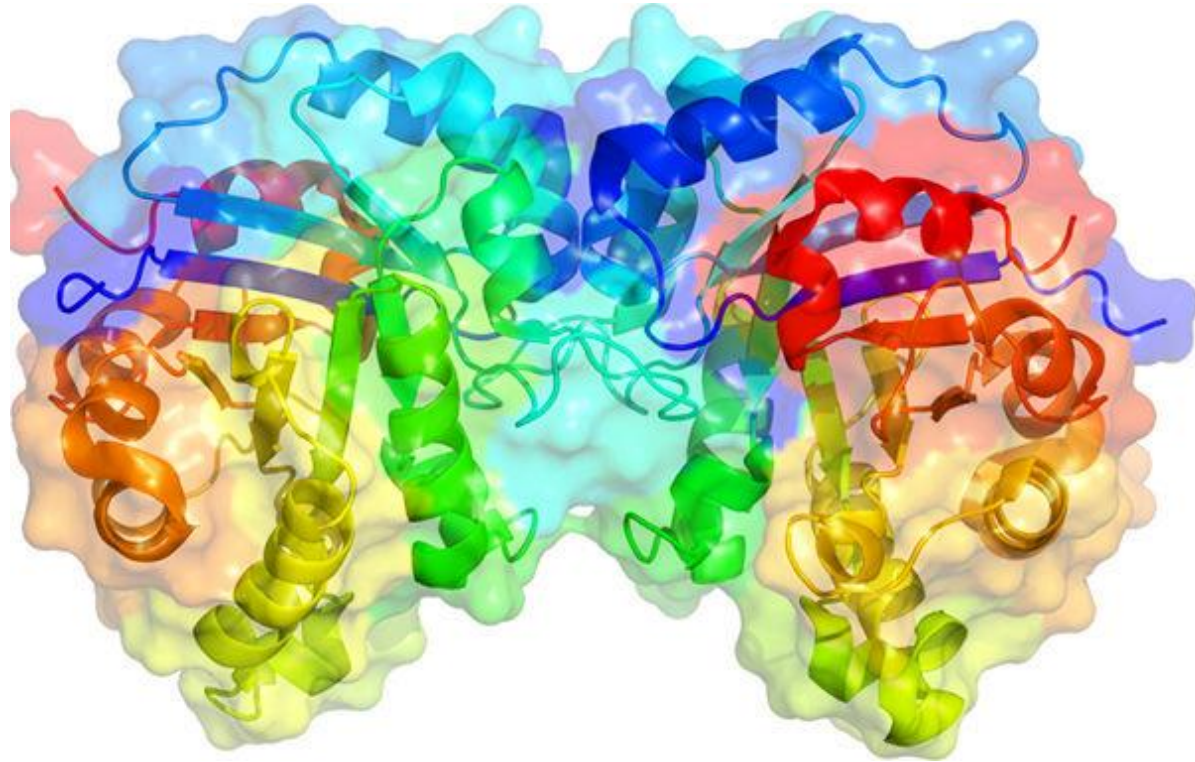


ФЕРМЕНТЫ



доцент кафедры биохимии

Леднёва И.О.

Ферменты (энзимы) – это биокатализаторы белковой природы, которые ускоряют химические реакции в организме

- *лат. «fermentatio» - брожение;*
- *греч. «en zyme» - в дрожжах, в закваске.*

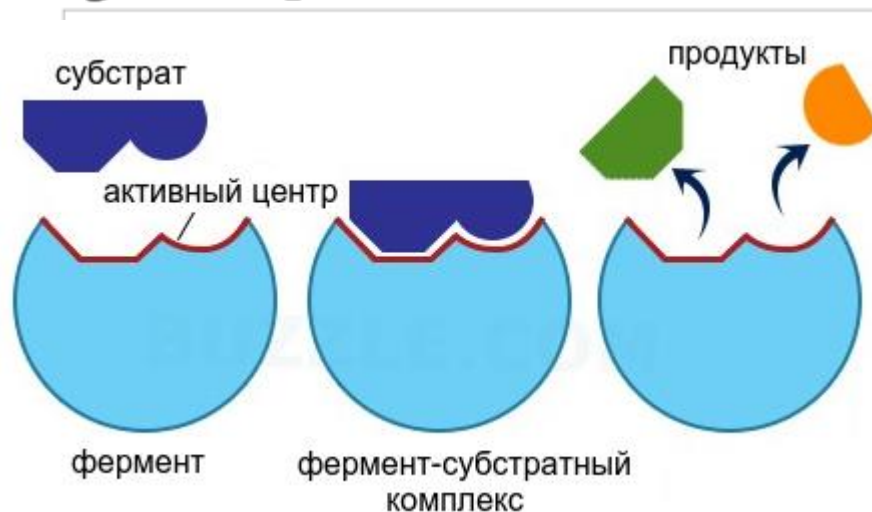
Энзимология (ферментология) – наука про ферменты

Условные обозначения в ЭНЗИМОЛОГИИ

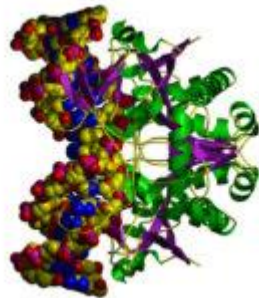
E – фермент, энзим (“enzyme”)

S – субстрат - вещество, на
которое действует фермент

P – продукт реакции



Химическая природа ферментов



Денатурация ферментов

Высокая Mr

Амфотерность

Гидролиз до аминокислот

Неспособность к диализу

Электрофоретическая подвижность

Искусственный синтез из аминокислот

Высокая специфичность

ь

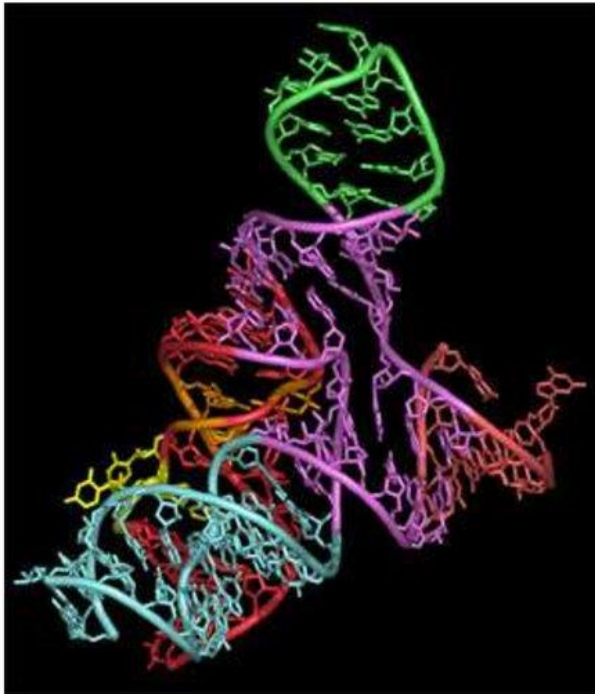
Химическая природа ферментов

НО:

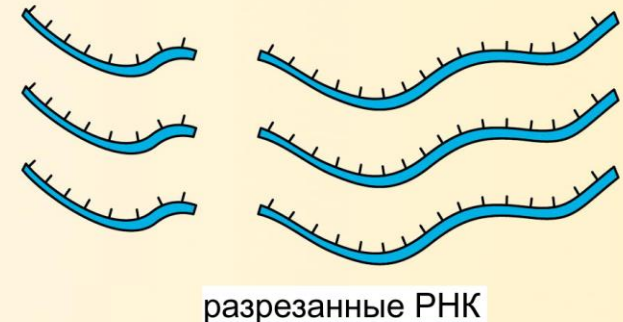
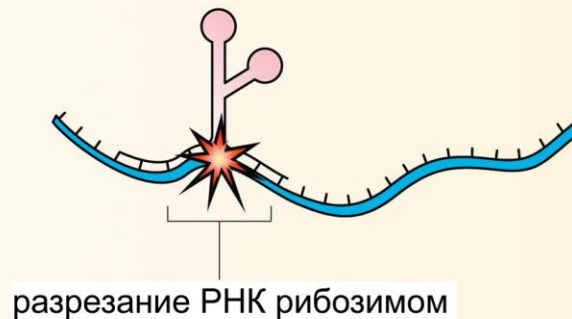
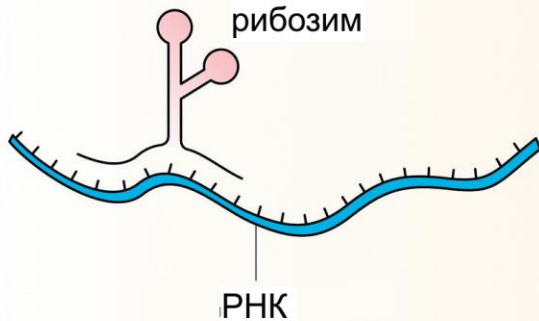
Каталитические РНК (рибозимы):

- участвуют в удалении интронов из пре-м-РНК;
- созревание тРНК с помощью рибонуклеазы рРНК;
- созревание РНК генома патогенных вирусов.

Рибозимы



- В 1981 г. группой американских биохимиков во главе с Томасом Чехом было обнаружено, что в природе имеются виды РНК, которые, подобно белкам, обладают высокоспецифической каталитической активностью. Их субстратсвязывающий домен присоединяется к комплементарному участку РНК-мишени с помощью водородных и других связей, а каталитический участок расщепляет ее в специфическом сайте. Такие РНК-катализаторы были названы рибозимами.



