

Биохимия ферментов

1

Гомельский государственный
медицинский университет
Кафедра биохимии

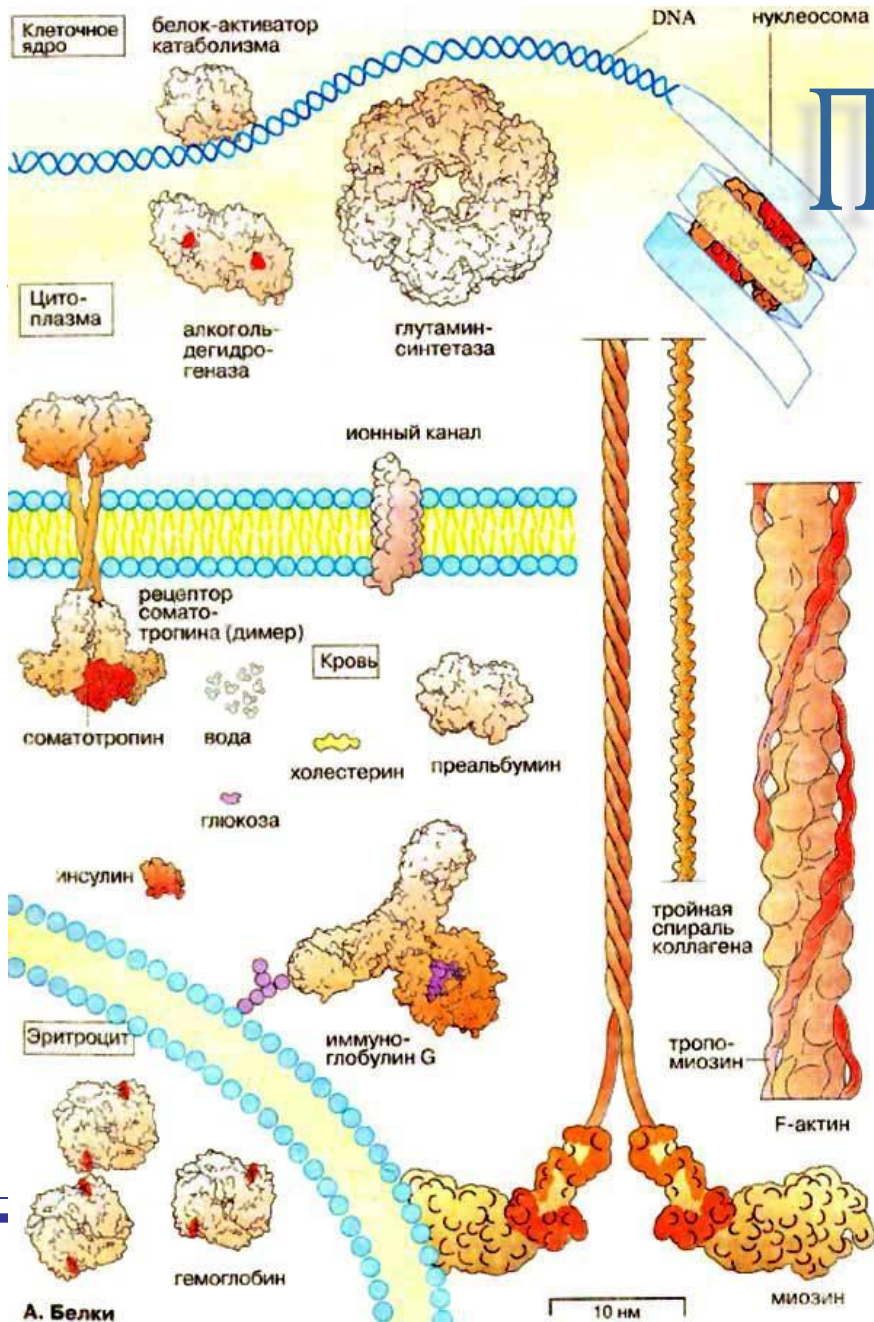
Содержание

1. Строение, размер и форма белковой молекулы, функции белков.
2. Денатурация, причины и признаки, использование в медицине.
3. Ферменты. История энзимологии.
4. Доказательства белковой природы ферментов.
5. Особенности ферментативного катализа.
6. Структурно-функциональная организация ферментов.
7. Аллостерические ферменты.

Пептиды и белки: общие сведения

- Белки
 - При соединении аминокислот в цепочку образуется линейная макромолекула белка.
- В любом живом организме содержатся тысячи белков, выполняющих разнообразные функции.

