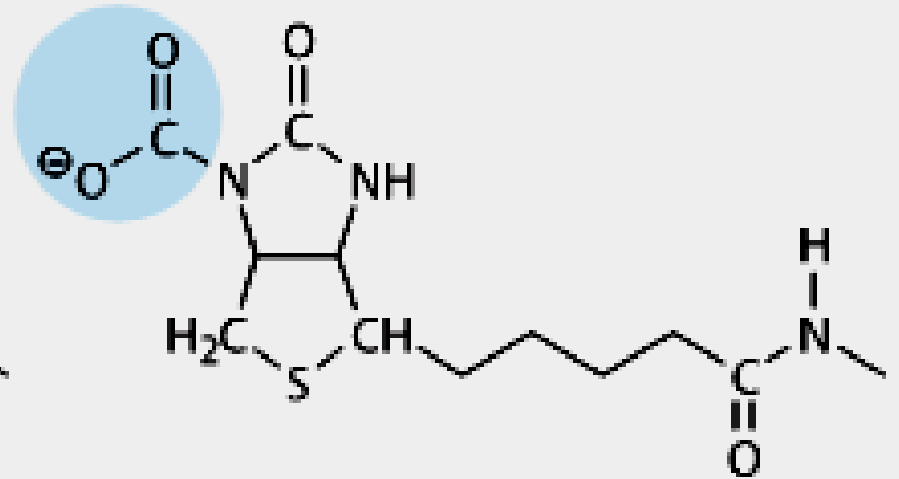
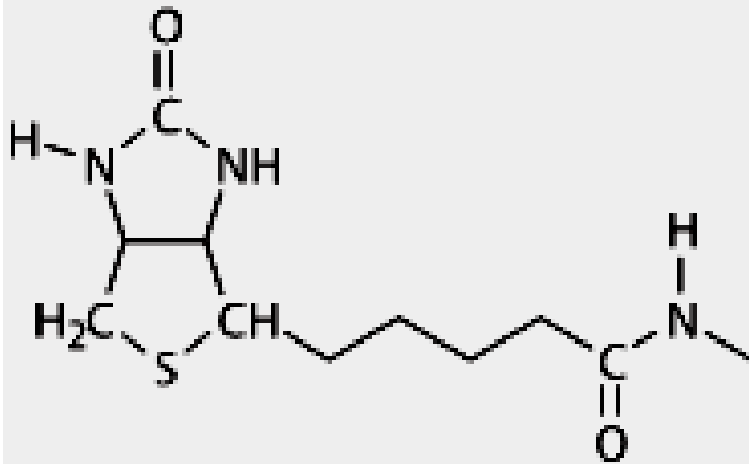
трансаминазы (КФ 2.6.1.n)

ферменты:

многие *лиазы* (КФ 4. n. n. n)



БИОТИН



Переносимые группы:



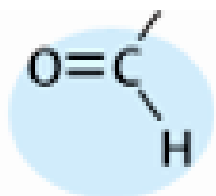
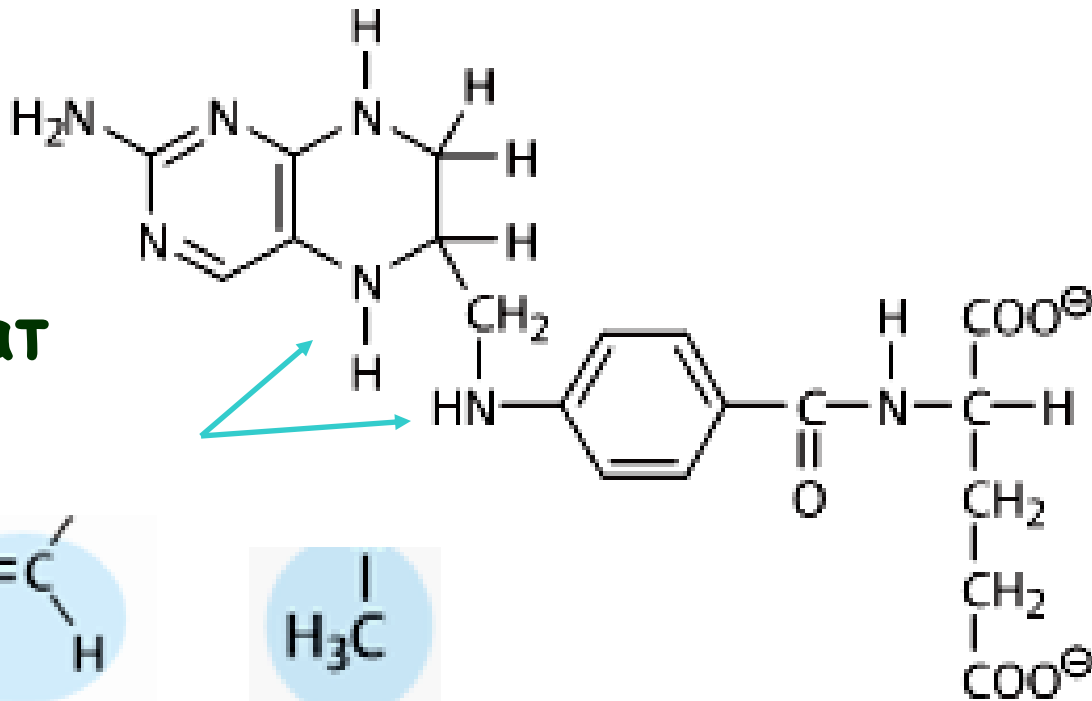
Наиболее важные

карбоксилазы (КФ 6.4.1.n)

ферменты:



Тетрагидрофолат



формил-



метил-

Переносимые группы:

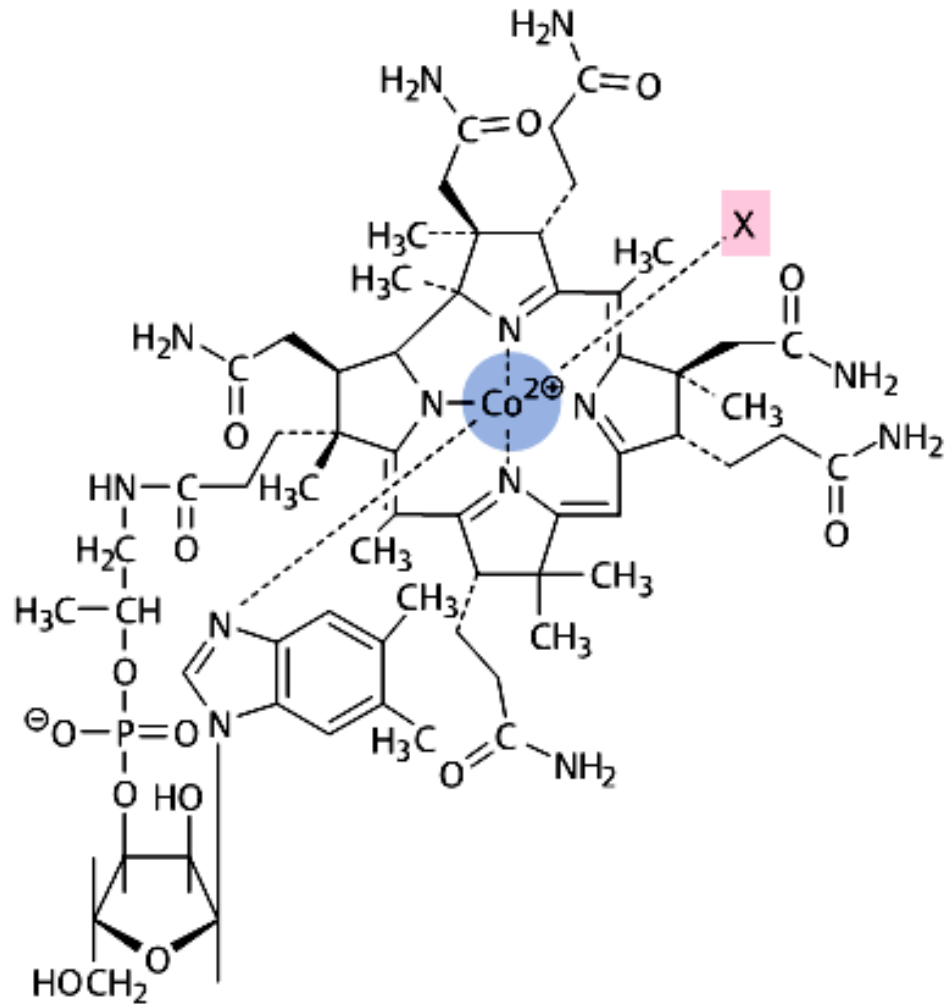
C₁-группы (одноуглеродные остатки)