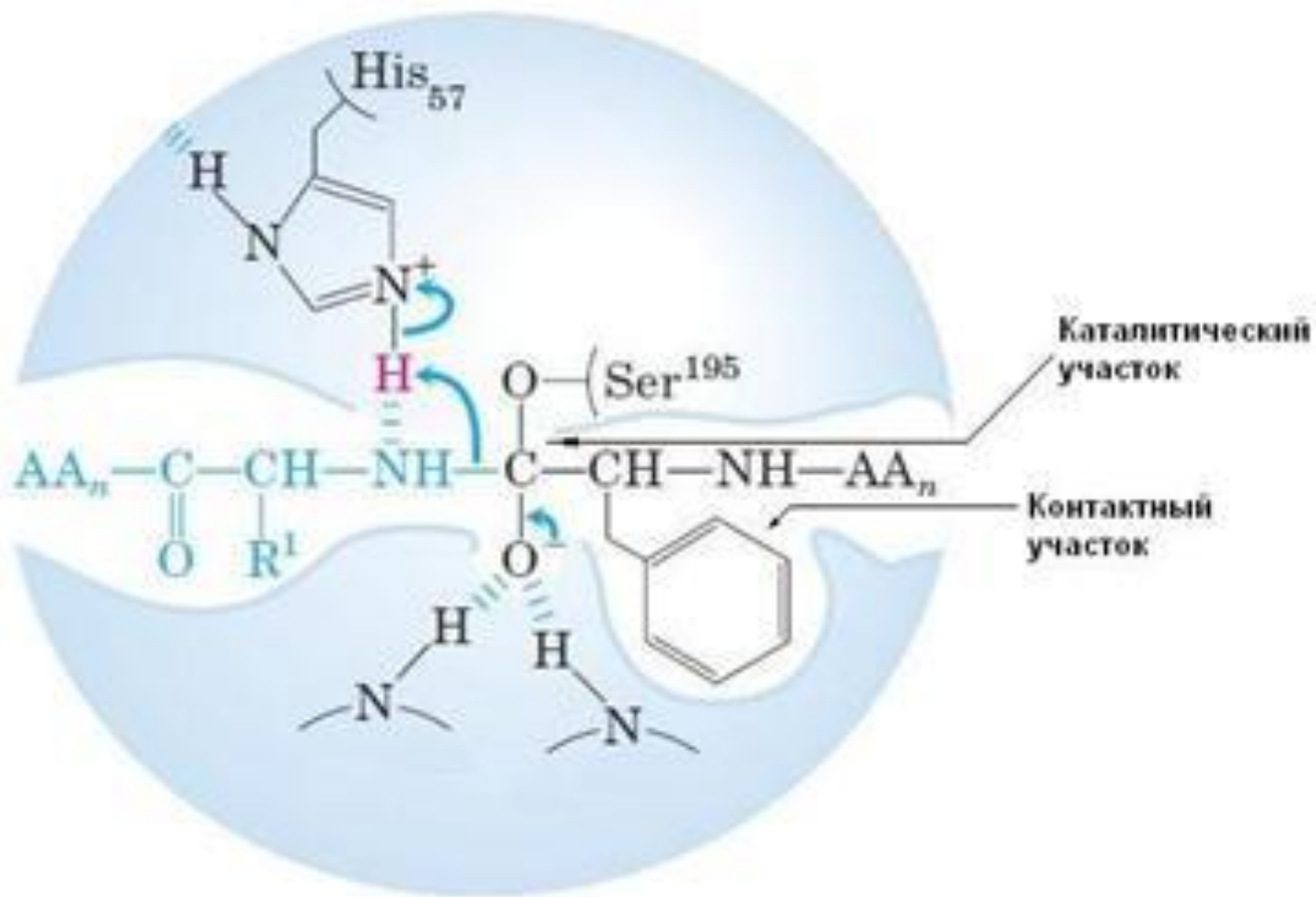
Активный центр фермента

- Уникальная **комбинация аминокислотных остатков**, обеспечивающая непосредственное взаимодействие с молекулой субстрата и принимающая прямое участие в акте катализа.
 - У сложных ферментов в состав активного центра входит также **кофактор**.
- В активном центре условно различают:
- **участок связывания**
 - **каталитический участок**

Строение активного центра фермента



Активный центр фермента



Свойства активного центра ферментов

- 1. На него приходится малая часть общего объема фермента.**
- 2. Имеет форму узкого углубления или щели в глобуле фермента.**
- 3. Это трехмерное образование, в формировании которого участвуют функциональные группы линейно удаленных АК остатков.**
- 4. Субстраты относительно слабо связываются с активным центром.**
- 5. Специфичность при связывании субстрата с активным центром.**

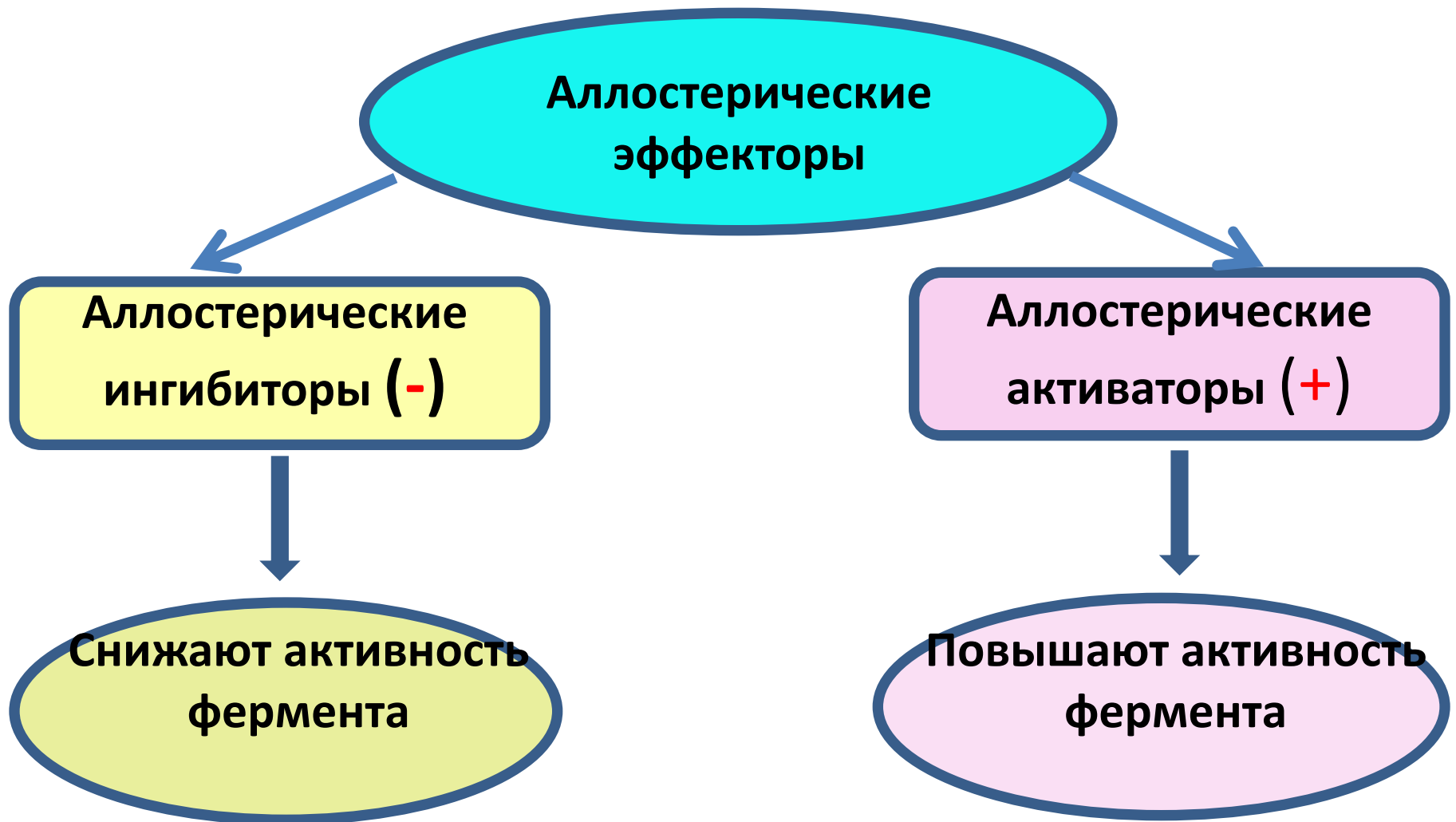
Аллостерический центр (регуляторный)

- Участок молекулы фермента, с которым СВЯЗЫВАЮТСЯ эфффекторы.

