

Ферменты 4

Содержание

1/Локализации ферментов в клетке, органоспецифические и маркерные ферменты

2.Качественное обнаружение и количественное определение активности. Единицы активности (МЕ, катал), удельная активность, число оборотов ферментов.

3. Сопряженные ферментные системе и их применение.

4. Номенклатура, классификация ферментов (тривиальная, рациональная, систематическая).
Принципы классификации ферментов

Локализация ферментов в клетке

- Все ферменты и метаболические процессы компартментализованы (разделены и изолированы).
- В нормальной клетке находится более 1000 ферментов.
- Упорядоченное взаимодействие ферментов достигается путем многоуровневой регуляции и компартментализации.
- Зная локализацию ферментов в клетке и определяя их активность в крови, можно судить о степени деструкции ткани.

- Ядро: локализованы РНК-полимеразы, НАД-синтетаза, ферменты, участвующие в репликации ДНК.
- Митохондрии: ферменты тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, ферменты β -окисления ЖК, цикла Кребса, пируватдегидрогеназного комплекса, синтеза мочевины.
- Лизосомы: гидролитические ферменты с оптимумом рН в области 5 (пептидазы, эстеразы, нуклеазы).

- Мультиферментные системы локализуются в структуре органелл таким образом, что каждый фермент располагается в непосредственной близости от следующего фермента данной последовательной реакции.
- Благодаря также компартментализации в клетке могут одновременно протекать 2 несовместимых процесса, например: β -окисление ЖК (в митохондриях) и синтез ЖК (в цитоплазме).

Органоспецифические ферменты:

- Под органоспецифичностью понимают наличие метаболических путей, присущих только данному органу.
- Так вот органоспецифические ферменты - это ферменты, катализирующие определенные метаболические пути, присущие определенному органу.
- Хотя органы и имеют различное выражение того или иного метаболического пути, они имеют важное значение для диагностики многих заболеваний, путем определения их активности:

- так для печени характерна высокая активность АсАТ, АлАТ, сорбитдегидрогеназы, ГДГ. Причем активность АлАТ выше, чем АсАТ, т. к. АсАТ лучше спрятана во внутриклеточных структурах