Примеры белков



Чтобы дать представление о многообразии белков, на схеме приведен общий вид молекул (с соблюдением формы и размера) ряда вне- и внутриклеточных белков.

Ферменты

- **Ферменты** (от лат. *fermentum* - закваска), или **ЭНЗИМЫ** (от греч. *en* - внутри, *zym* - закваска) – биокатализаторы белковой природы.
- Используются живыми организмами для катализа многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение веществ и др.

Ферменты являются биокатализаторами

- Ускоряют химические реакции
- Составляют функциональный аппарат клетки, являясь функциональными единицами клеточного метаболизма.

История энзимологии

- На заре истории развития человечества, уже использовались ряд технологических ферментативных процессов: хлебопечение, виноделие, обработка шкур животных и т. д.
- Описал пищеварения у животных **Рене Антуан Реомюр** (1683—1757).
- **Лаззаро Спалланцани** (1729-1799), профессор истории естествознания в Университете города Падуя, не рассматривал пищеварение как процесс ферментации по той простой причине, что при этом не образовывались пузырьки газа.

История энзимологии (прод.)

- Позже процесс ферментации был более подробно изучен одним из основоположников современной химии **Антуаном Лораном Лавуазье** (1743-1794).
 - Изучая спиртовое брожение, происходящее при изготовлении вина, он обнаружил, что глюкоза превращается в спирт и углекислый газ,
- К началу XIX в. преобладала общая точка зрения, что ферментация - это химические изменения, вызываемые некоторыми специальными формами органического материала, а именно «ферментами».

История энзимологии (прод.)

- В 1814 г. русский ученый (немец по происхождению) академик Петербургской Академии наук Константин Готлиб Сигизмунд **Кирхгоф** (1764-1833) показал, что образование сахара из крахмала в проросших зернах злаков обусловлено химическим процессом, а не появлением ростков.
- В 1810 г **Ю. Гей-Люссак** выделил основные конечные продукты жизнедеятельности дрожжей – спирт и углекислый газ.
- **Я. Берцелиус**, один из основоположников теории химического катализа и автор самого термина «катализ» в 1835 году подтверждает эти данные, отметив, что диастаза (экстракт из солода) катализирует гидролиз крахмала более эффективно, чем минеральная серная кислота.

История энзимологии (прод.)

- Либих и Вёлер открыли **эмульсин**, расщепляющий **амигдалин** горького миндаля.
- Опыты Л. Пастера с кипяченными экстрактами дрожжей.

История энзимологии. Спор Либиха и Пастера

- Важную роль в развитии энзимологии сыграл спор **Ю Либиха** с известным микробиологом **Л. Пастером**, который считал, что процессы ферментации могут происходить только в целой живой клетке.
 - **Ю. Либих**, напротив, считал, что биологические процессы вызываются действием химических веществ, которые в последствии были названы *ферментами*.
 - Термин *энзим* предложил 1878 г **Фридрих Вильгельм Кюне**, подчеркнув, что процесс идет в *дрожжах*.

История энзимологии (прод.)

- В 1878 г. **Манассеина** получила бесклеточный препарат дрожжей, перетирая их в ступке со стеклянным порошком. Этот экстракт был способен получать этанол, что утвердило мнение Либиха.
- В 1897 году **Э. Бюхнер** повторил этот эксперимент, получив свободный от клеток экстракт из дрожжей, разрушая их вакуумированием.

История энзимологии (прод.)

- В 1894 году **Э. Фишер** предложил модель взаимодействия фермента и субстрата, названной «ключ-замок».
- В 1926 году **Дж. Самнер** после почти 9-летних исследований доказал белковую природу фермента уреазы.
- Вскоре **Дж Нортроп** и **М Кунитц** указали на прямую корреляцию между активностью кристаллических пепсина, трипсина и количеством белка в исследуемых образцах, приведя тем самым весомые доказательства белковой природы ферментов.
- 1955 г. – **С. Мур** и **У. Стейн** расшифровали структуру рибонуклеазы (124 АК остатка).

История энзимологии (прод.)

- В 1963 году исследована аминокислотная последовательность *РНказы* из поджелудочной железы.
- В 1965 г показана пространственная структура *лизоцима*.
- 1969 г. – синтез рибонуклеазы в лаборатории **Б. Меррифилда** в Нью-Йорке.
- За последующие годы очищены тысячи ферментов и получены новые данные о механизмах действия ферментов, их пространственной структуре, регуляции ферментативных реакций.
 - Обнаружена каталитическая активность у РНК (*рибозимы*).
 - Получены антитела с ферментативной активностью – *абзимы*.