allos – другой

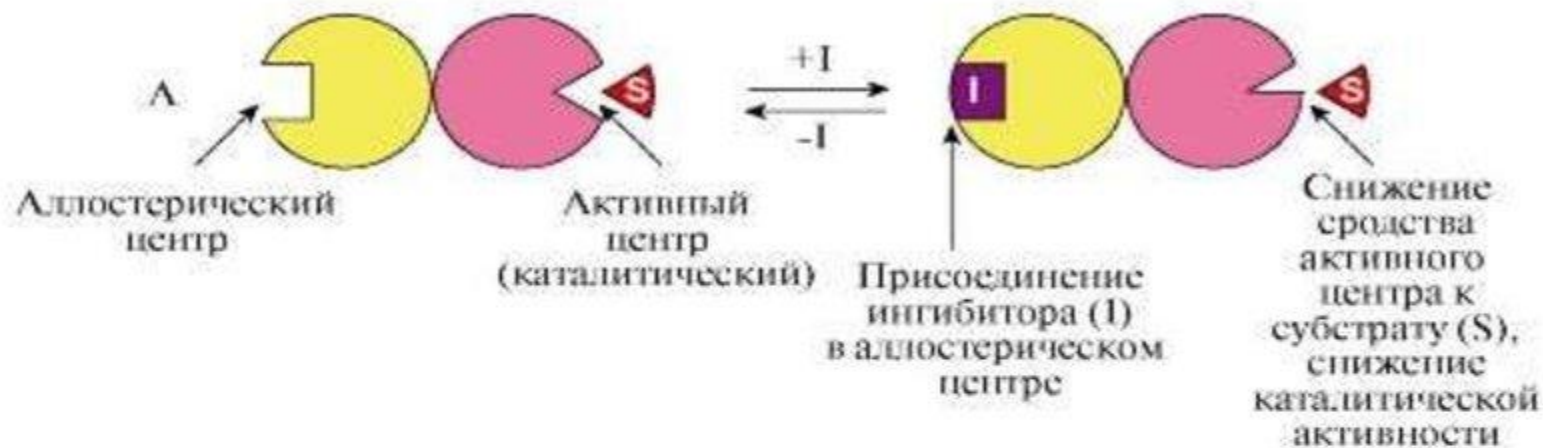
steros – пространственный





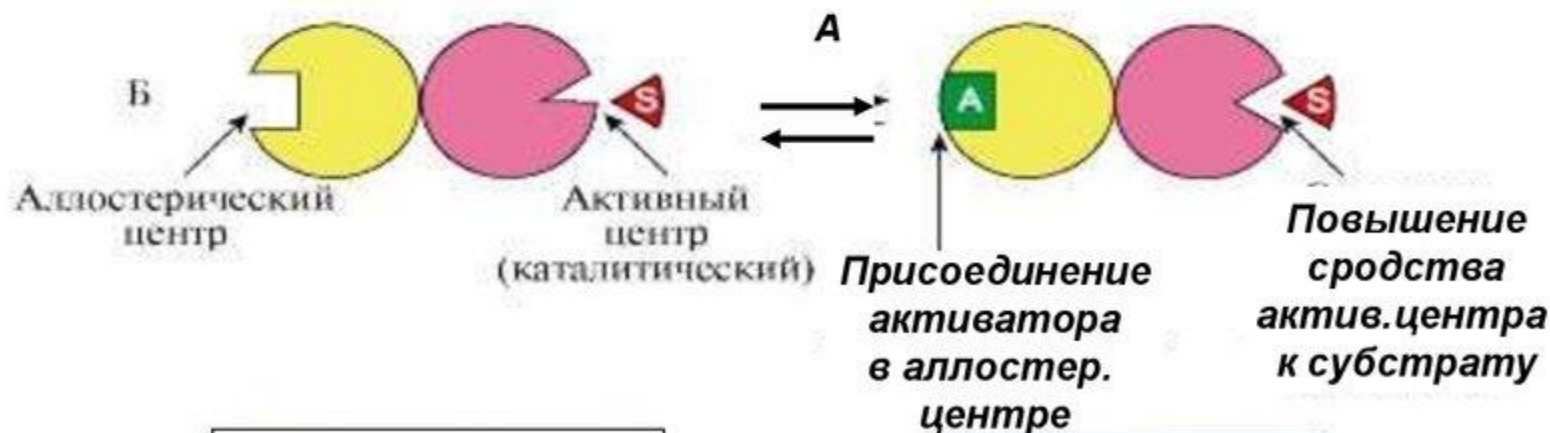
Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет **третичную структуру** фермента и **конфигурацию активного центра**. В результате изменяется активность фермента

Аллостерическая регуляция



Активный E

Неактивный E

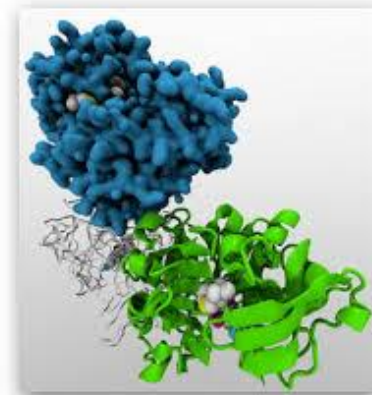


Неактивный E

Активный E

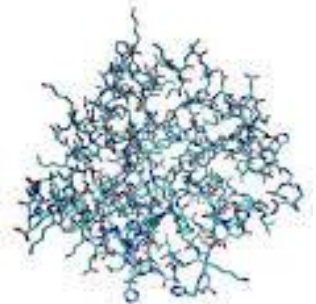
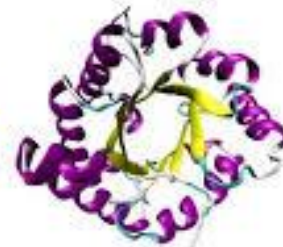
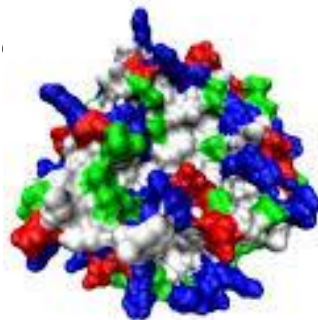
Общие свойства ферментов и неорганических катализаторов

- Не расходуются в процессе реакции
- Оказывают действие при малых концентрациях.
- Не оказывают влияния на величину константы равновесия реакции.
- Их действие подчиняется закону действующих масс.
- Не ускоряют термодинамически невозможные реакции.



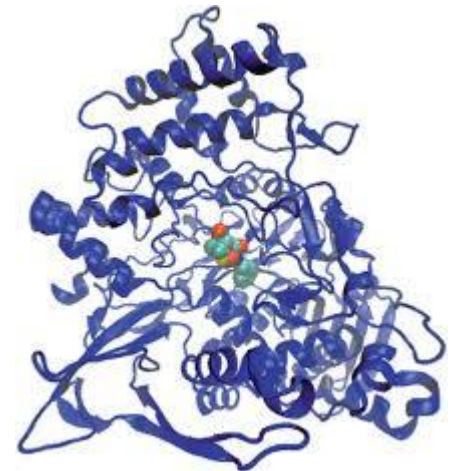
Отличие ферментов от неорганических катализаторов

- Термолабильность ферментов.
- Зависимость активности ферментов от рН.
- Специфичность действия ферментов.
- Скорость ферментативных реакций подчиняется кинетическим закономерностям



Отличие ферментов от неорганических катализаторов

- Активность ферментов зависит от действия регуляторов.
- Ряд ферментов при формировании III и IV структуры подвергается постсинтетической модификации.
- Размеры молекулы ферментов обычно намного превышают размеры их субстратов.