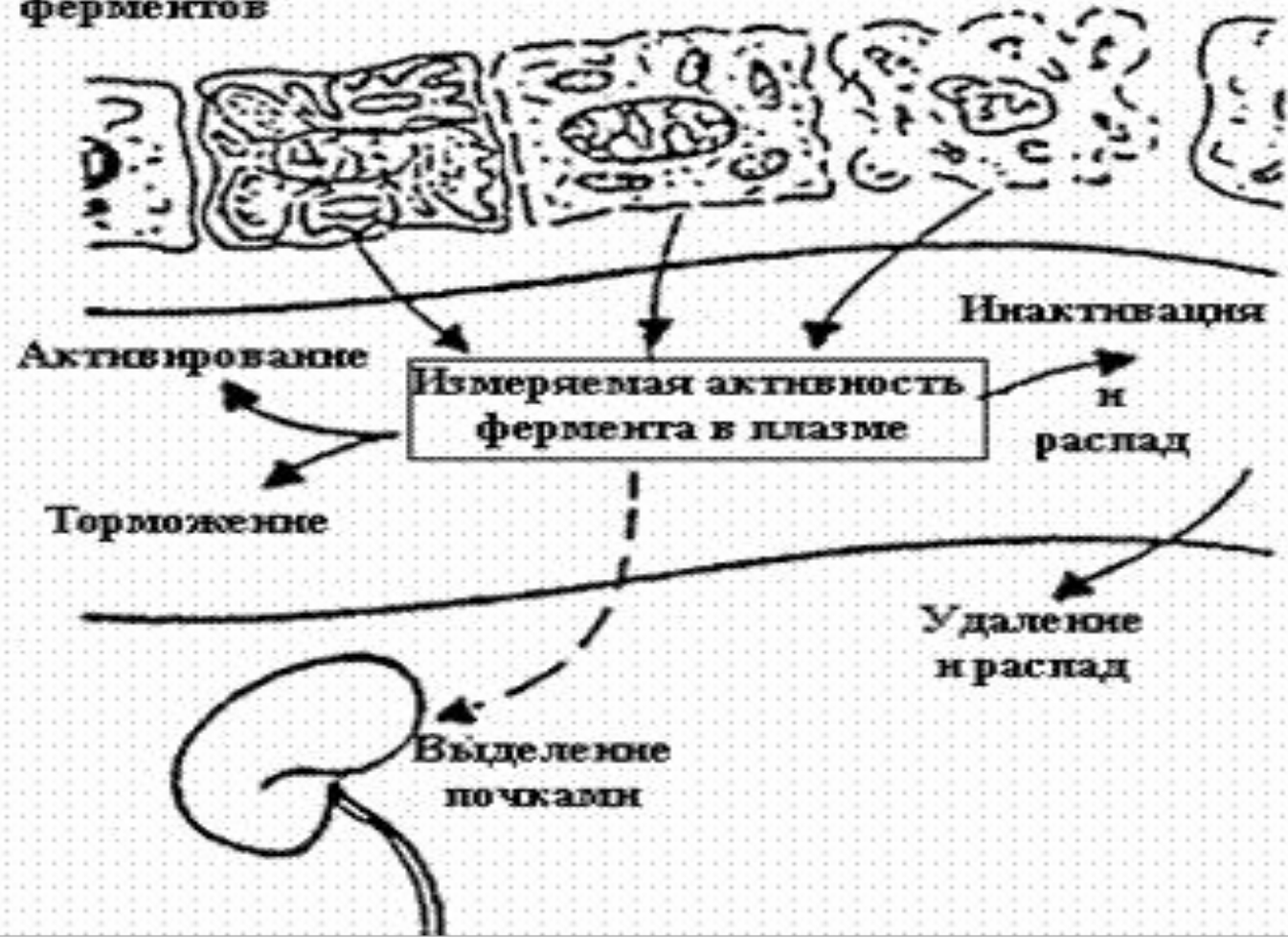
- Костная ткань - щелочная фосфатаза.
- Простата - кислая фосфатаза.
- Glandula parotis et pancreas - амилаза.
- Миокард - ЛДГ1 и ЛДГ2 , креатинкиназа (ММ и МВ-изоферменты).
- Мышцы - ЛДГ4,5; ММ.

- При нарушении целостности тканей этих органов, ферменты выделяются в сыворотку крови, где их активность резко повышается. В зависимости от того, активность какого фермента повысилась можно судить не только локализации каталитического процесса, но и о степени его тяжести

Клеточная пролиферация
или повышение синтеза
ферментов

Повышенная
проницаемость
мембран

Некроз
и лизис
клеток



Активирование

Измеряемая активность
фермента в плазме

Инактивация
и распад

Торможение

Удаление
и распад

Выделение
почками

- Но для более конкретной и точной диагностики заболеваний, для определения интенсивности и глубины повреждения

тканей нужны **Маркерные**

ферменты. Это ферменты, принадлежащие определенной конкретной органелле:

- сукцинатдегидрогеназа - внутренняя мембрана митохондрий;
- кислые гидролазы - лизосомы;
- ферменты гликолиза - цитоплазма и т. д.

Активность фермента

Активность - это изменение количества субстрата под влиянием фермента в единицу времени. Под изменением субстрата понимают снижающееся в единицу времени количество субстрата или же увеличивающееся количество продукта.

Понятие "активность фермента" по сути дела идентична понятию "скорость ферментативной" реакции.