Наиболее важные ферменты:

C₁-трансферазы (КФ 2.1.n.n)



Кобаламиновые коферменты (дезоксиаденозил- кобаламин, метилкобаламин)



Переносимые группы:

метил-

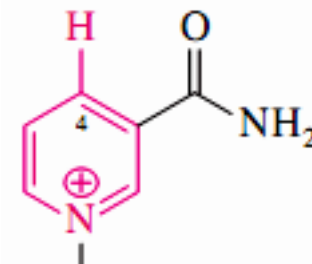
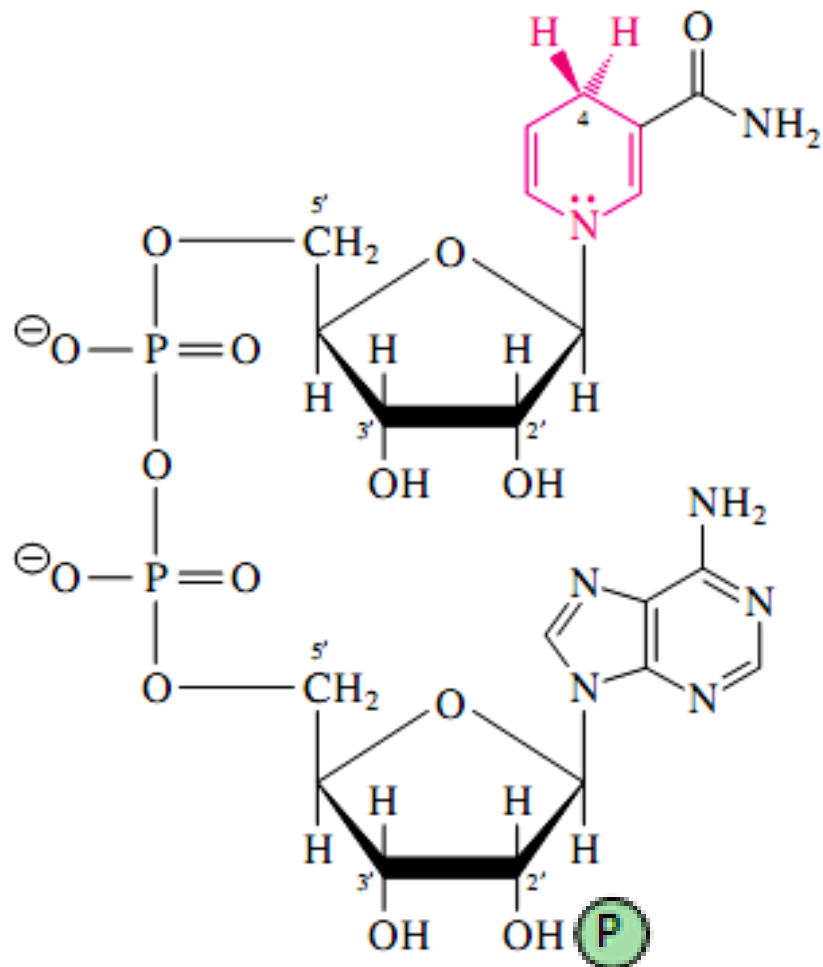
Наиболее важные
ферменты:

метилтрансферазы (КФ 2.1.1.n)
мутаза (КФ 5.4.n.n)

внутримолекулярная изомеризация



Окислительно-восстановительные коферменты

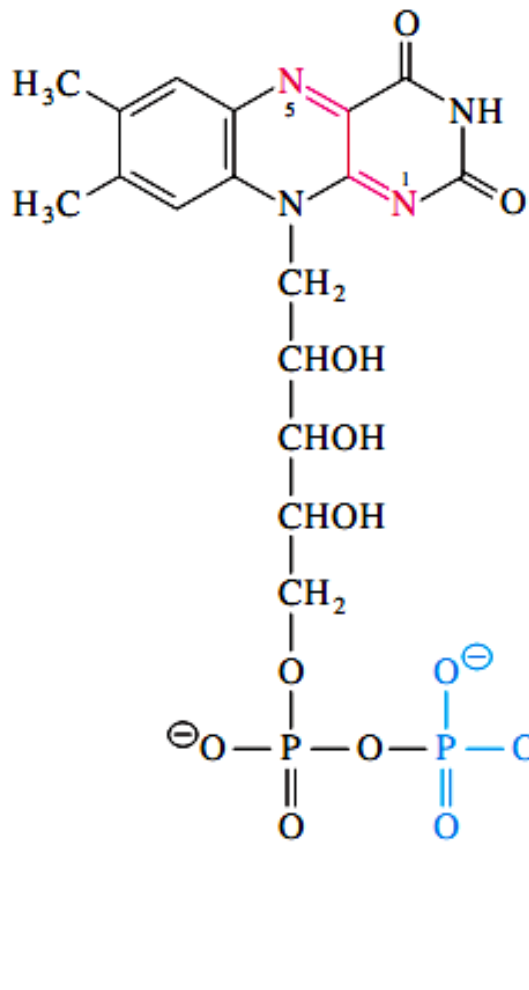


окисленная форма

Переносимые группы:

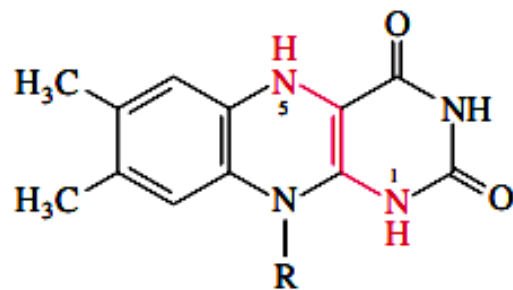
H⁻ (гидрид-ион; 2e, H⁺)

**Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺);
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
(НАДФ⁺).**

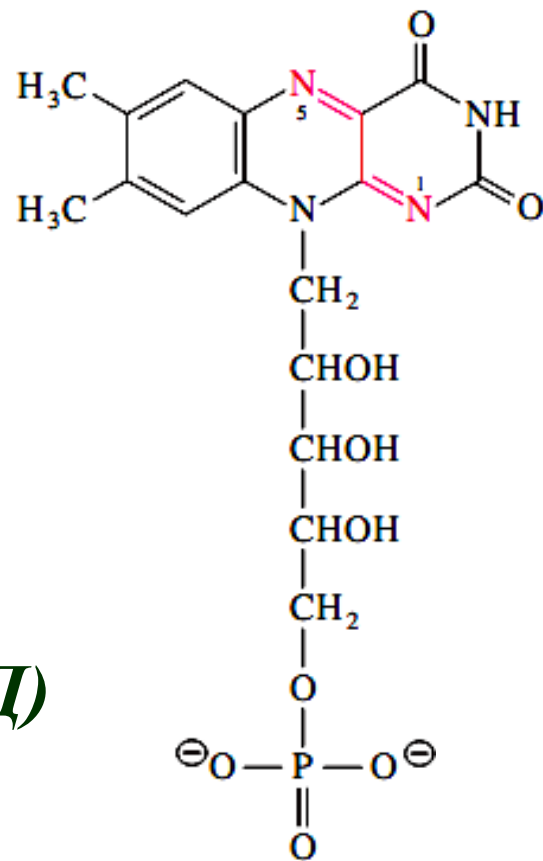


Флавинадениндинауклеотид (ФАД)