Доказательства белковой природы ферментов

- Все ферменты **действуют в мягких условиях**: $\text{const } t^\circ$, const pH , const ионная сила, оптимальное соотношение субстратов, продуктов, модуляторов.
- Все ферменты являются **высокомолекулярными соединениями** (ВМС), с молекулярной массой от неск. тысяч до неск. миллионов дальтон (1 дальтон = массе одного атома водорода), в связи с чем, образуют **коллоидные растворы**, которые обладают **буферными свойствами, вязкостью, дают опалесценцию, образуют конус Тиндаля**.
- Способны к **денатурации** под действием тех же факторов, которые вызывают денатурацию белка. При необратимой денатурации ферменты полностью инактивируются.
- При гидролизе **распадаются на аминокислоты**.
- Обладают «**эффектом защиты**» (связывают воду, ионы тяжелых металлов).

Доказательства белковой природы ферментов (прод.)

- Ферменты как и белки обладают **антигенной активностью** и при парэнтеральном введении стимулируют образование антител.
- Обладают **электрофоретической подвижностью** и **амфотерными свойствами**.
- **Не способны к диализу** через полупроницаемые мембраны.
- Легко **осаждаются** из водных растворов **методом высаливания**.
- Обладает **высокой специфичностью** действия.
- **Лабораторный синтез фермента рибонуклеазы**, доказывает его белковую природу (в лаборатории Меририлда в 1969 году).

Особенности ферментативного катализа

- **Исключительно высокая эффективность.**
 - Эффективность биологического катализа превышает эффективность неорганического в $10^9 - 10^{12}$ раз.
- **Специфичность:**
 - **Абсолютная специфичность**, когда фермент работает только со своим субстратом (*фумараза* с транс-изомерами фумаровой кислоты и не будет с цис-изомерами);
 - **Групповая** - специфичен для узкой группы родственных субстратов (ферменты ЖКТ).
- Ферменты «работают» в **мягких условиях** ($t=37^\circ\text{C}$, pH 7,0, определенная осмолярность и солевой состав).
- **Многоуровневая регуляция**: регуляция активности на уровне условий среды, на уровне метаболизма, на генетическом уровне, тканевом, клеточном, с помощью гормонов и медиаторов, а также с помощью субстратов и продуктов той реакции, которую они катализируют.

Особенности ферментативного катализа (прод.)

- **Кооперативность:** ферменты способны организовывать ассоциации - продукт 1-го фермента, является субстратом для 2-го; продукт 2-го - субстратом для 3-го и т.д.
- Ферменты обладают **адаптивностью**, т. е. могут изменять свою активность и образовывать новые ассоциации.
- Способны катализировать как прямую так и обратную реакцию. Направление реакции для многих ферментов определяется соотношением действующих масс.
- Катализ жестко расписан, т. е. происходит **поэтапно**.
- Если какое-либо соединение существует в форме цис- и трансизомеров, то для каждой из этих форм, существует свой фермент.
 - Например, фумараза катализирует превращение только фумаровой кислоты (транс-), но не действует на цис-изомер - малеиновую кислоту.

Строение ферментов

- Ферменты как и белки делятся на две группы: простые и сложные.
 - **Простые** полностью и целиком состоят из а/к и при гидролизе образуют исключительно а/к.
 - **Сложные** ферменты кроме белковой части (**апофермента**) содержат и небелковый компонент (**кофактор**).
 - Кофакторы различаются по прочности связывания с апоферментом.

Кофакторы

- Если константа диссоциации сложного фермента настолько мала, что в растворе все ПП цепи оказываются связанными со своими небелковыми компонентами и не разделяются при выделении и очистке, то небелковый компонент называется **простетической группой** и рассматривается как интегральная часть молекулы фермента.
- Под **коферментом** понимают дополнительную группу, легко отделяемую от апофермента, при диссоциации.