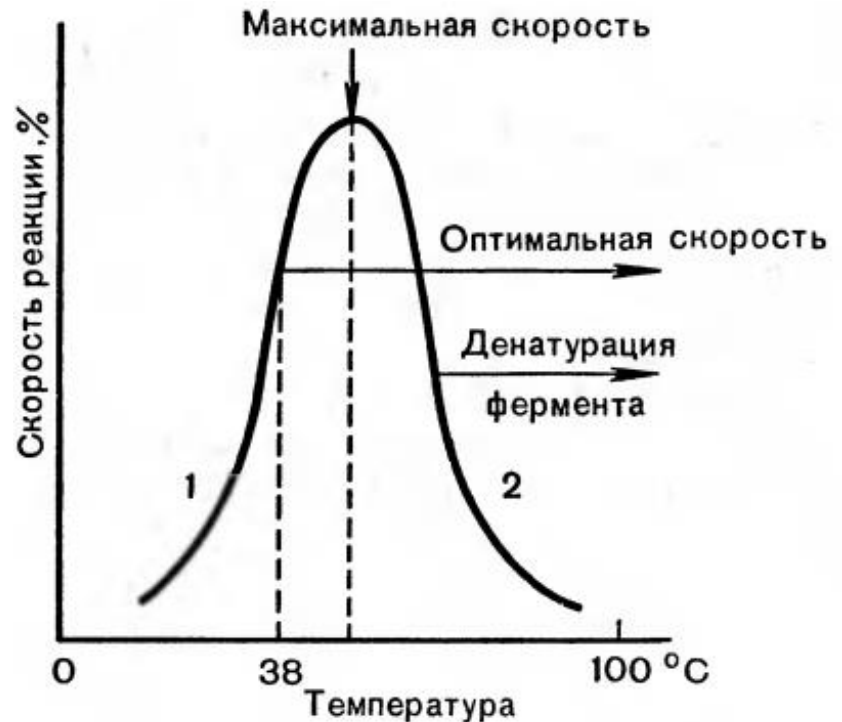


Свойства ферментов

- Термоллабильность

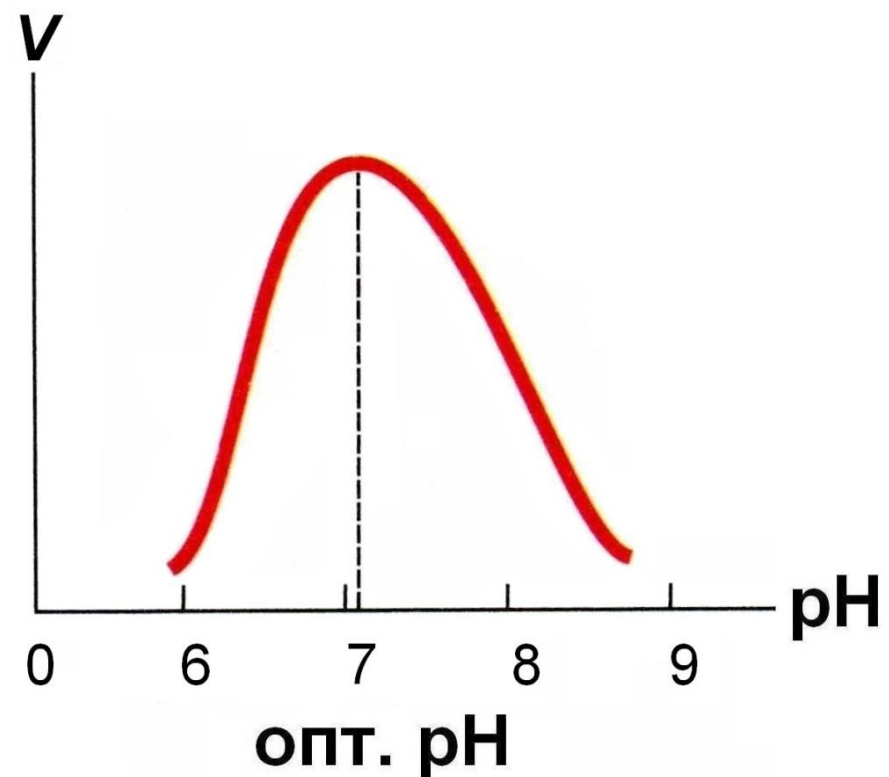
t-оптимум – 37-40°

55° и выше - денатурация



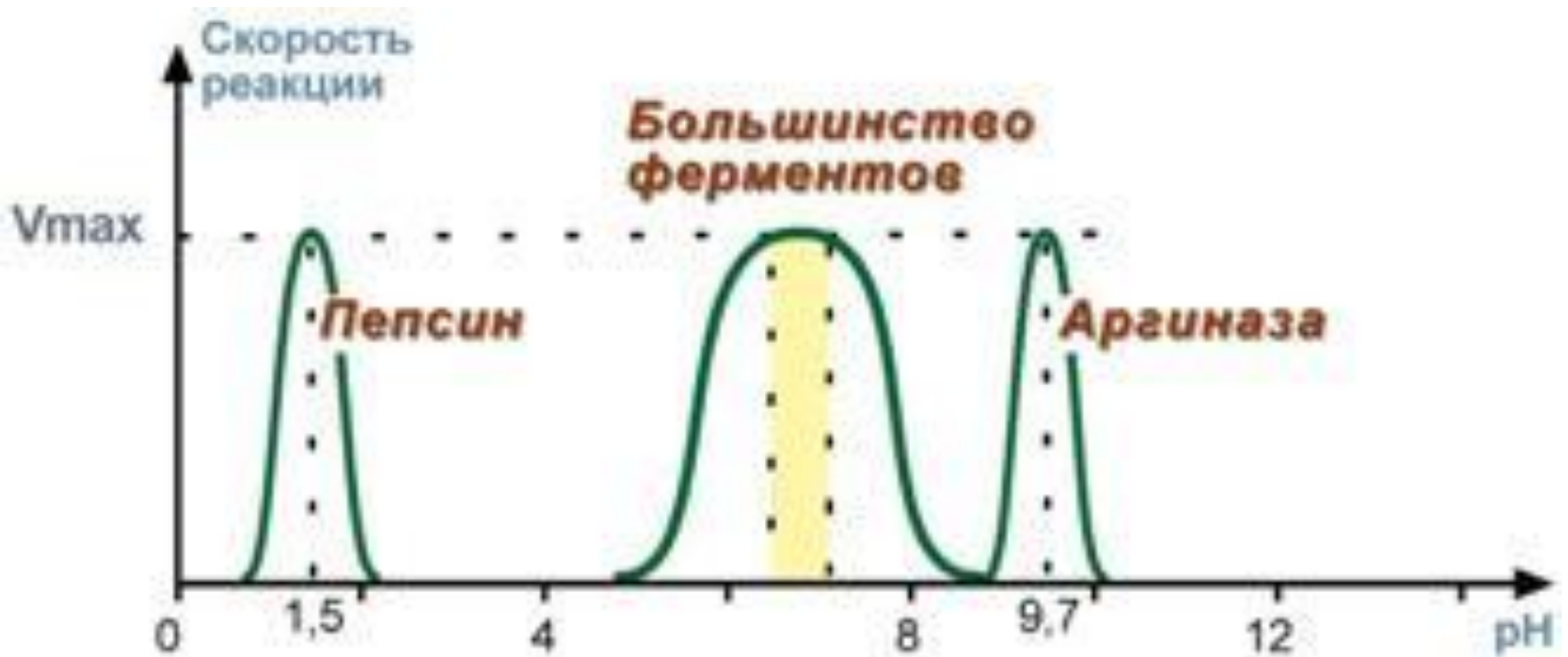
Свойства ферментов

- Зависимость скорости реакции от pH среды (**pH-оптимум**)
 - Для большинства ферментов $\text{pH}_{\text{опт}}=6-8$;
 - Пепсин $\text{pH}_{\text{опт}}=1,5-2,5$;
 - Аргиназа $\text{pH}_{\text{опт}}=10-11$.



Свойства ферментов

- Зависимость от pH



Свойства ферментов

При резких сдвигах pH среды:

- изменяется **конформация ферментов** (денатурация), **снижается активность**.

- Изменяется степень ионизации функциональных групп активного центра фермента и субстрата, что нарушает образование фермент-субстратного комплекса (**снижается сродство к субстрату**).

Свойства ферментов

- Зависимость скорости реакции от концентрации **фермента**
- Зависимость скорости реакции от концентрации **субстрата**

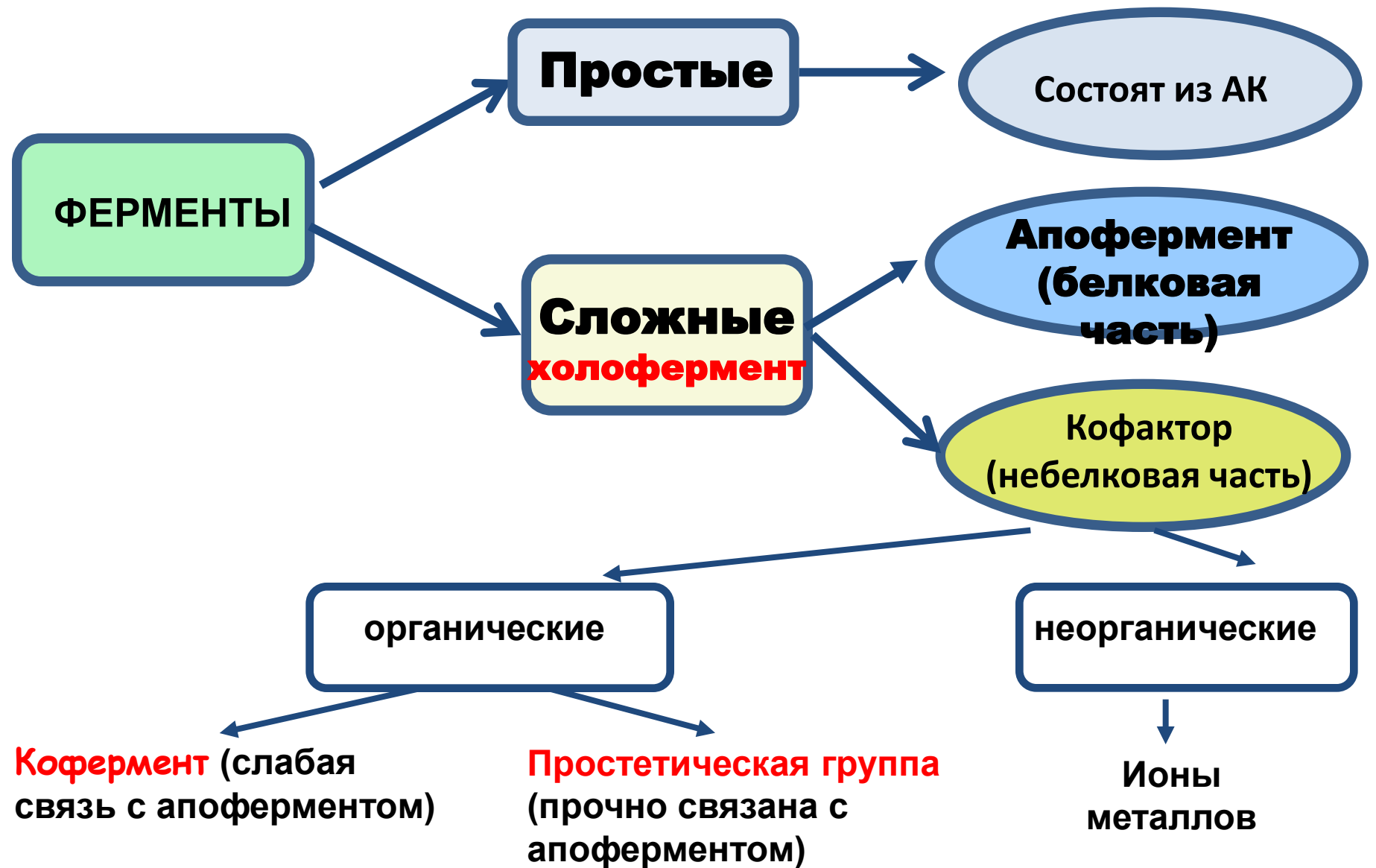


Рис. 2.11. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентраций фермента (а) и субстрата (б).