Ферментативная активность выражается в единицах активности. В связи с существованием различных систем единиц исчисления введена **интернациональная (стандартная) единица активности**. Она носит символ "U" (unit-единица) и определяется как 1 мкмоль субстрата/мин. **В системе СИ** в качестве единицы

В системе СИ в качестве единицы ферментативной активности используют "катал" (kat). Катал определяется как 1 моль/сек.

$$\mathbf{1\text{kat} = 1\text{ моль/сек.}}$$

Размерность её слишком велика, на практике пользуются меньшими кратными значениями, начиная с нанокатала (нкат). Это одна миллиардная катала или 10^{-9} кат. В сравнении с международной единицей следующее уравнение

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ нкат}$$

В практике лабораторий широко пользуются понятием **удельная активность**. Для этого число стандартных единиц пересчитывают на какую-либо единицу сравнения. Это может быть мг белка в пробе или объем исследуемой биологической жидкости. Определение активности ферментов широко распространено в любой современной клинической лаборатории.

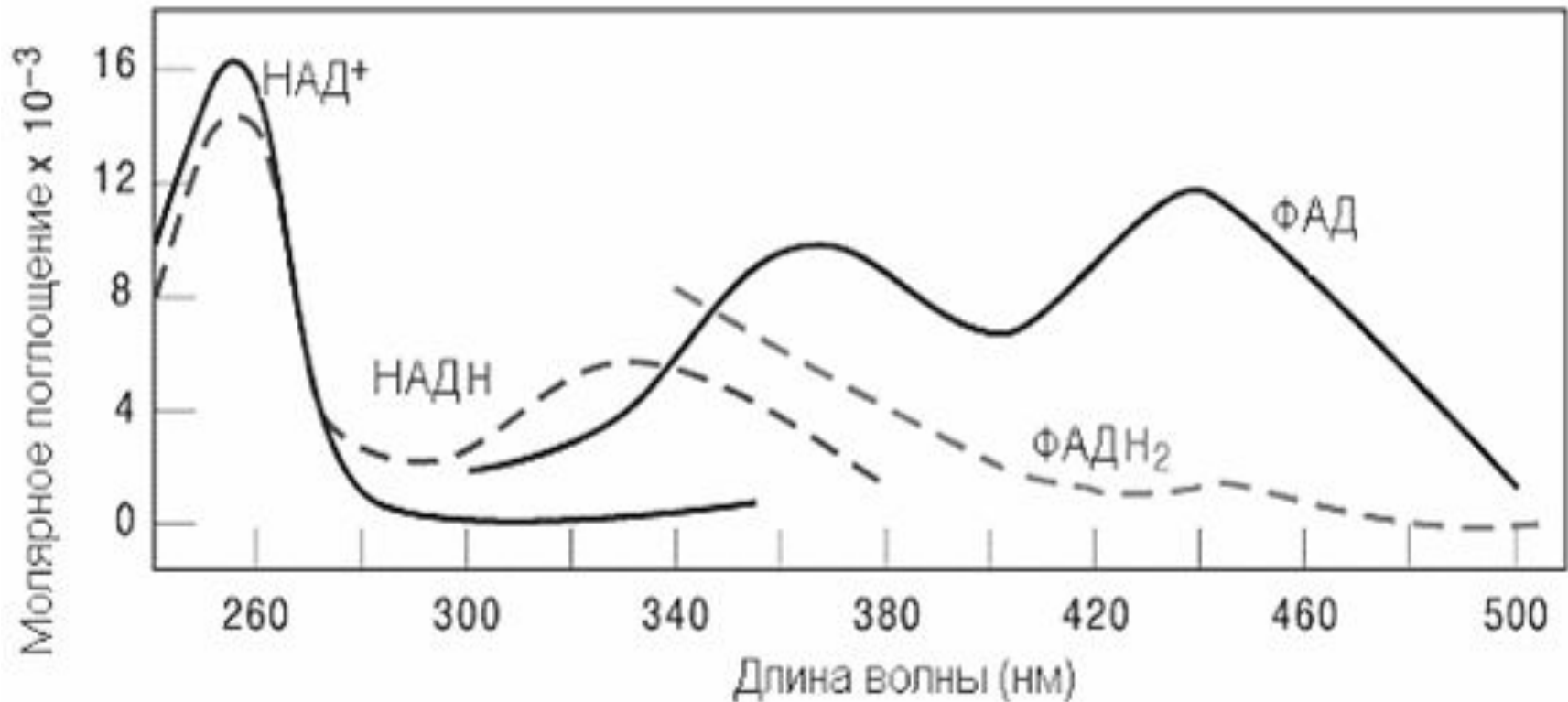
При исследовании кинетики реакций используется и такое понятие как **молекулярная активность**. Она показывает, сколько молекул субстрата в секунду превращаются в продукт 1 молекулой фермента и используется для сравнительной характеристики активности нескольких ферментов.