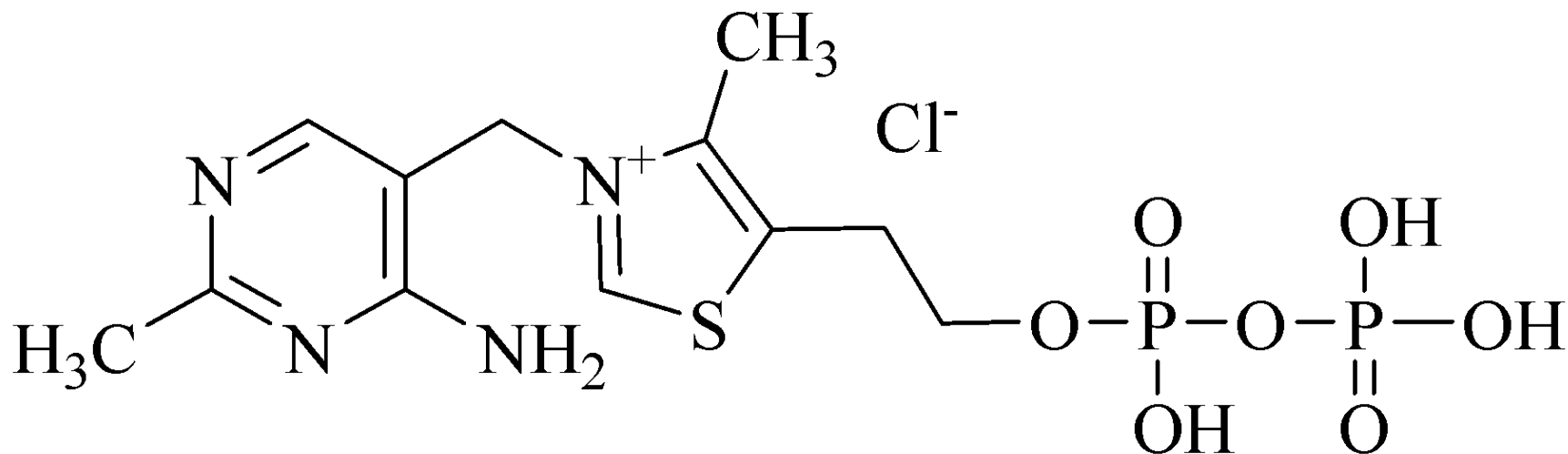
Примеры коферментов

- Между апоферментом и коферментом существуют нековалентные связи (водородные или электростатического взаимодействия).
- Типичными представителями коферментов являются:
 - **Тиаминпирофосфат**, ТПФ (производное витамина В₁, тиамин) – кофермент пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов;
 - **ФАД, ФМН** (производные витамина В₂, рибофлавин) – коферменты ряда дегидрогеназ, напр. сукцинатдегидрогеназы;
 - **НАД, НАДФ** (производные витамина РР, ниацин) коферменты ряда дегидрогеназ, напр. лактатдегидрогеназы;
 - **Пиридоксальфосфат** (производное витамина В₆, пиридоксин) – кофермент трансаминаз, напр. аспартатаминотрансфераза (АсАТ), аланинаминотрансфераза (АлАТ);
 - **коэнзим А** (производное пантотеновой кислоты) – кофермент ацилирования.

Простетическая группа

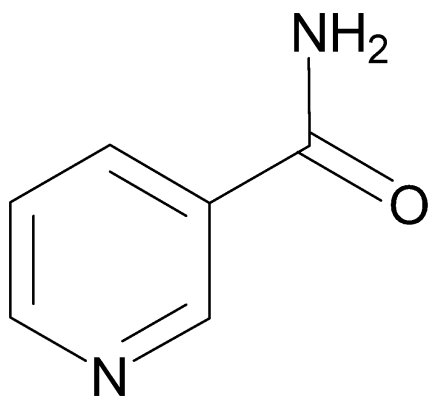
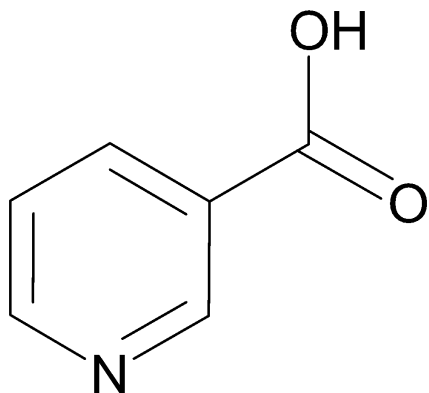
- Примером **простетической группы** является витамин Н (биотин)
 - биотин связан с апоферментом ковалентно через остаток лизина.
 - Является кофактором ферментов осуществляющих карбоксилирование, напр. пируваткарбоксилаза.