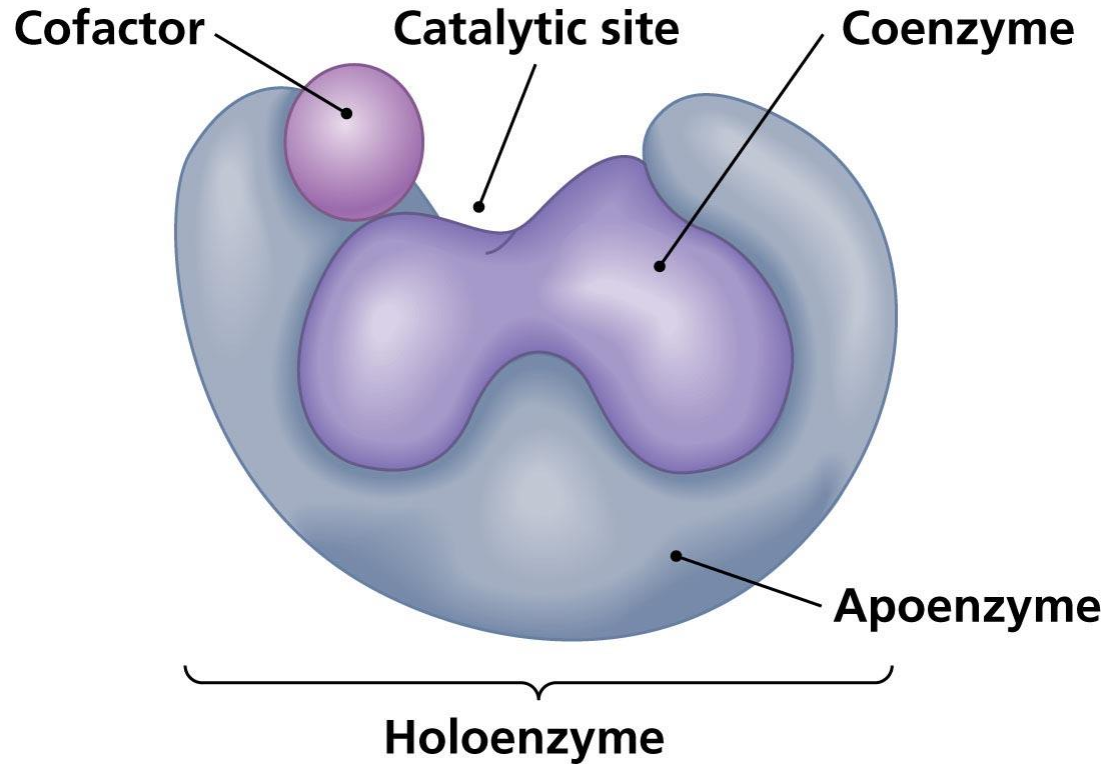
Специфичность действия ферментов:

- **Абсолютная** – фермент катализирует превращение только одного субстрата:
глюкокиназа, аргиназа, уреазы.
- **Относительная** - фермент катализирует превращение нескольких субстратов, имеющих один тип связи: **липаза, амилаза.**
- **Относительная групповая** – фермент катализирует превращение субстратов, имеющих один тип связи, в образовании которой участвуют определенные функциональные группы: **пепсин, химотрипсин, трипсин.**
- **Стереохимическая** – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера: **оксидаза L-аминокислот.**

Строение ферментов

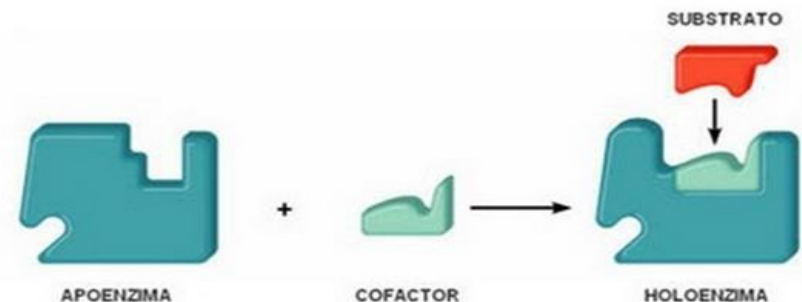


Строение сложных ферментов



Кофакторы ферментов – ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

- Стабилизируют **молекулы субстратов** с образованием комплекса E-S-Me (комплекс Mg^{2+} -АТФ)
- Стабилизируют **активный центр фермента**, облегчая присоединение субстрата или кофермента (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+})
- Стабилизируют **конформацию молекулы фермента**;
- Участвуют в ферментативном **катализе**;
- Выступают в роли **аллостерических модуляторов**.



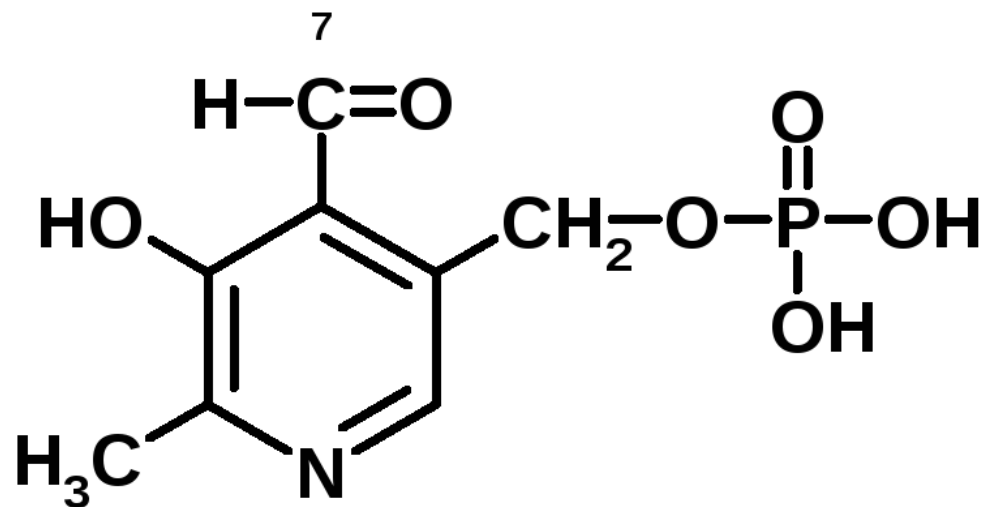
Кофакторы ферментов – ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

- Fe^{2+} или Fe^{3+} цитохромоксидаза, каталаза
пероксидаза
- Zn^{2+} алкогольдегидрогеназа
- Mg^{2+} гексокиназа, глюкозо-6-фосфатаза
- Mn^{2+} аргиназа
- Se глутатионпероксидаза



Кофермент – небелковая часть, легко отделяемая от апофермента.

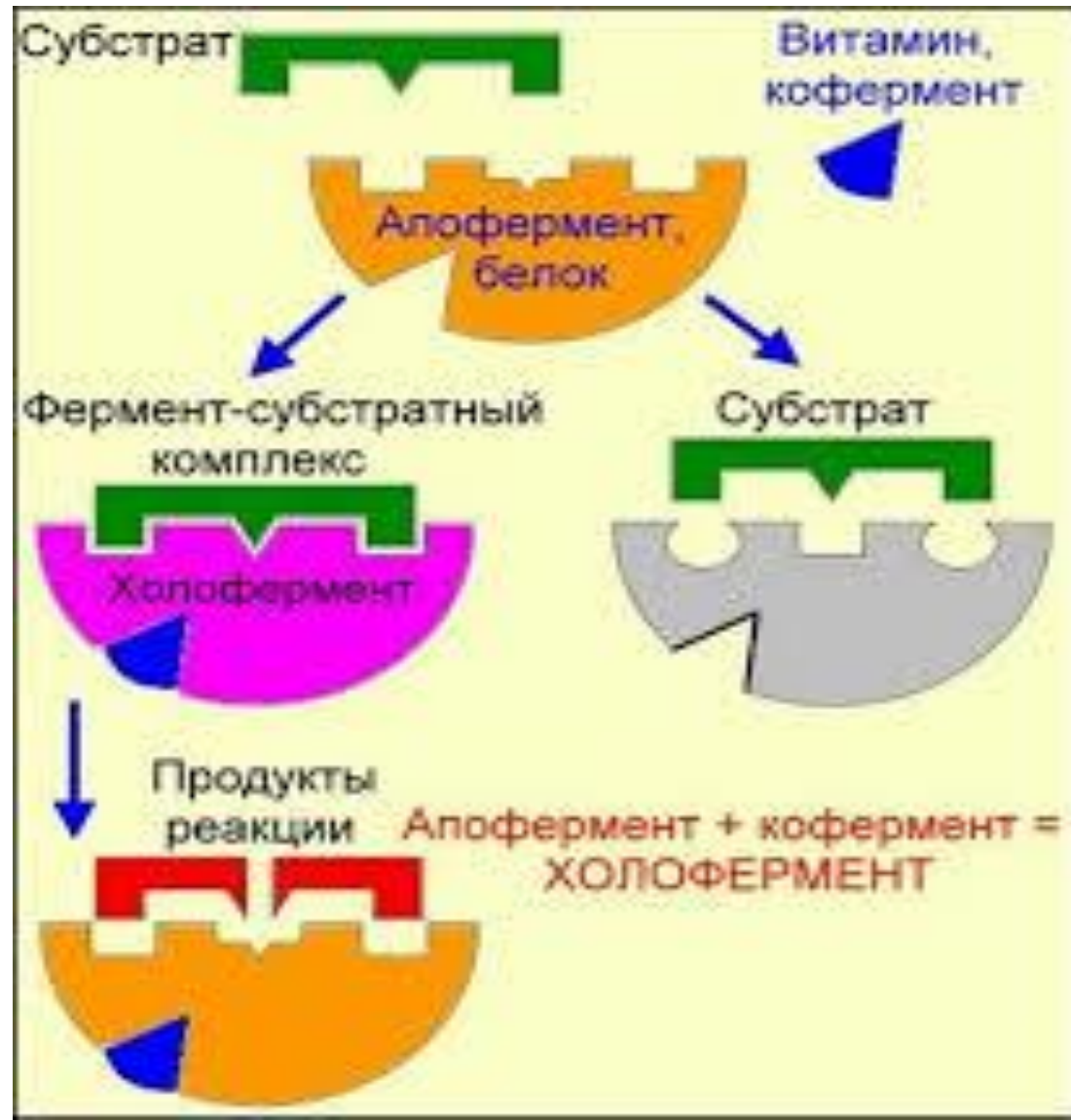
Часто коферментами служат **производные ВИТАМИНОВ**