Методы исследования активности

- Эти методы применяют и для определения количества продуктов или субстратов реакции, и для изменений количества коферментов, участвующих в реакции. Последнее нашло широкое применение в практике клинических биохимических лабораторий. В основе этих методов лежит закон Beer-Lambert: $A = \epsilon \times c \times l = \log(I_0/I)$ (ϵ , поглощение 1 М раствора вещества при специфической длине волны или молярный коэффициент экстинкции; c , концентрация; A , поглощение; l , длина в см кюветы спектрофотометра; I_0 , интенсивность падающего света; I , интенсивность прошедшего света).

- В случае, если молярный коэффициент экстинкции (ϵ) исследуемого вещества неизвестен, исследователь определяет экспериментально зависимость между поглощением света исследуемого раствора и концентрацией этого вещества и использует полученную закономерность в форме стандартного (калибровочного) графика.

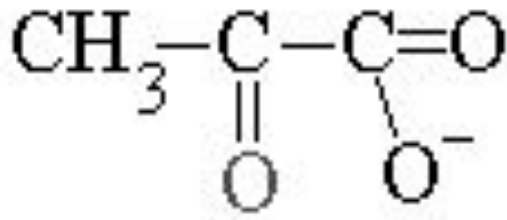
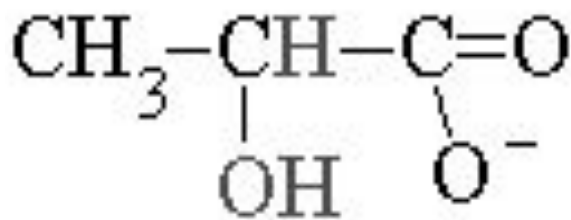
Молярное поглощение НАД⁺, НАДН⁺, ФАД, ФАДН₂



- 4 показаны спектральные характеристики коферментов НАД и ФАД в окисленной и восстановленной форме. Измерение поглощения при 340 нм используется для количественной оценки активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции с участием НАД. Вот пример такого расчета для реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой. В этой реакции молочная кислота окисляется, передавая водороды на НАД⁺. При этом НАД⁺ восстанавливается до НАДН + Н⁺., который в отличие от НАД⁺ поглощает свет с длиной волны 340 нм.

- Допустим, за время проведения реакции поглощение при длине волны 340 нм изменялось на 0.31 единицы в минуту. Измерения проводили в кювете шириной 1 см. Коэффициент молярной экстинкции для НАДН при 340 нм $\epsilon = 6200 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

дегидрогеназа молочной кислоты



Классификация ферментов

- В настоящее время известны и используются 3 вида классификации ферментов:
- 1. Тривиальная (исторически сложившаяся) номенклатура: (пепсин, трипсин).
- 2. Рациональная предложена французским физиологом П. Дюкло в 1883 году (к корню названия субстрата прибавляется суффикс
 - - аза (липид - липаза, протеин - протеаза и т.д.).
- 3. Современная классификация рассмотрена и утверждена V Всемирным биохимическим конгрессом в г. Москве в 1961 г. В основу ее положен тип катализируемой реакции (всего 6 классов):

- 1) Оксидоредуктазы: катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Название дается по схеме: донор: « акцептор-оксидоредуктаза» ---> лактат: НАД-оксидоредуктаза.
- Различают аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (e) непосредственно на кислород; анаэробные дегидрогеназы ускоряющие перенос протонов (e) на промежуточный S, но не на кислород; цитохромы - катализируют перенос только e. Сюда также относятся каталаза и пероксидаза.