Тиаминпирофосфат, ТПФ



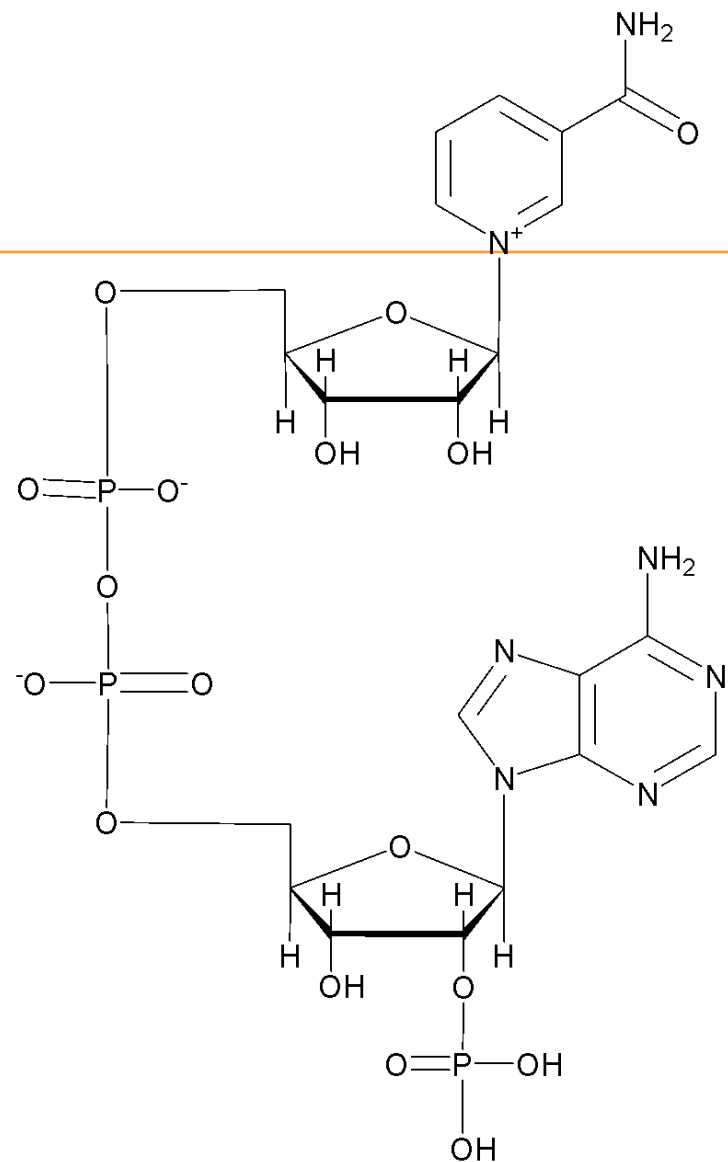
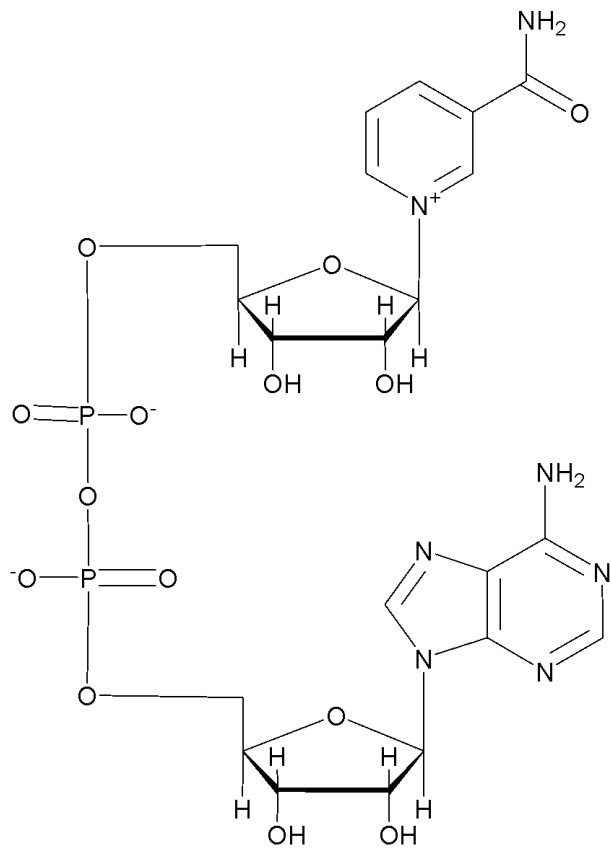
Тиаминпирофосфат, ТПФ (производное витамина В₁, тиамин) – кофермент пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов;