пиридоксальфосфат

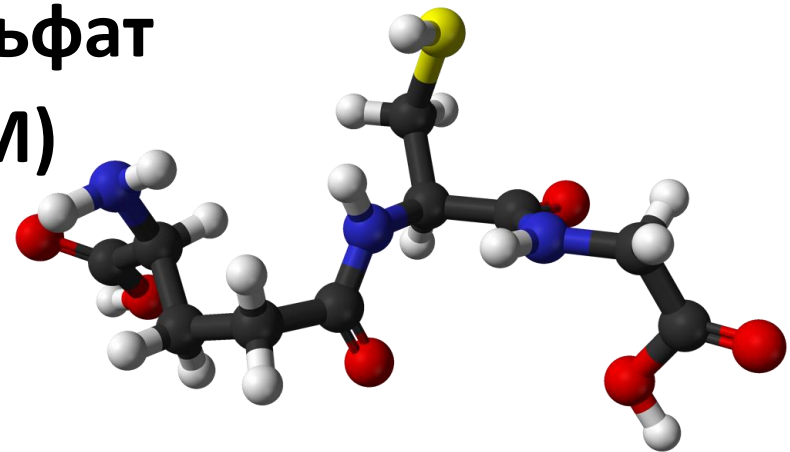
Кофермент

Ни **кофактор**,
ни **апофермент**
по отдельности
каталитической
активностью
не обладают.



Классификация коферментов:

- производные витаминов
- гемы (входят в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, NO-синтазы)
- нуклеотиды (доноры и акцепторы остатков фосфорной кислоты)
- убихинон (CoQ)
- фосфоаденозилфосфосульфат
- S-аденозилметионин (SAM)
- глутатион



Коферментные функции витаминов

Витамин	Коферментная форма	Фермент
В₁-тиамин	ТДФ	Транскетолаза, ПДК
В₂-рибофлавин	ФМН, ФАД	Флавинзависимые дегидрогеназы
В₃-пантотеновая к-та	КоА	Реакции ацилирования
В₆-пиридоксин	Пиридоксаль-фосфат	Аминотрансферазы
РР-никотинамид	НАД⁺, НАДФ⁺	НАД (Ф)⁺-зависимые дегидрогеназы
Фолиевая к-та	ТГФК	Перенос одноуглеродных групп

Механизм действия ферментов

Этапы ферментативного катализа

I Сближение и ориентация субстрата относительно активного центра фермента



II. Образование фермент-субстратного комплекса



III. Деформация субстрата и образование неустойчивого комплекса фермент-продукт



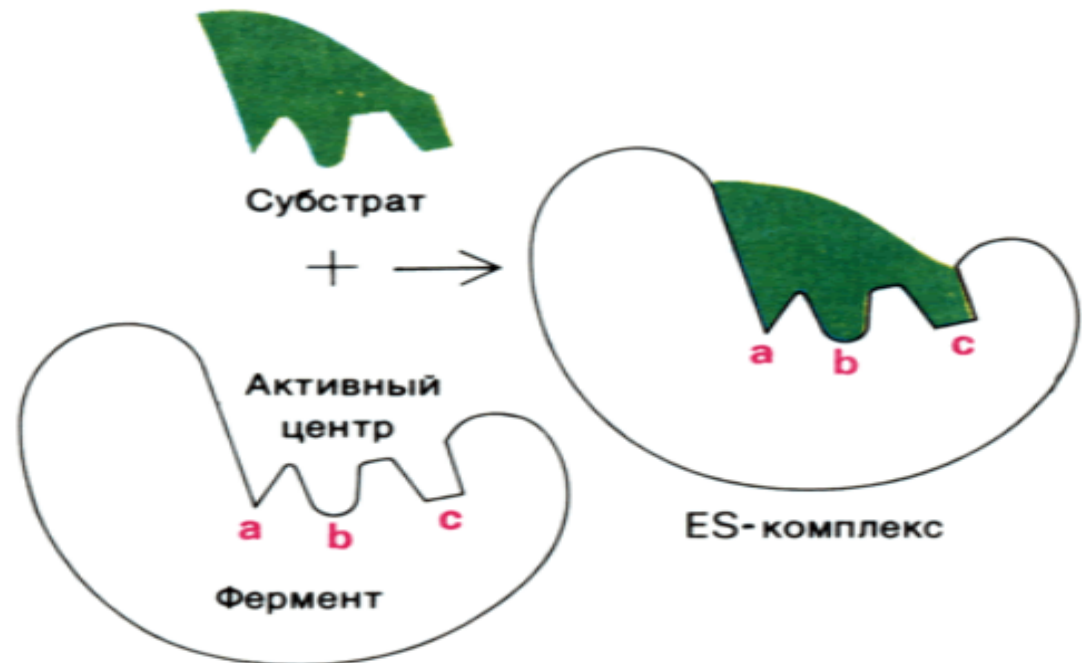
IV. Распад комплекса EP



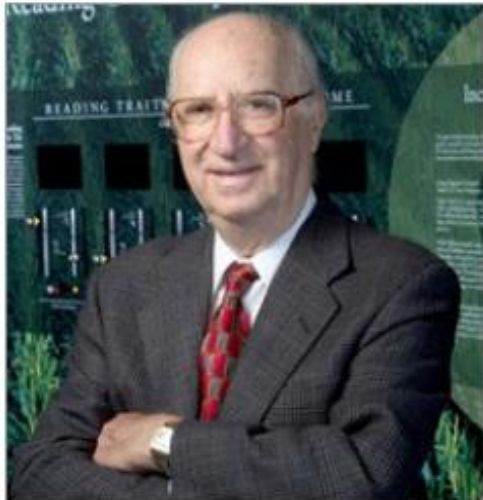
Теория Фишера, 1894 г.



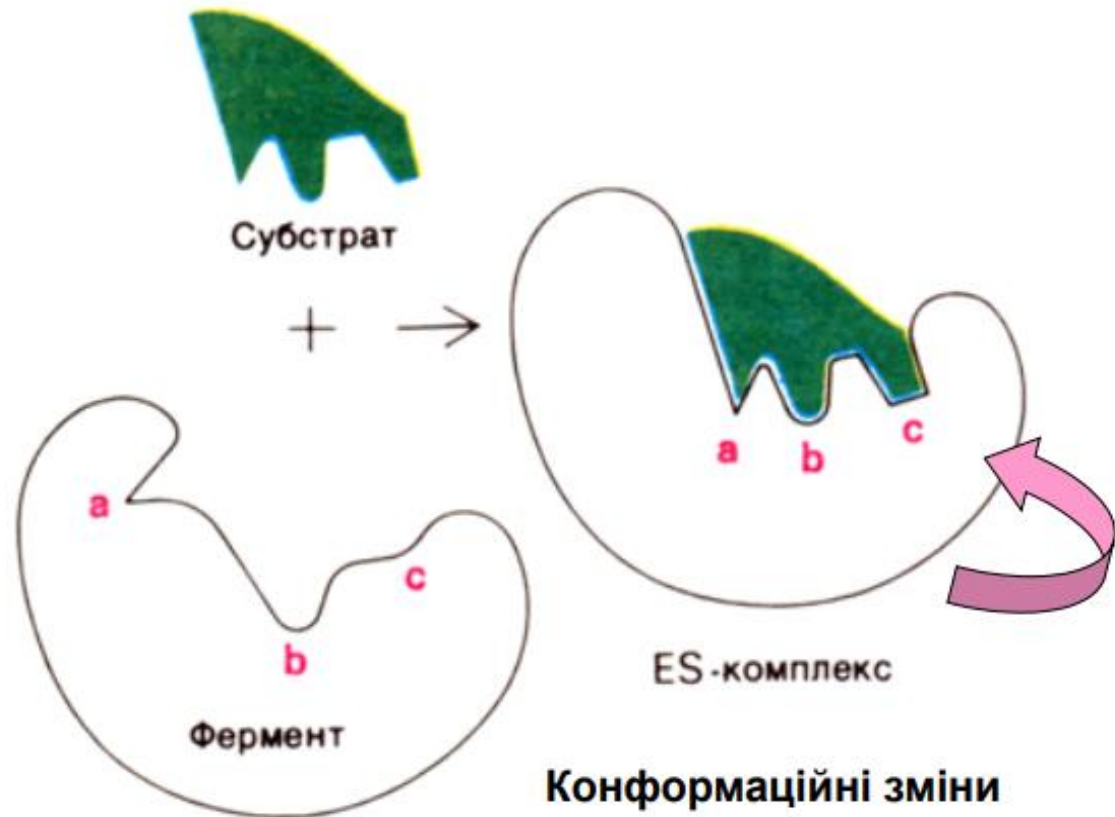
**“Ключ-замок” –
E и *S* полностью
комплементарны**



Теория Кошланда (1958 г.)