- 2) Трансферазы: ферменты, катализирующие перенос (внутри- и межмолекулярный) различных групп атомов. Название дается по форме: «донор - транспортируемая группа - трансфераза ---> метил-, формилтрансферазы, аминотрансферазы.
- Оба этих класса ферментов работают при участии коферментов, которые являются водорастворимыми витаминами: В6, В12, В1, В15.

- 3) Гидролазы: ферменты, катализирующие расщепление внутримолекулярных связей при участии молекулы воды.
- Название: «субстрат-гидролаза». К ним относятся все ферменты ЖКТ; в частности: эстеразы - гидролиз сложных эфиров; гликозидазы - гидролиз гликозидных связей углеводов; пептидгидролазы - гидролиз пептидных связей.

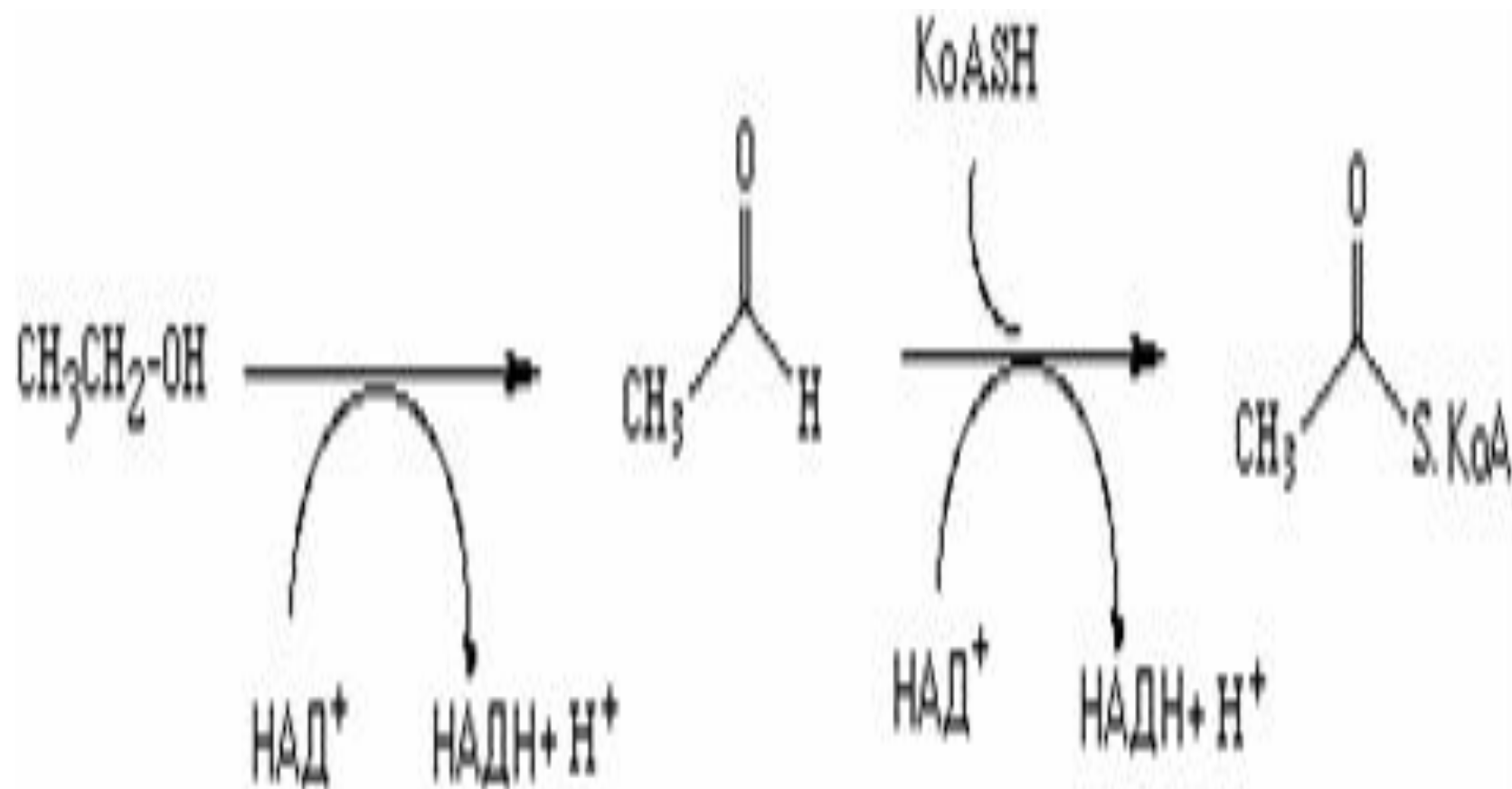
- 4) Лиазы - ферменты, расщепляющие C-C, C-N, C-O связи не гидролитическим путем с образованием двойной связи. Название: «субстрат-лиаза». Они обеспечивают отщепление CO₂, H₂O, NH₃. Декарбоксилазы.
- 5) Изомеразы: ферменты, катализирующие различные типы реакций изомеризации. Сюда относятся рацемазы и эпимеразы.