Витамин РР



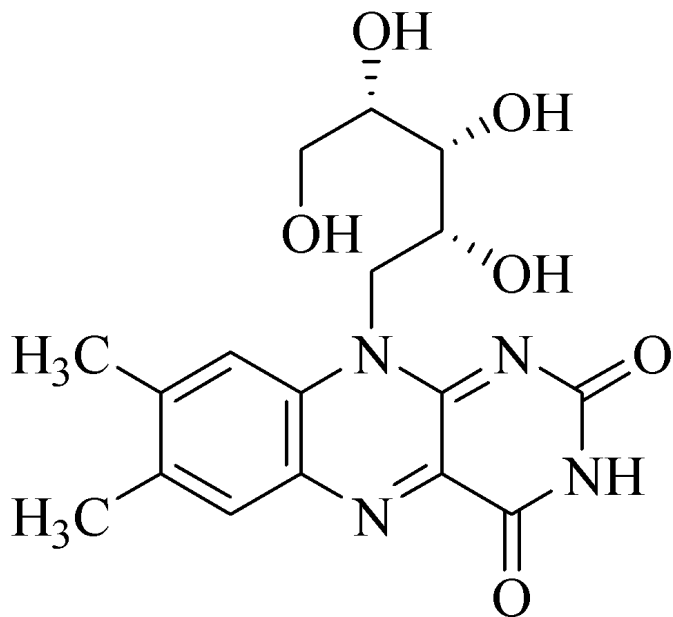
- **Витамин РР** (никотиновая кислота, ниацин) в форме **никотинамида** входит в состав NAD^+ и $NADP^+$, которые являются коферментами $NAD(P)$ -зависимых (пиридиновых) дегидрогеназ.

Строение NAD^+ и NADP^+



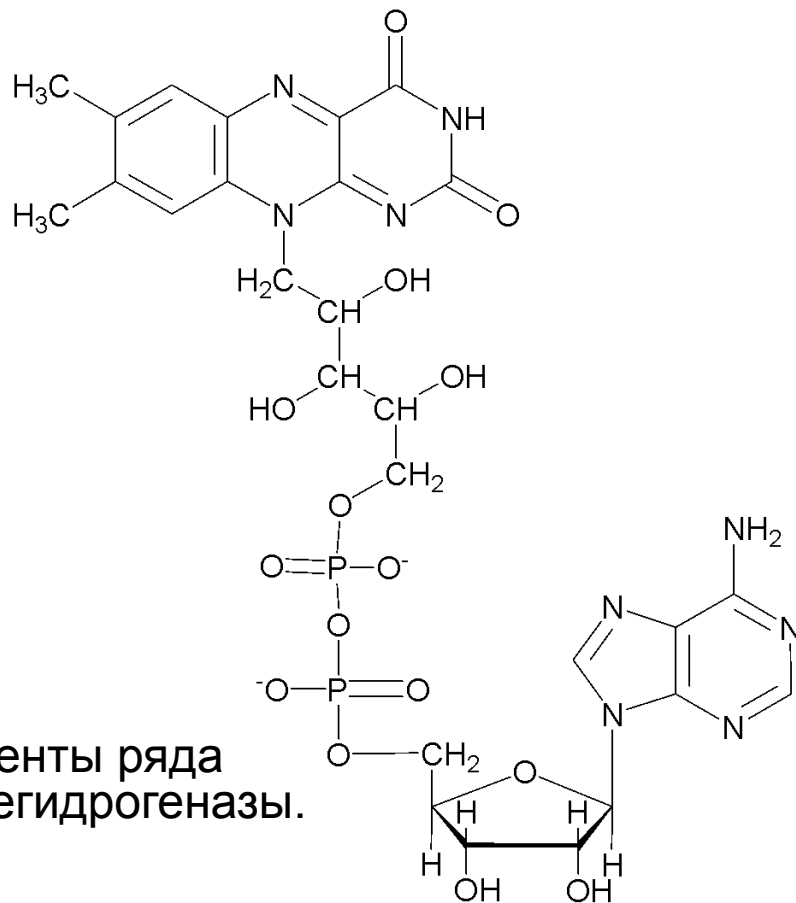
Рибофлавин, витамин В₂.