«Индукцированное соответствие **E** и **S**»



Молекулярные механизмы ферментативного катализа

- Кислотно-основной катализ

- АК, входящие в состав активного центра, имеют **функциональные группы**, проявляющие свойства **как кислот, так и оснований**.
- Функциональные группы выполняют роль **доноров** (в протонированной форме) или **акцепторов протонов** (в депротонированной форме) в процессе катализа.

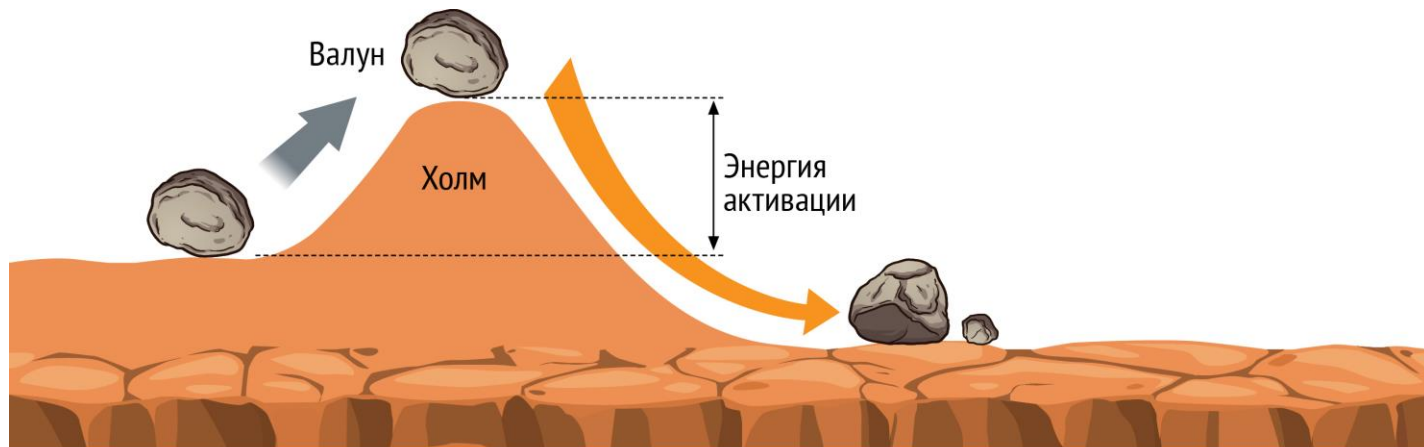
Молекулярные механизмы ферментативного катализа

- Ковалентный катализ

Подразумевает наличие **реакционных групп** в активном центре, которые образуют временные **ковалентные связи** с субстратом в процессе катализа.

Механизм действия ферментов

- Ферменты ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации.
- **Энергия активации** – энергия необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние при данной температуре.



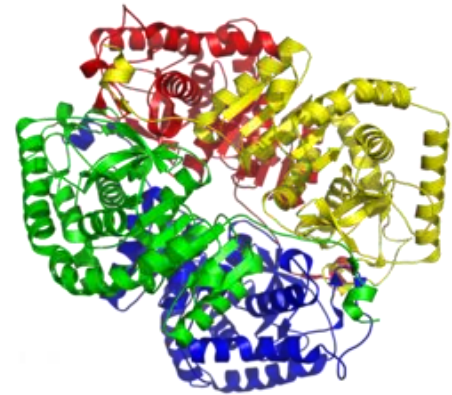
Механизм действия ферментов



Изоферменты

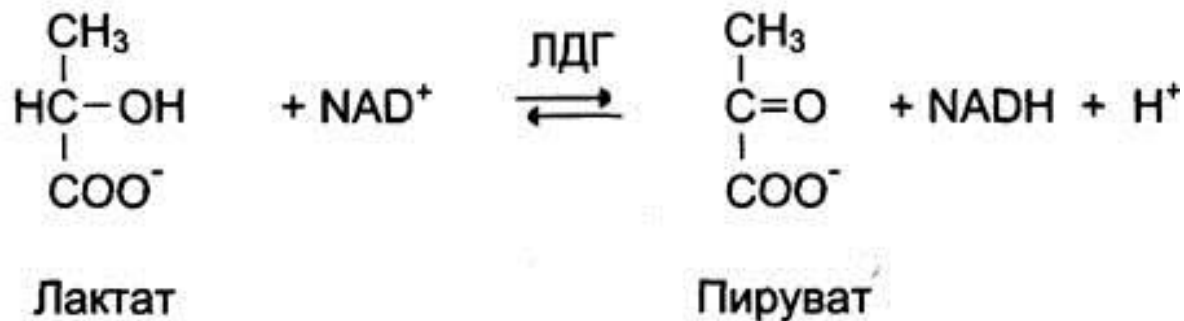
Изоферменты – это множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же химическую реакцию, но отличающиеся по первичной структуре белка, физико-химическим и каталитическим свойствам.

- Лактатдегидрогеназа
- Креатинкиназа



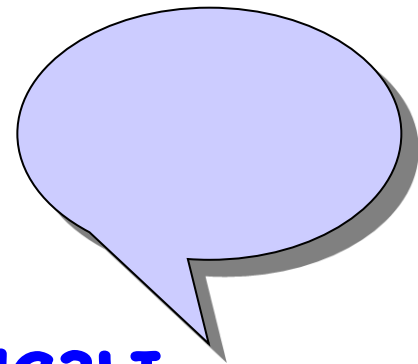
Лактатдегидрогеназа

- катализирует обратимую реакцию окисления лактата до пирувата



- Олигомерный белок, состоящий из **4-х** субъединиц двух типов **M** (от англ. **muscle** – **мышца**) и **H** (от англ. **heart** – **сердце**).
- Комбинация этих субъединиц лежит в основе формирования **5 изоформ** ЛДГ.