Первичные группы: **2H**

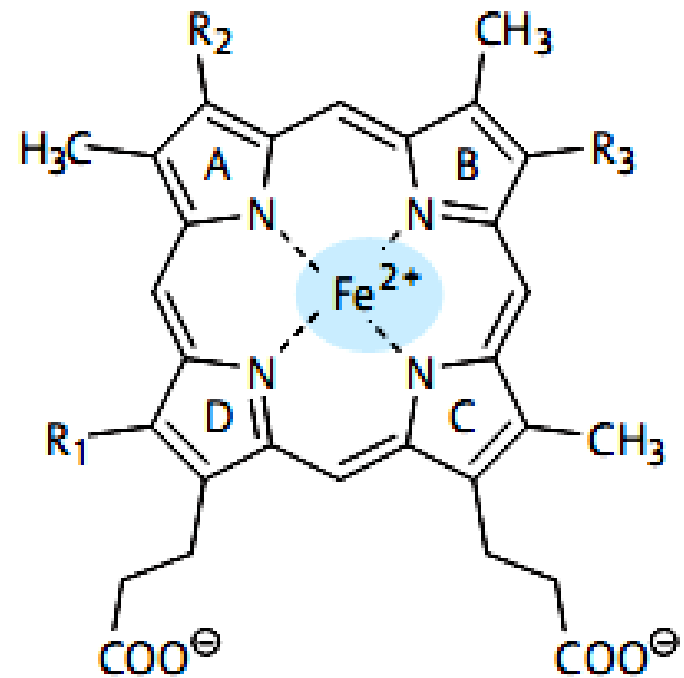
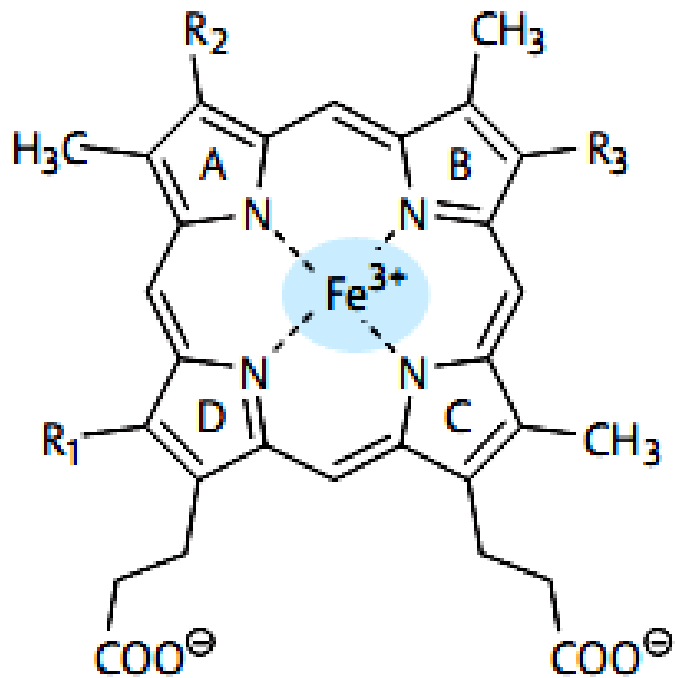


восстановленная форма



Флавинаденинмоноуклеотид (ФМН)

Гем



Простетическая группа *цитохромов*

Переносимые группы: *1e*