Строение ФАД

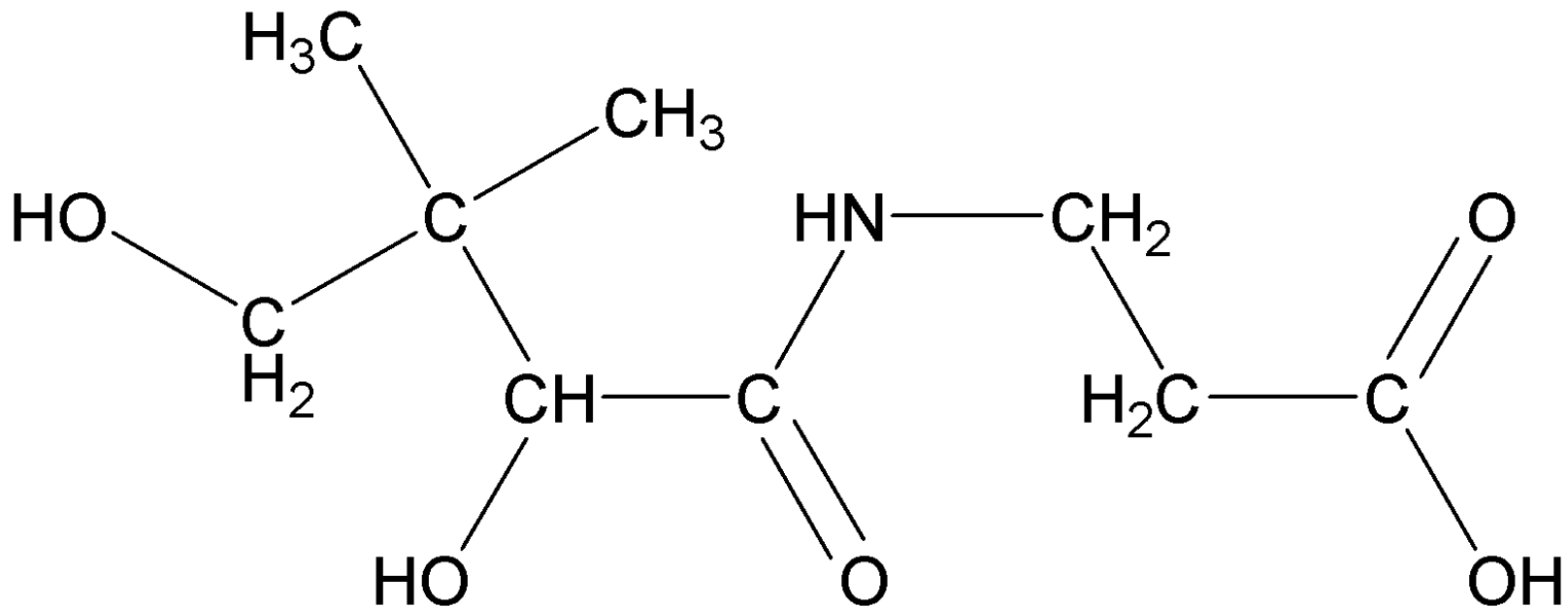


Рибофлавин

Образует ФАД и ФМН – коферменты ряда дегидрогеназ, напр. сукцинатдегидрогеназы.



Пантотеновая кислота



- **Пантотеновая кислота** – входит в состав *коэнзима А* (кофермента ацилирования).

Металлы как кофакторы

- Многие двухвалентные металлы (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) тоже выполняют роль кофакторов, хотя и не относятся ни к простетическим группам, ни к коферментам.
- Металлы входят в состав активного центра или стабилизируют оптимальный вариант структуры активного центра фермента.

Металлы как кофакторы (прод.)

Металл	Фермент
Fe^{2+} , Fe^{3+}	гемоглобин, каталаза, пероксидаза
Cu^+ , Cu^{2+}	цитохромоксидаза
Zn^{2+}	ДНК-полимераза, алкогольдегидрогеназа
Mg^{2+}	гексокиназа
Mn^{2+}	аргиназа
Ni^{2+}	уреаза
Se^{2+}	глутатионредуктаза

Структурно-функциональная организация ферментов.