Изоферменты



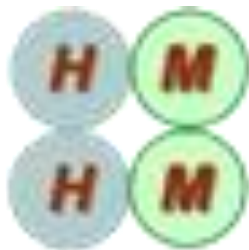
- Изоферменты актатдегидрогеназы



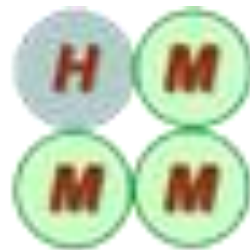
ЛДГ-1



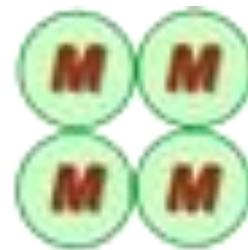
ЛДГ-2



ЛДГ-3



ЛДГ-4



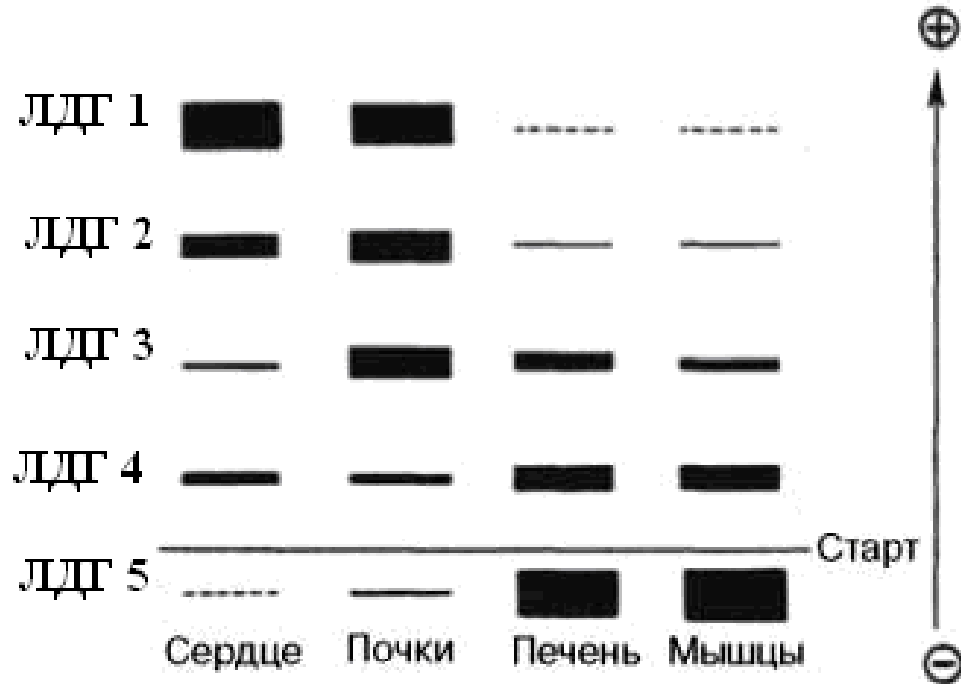
ЛДГ-5

H - Heart, сердце

M - Muscle, мышца

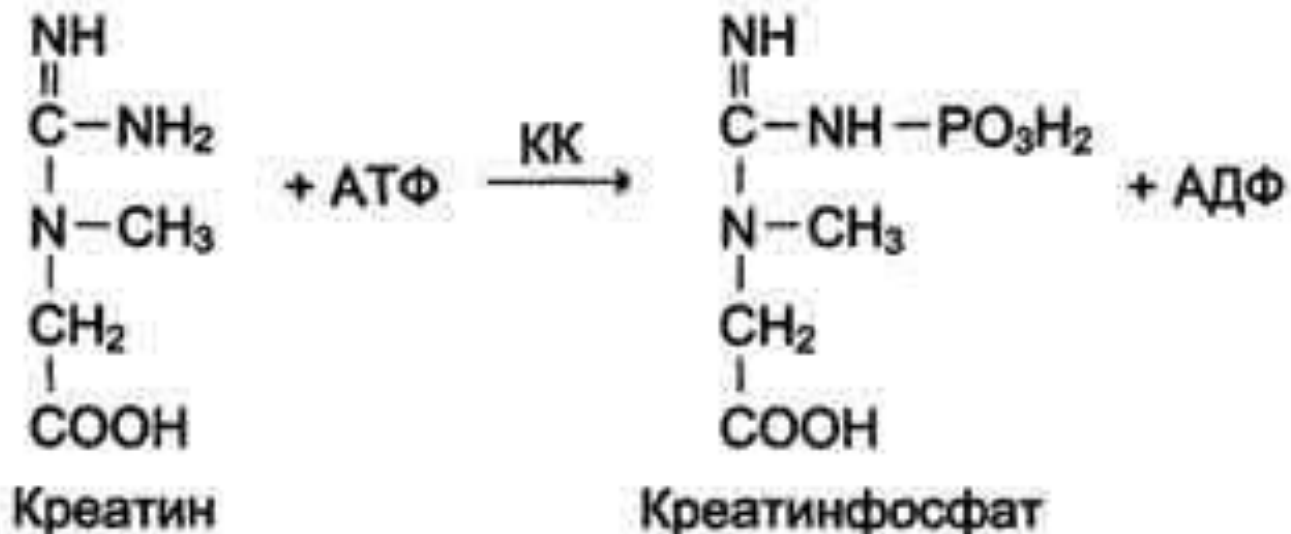
Лактатдегидрогеназа

- Изоформы **ЛДГ** отличаются друг от друга **электрофоретической подвижностью**, что позволяет устанавливать тканевую принадлежность изоформ ЛДГ



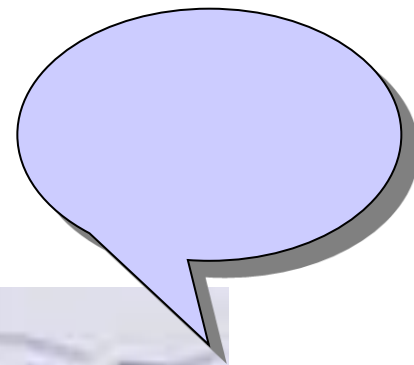
Креатинфосфокиназа

- Катализирует реакцию:



- Олигомерный белок, состоящий из **2-х** субъединиц двух типов **M** (от англ. **muscle** – **мышца**) и **B** (от англ. **brain** – **мозг**).

Изоферменты



Изоферменты **креатинкиназы**



МОЗГ

КК₁



СЕРДЦЕ

КК₂



МЫШЦЫ

КК₃

Отличия изоферментов:

- по первичной структуре;
- по физико-химическим свойствам;
- по локализации;
- по регуляторным свойствам;
- по каталитическим свойствам:
 - по сродству к субстрату
 - по максимальной скорости.

Изоферменты

Благодаря изоферментам достигаются:

- Особенности метаболизма в различных органах.
- Специализация метаболизма внутри клеток (цитоплазма, митохондрии, лизосомы)
- Дифференцировка и развитие тканей в онтогенезе.
- Тонкая регуляция метаболизма.

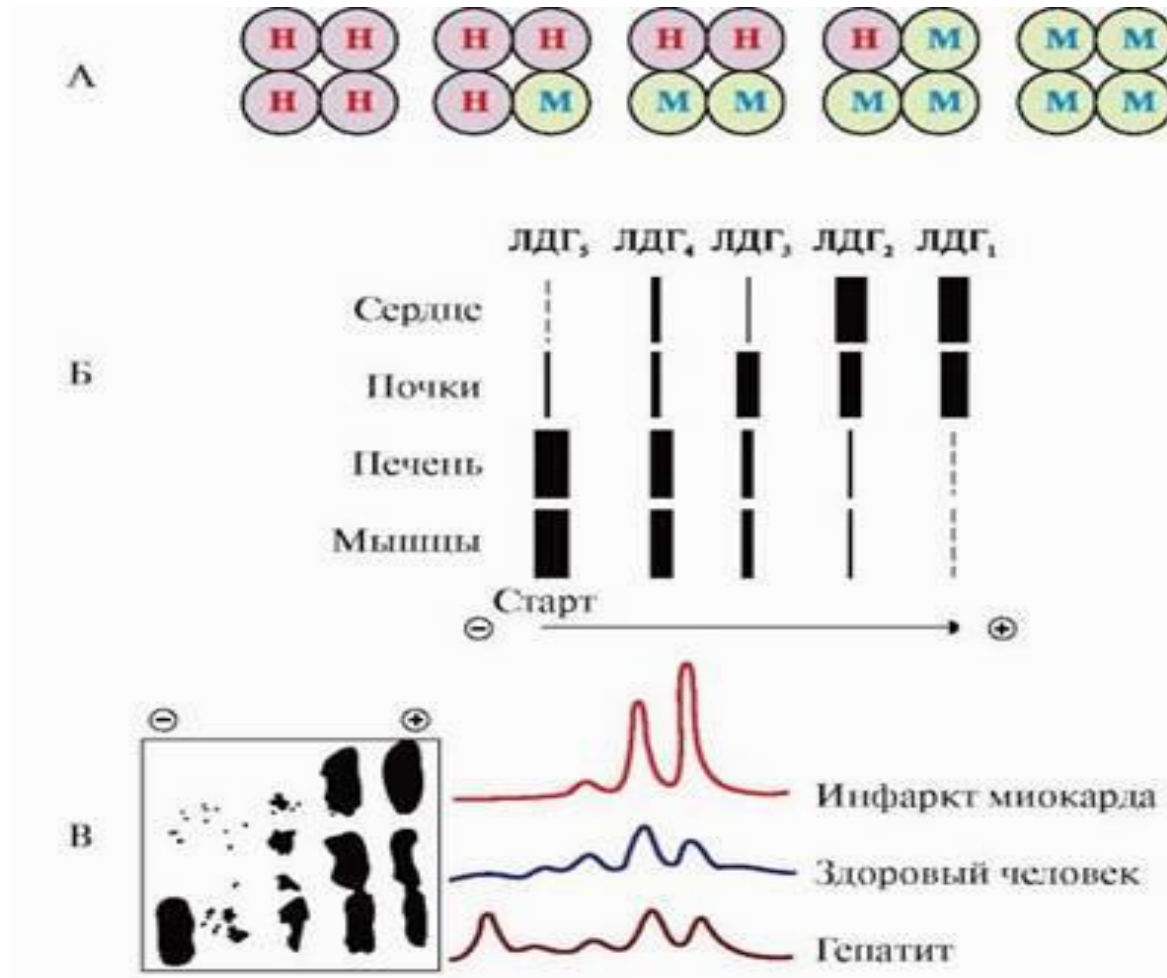
Изоферменты в диагностике

Определение изоферментов в сыворотке крови используется для:

- Определение **локализации** патологического процесса.
- Определение **степени поражения органа** или ткани.



Содержание изоформ ЛДГ в крови в норме и при патологии



Номенклатура ферментов

1. Рабочая номенклатура

- Субстрат + «-аза»
мальтоза + «-аза» = мальтаза
- Субстрат + тип реакции + «-аза»
лактат + дегидрирование + «-аза» =
лактатдегидрогеназа
- Тривиальное название
пепсин, тромбин, ренин

Номенклатура ферментов

2. Систематическая номенклатура

название по типу химической реакции по МКФ.

Субстрат 1 : субстрат 2 – тип реакции по МКФ + «-аза»

L-лактат: НАД^+ - оксидоредуктаза (ЛДГ)

Номенклатура ферментов

Шифр фермента по КФ – 4 числа



Шифр ЛДГ

Классификация ферментов

- КФ 1. Оксидоредуктазы: окислительно-восстановительные реакции (перенос H^+ , e^- , H).

Дегидрогеназы, оксидазы, цитохромы.

- КФ 2. Трансферазы: межмолекулярный перенос химических групп.

Амино-, метил-, фосфо-, ацилтрансферазы.

- КФ 3. Гидролазы: расщепление внутримолекулярных связей при участии молекул воды (гидролиз).

Пептидазы, гликозидазы, фосфатазы.

Классификация ферментов

- **КФ 4. Лиазы**: разрыв связей C-O, C-C, C-N без участия воды.

Декарбоксилазы, альдолазы, дегидратазы.

- **КФ 5. Изомеразы**: взаимопревращение оптических и геометрических изомеров.

Мутазы, эпимеразы, рацемазы.

- **КФ 6. Лигазы**: реакции синтеза с использованием АТФ.

Глутаминсинтетаза.

Определение активности фермента

- При оптимальных условиях температуры, рН среды и полном насыщении фермента субстратом скорость катализируемой реакции пропорциональна концентрации фермента.
- О скорости ферментативной реакции судят:
 - по скорости убыли субстрата
 - по скорости образования продукта реакции.

Единицы измерения активности ферментов

- Международная единица – это то количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение **1 мкмоль** субстрата за **1 минуту (мкмоль/мин)**.
- **КАТАЛ** – это то количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение **1 моля** субстрата за **1 секунду (моль/сек)**.

$$1 \text{ катал} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ}$$

$$1 \text{ МЕ} = 16,67 \text{ нкат}$$

Единицы измерения активности ферментов

- Удельная активность – равна числу **МЕ** ферментативной активности **на 1 мг** активного белка (или числу каталов на 1 кг активного белка).
- Молярная активность – число молекул **субстрата**, подвергающихся превращению 1 молекулой **фермента** за единицу времени.