- 6) Лигаза (синтетаза) - ферменты, катализирующие синтез органических веществ из 2-х исходных молекул с использованием энергии АТФ. Название: «Х-У-лигаза». Х и У - исходные вещества. Например: глутамат-аммиак-лигаза.
- Кроме всего этого все существующие ферменты (более 2000) имеют свой цифровой шифр, который присваивается по 4-х значному коду. Т. о. шифр каждого фермента состоит из 4-х цифр, разделенных точками и составляется по следующему принципу.

- Первая цифра указывает на номер одного из классов ферментов.
- Вторая цифра означает подкласс, который характеризует тип связи, на которую действует фермент.
- Третья цифра означает подподкласс, который характеризует химическую природу донора или акцептора, участвующего в реакции.
- Четвертая цифра обозначает порядковый номер фермента.
- Алкогольдегидрогеназа (АДГ); КФ: 1. 1. 1. 1.
- Лактатдегидрогеназа (ЛДГ); КФ: 1. 1. 1. 27.

- **В основе классификации ферментов - тип катализируемой реакции**

- **Оксидоредуктазы** - ферменты, которые катализируют реакции восстановления или окисления. Например алкогольдегидрогеназа, фермент, который окисляет этиловый спирт в уксусный альдегид. Второй фермент, известный как альдегиддегидрогеназа затем преобразовывает уксусный альдегид в ацетил КоА. Оксидоредуктазы часто требуют участия кофакторов, выполняющих роль промежуточных акцепторов водорода в приводимом ниже примере это НАД⁺.



- Различают аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (e) непосредственно на кислород; анаэробные дегидрогеназы ускоряющие перенос протонов (e) на промежуточный S, но не на кислород; цитохромы - катализируют перенос только e. Сюда также относятся каталаза и пероксидаза.

- **Оксидоредуктазы (1.0.0.0.)**
- 1.1.0.0. Действуют на СН-ОН группы доноров
- 1.1.1.0. НАД+ или НАДФ+ в качестве акцепторов
- 1.1.1.1. Алкогольдегидрогеназа
- 1.14.0.0. Действуют на парные доноры при включении в один из них кислорода
- 1.14.15.0. Один из доноров восстановленный железо-серный белок и
- включение одного атома кислорода
- 1.14.15.1. Цитохром Р-450
- 1.14.15.5. Кортикостерон 18-монооксигеназа

Трансферазы:

- ферменты, катализирующие перенос (внутри- и межмолекулярный) различных групп атомов. Название дается по форме: «донор - транспортируемая группа - трансфераза ---> метил-, формилтрансферазы, аминотрансферазы.
- Оба этих класса ферментов работают при участии коферментов, которые являются водорастворимыми витаминами: В6, В12, В1, В15.

- **Трансферазы (2.0.0.0.)**
- 2.1.0.0. Переносят одноуглеродные группы
 - 2.1.1.0. Метилтрансферазы
 - 2.1.1.1. Никотинамид метилтрансфераза
 - 2.1.1.45. Тимидилат синтаза
- 2.3.0.0. Ацилтрансферазы
 - 2.3.1.6. холинацетил трансфераза

Гидролазы:

- **Гидролазы:** ферменты, катализирующие расщепление внутримолекулярных связей при участии молекулы воды.
- **Название:** «субстрат-гидролаза». К ним относятся все ферменты ЖКТ; в частности: эстеразы - гидролиз сложных эфиров; гликозидазы - гидролиз гликозидных связей углеводов; пептидгидролазы - гидролиз пептидных связей.

- **Гидролазы (3.0.0.0.)**
- 3.1.0.0. Действуют на эфирные связи
 - 3.1.1.0. Гидролазы эфиров карбоновых кислот
 - 3.1.1.17. Ацетилхолинэстераза
 - 3.2.1.0. Гликозидгидролазы
 - 3.2.1.1. α -амилаза
 - 3.2.1.2. β -амилаза
- 3.4.0.0. Действуют на пептидные связи
 - 3.4.21.0. Сериновые протеазы
 - 3.4.21.1. Химотрипсин
 - 3.4.21.4. Трипсин
 - 3.4.21.5. Тромбин

- **Лиазы (десмолазы)** – ферменты, которые катализируют распад С-С, С-О и С-N связями негидролитическим путем с образованием двойных связей. Примером может быть фермент ДОФА декарбоксилаза, которая является ключевым ферментом в синтезе биогенных аминов адреналина и норадреналина.

- **Лиазы**(4.0.0.0)4.1.0.0.Углерод-углерод
лиазы 4.1.1.0.Карбокси лиазы
4.1.1.1. Пируватдекарбоксилаза 4.2.0.0.
Углерод-кислород-лиазы
4.2.1.0. Гидролиазы
4.2.1.11. Енолаза
4.2.1.12. Фосфоглюконатдегидраза

- **Изомеразы:** ферменты, катализирующие различные типы реакций изомеризации. Сюда относятся рацемазы и эпимеразы.

- Изомеразы (5.0.0.0.)5.1.0.0. Рацемазы и эпимеразы 5.1.1.0. Действуют на аминокислоты и их производные
 - 5.1.1.1. Аланинрацемаза 5.3.0.0.
- Внутримолекулярные оксидоредуктазы.
 - 5.3.1.0. Взаимопревращают альдозы и кетозы 5.3.1.9.
 - Фосфоглюкоизомераза
 - 5.3.1.20. Рибозоизомераза

- **6) Лигазы (синтетазы)** - ферменты, катализирующие синтез органических веществ из 2-х исходных молекул с использованием энергии АТФ.
Название: «X-Y-лигаза». X и Y - исходные вещества. Например: глутамат-аммиак-лигаза.

- Лигазы (6.0.0.0)6.1.0.0. Образуют С-О связи
 - 6.1.1.0. Образуют молекулы аминокцил-тРНК и родственные им соединения.
 - 6.1.1.1. Тирозил-тРНК синтаза
 - 6.5.0.0. Образуют фосфоэфирные связи
 - 6.5.1.1. ДНК-лигаза (АТФ -зависимая)
 - 6.5.1.2. ДНК-лигаза (НАД⁺-зависимая)