Активный центр

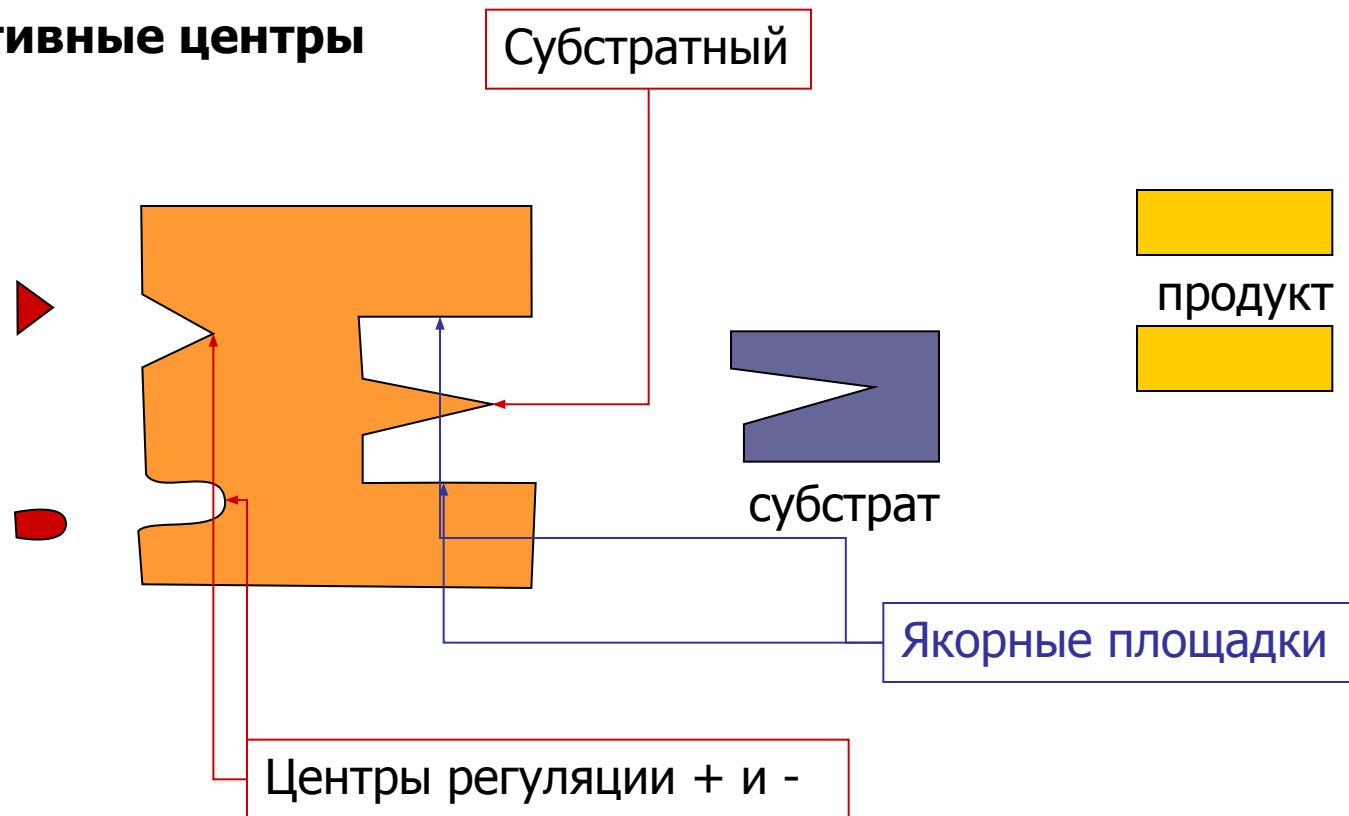
- **Активный (субстратный) центр** - это совокупность функциональных групп, расположенных в разных участках ПП цепи, но близко структурно и функционально ориентированных (в третичной структуре) и имеющих прямое отношение к катализу.
- Этот центр состоит из функциональных групп и радикалов: SH-(цистеина); -ОН(серина); COOH-(АСП); имидазольного кольца гистидина.

Структурно-функциональная организация ферментов. Строение активного центра фермента

- **Активный центр** включает в себя:
 1. **Каталитический участок** или центр, непосредственно взаимодействующий с субстратом, осуществляющий катализ.
 2. **Контактная, или якорная площадка** - она обеспечивает специфическое сродство фермента к субстрату и является местом фиксации субстрата на поверхности фермента.
 3. **Вспомогательные участки** - карманы, щели и др.

Структурно-функциональная организация ферментов. Схема

Активные центры



Формирование активного центра фермента

- Предполагается, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка-фермента на рибосоме, когда линейная одномерная структура ПП цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации, точнее активный центр формируется из функциональных групп различных аминокислот (т.е. активный центр определяется первичной структурой).

Центры аллостерической регуляции

- У олигомерных ферментов (имеющих четвертичную структуру) имеются центры **аллостерической регуляции**.
 - это участки связывания фермента с низкомолекулярным веществом (**эфффектором или модификатором**), имеющим другую, чем субстрат или продукт, структуру: АТФ, АДФ, НАД⁺, промежуточные метаболиты.

Аллостерические ферменты

- Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной структуры и, соответственно, конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности.
 - В связи с этим существует и два пространственно удаленных аллостерических центра: **активации** и **ингибирования**.
- Ферменты, активность которых контролируется состоянием как активного, так и аллостерического центров, называются аллостерическими ферментами.

Спасибо за внимание!

- Следующая лекция – Биохимия ферментов-2.
 - Механизм действия ферментов. Этапы ферментативного катализа.
 - Факторы, определяющие активность ферментов $[E]$, $[S]$, $[P]$, K_m . Влияние pH , $[P]$, t° , ионной силы на активность ферментов.
 - Регуляция активности ферментов.

Кинетика ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций

