

Тема: ФЕРМЕНТЫ (ЭНЗИМЫ)

План

- 1. Понятие о ферментах. Строение и свойства ферментов.**
- 2. Механизм действия ферментов. Теории Фишера и Кошланда.**
- 3. Специфичность действия ферментов.**
- 4. Факторы, влияющие на активность ферментов.**
- 5. Аллостерические ферменты. Аллостерическая регуляция.**
- 6. Ингибиторы. Типы аллостерического ингибирования.**
- 7. Номенклатура и классификация ферментов.**
- 8. Оксидоредуктазы. Трансферазы. Гидролазы. Лигазы, лиазы, изомеразы.**
- 9. Коферменты. Классификация.**
- 10. Единицы измерения количества и активности ферментов.**
- 11. Применение ферментов в медицине.**
- 12. Изоферментные формы, их применение в диагностике.**
- 13. Энзимотерапия.**

Понятие о ферментах

Fermentum — «закваска»
Enzyme — «в дрожжах»

Как вытекает из происхождения названий этих веществ, первые сведения об их существовании были получены при изучении процессов брожения

Ферменты являются биологическими катализаторами белковой природы.

Действие ферментов заключается:

- в активации молекул реагирующих веществ,
- в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.

Ферменты

специфические биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие протекание химических реакций в клетке.

1. Высокая каталитическая активность

Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в разы быстрее ($10^8 - 10^{14}$), чем не катализируемые.

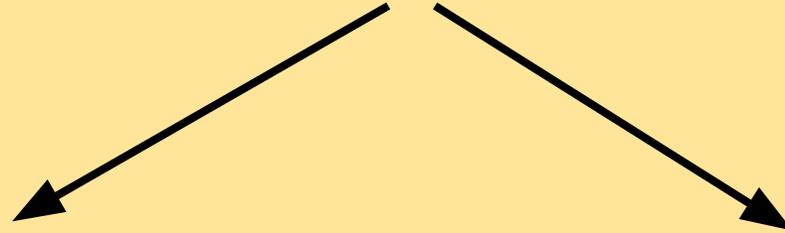
2. Высокая специфическая активность

Ферменты характеризуются высокой специфичностью как в отношении субстратов, т.е. участвующих в реакции веществ, так и катализируемых ими реакций.

- Абсолютная
- Относительная
- Стереохимическая



Ферменты



Однокомпонентные

**(только
аминокислоты)**

Двухкомпонентные



Апофермент (ак)

Кофактор



**Простетическая
Кофермент
группа (Me^{**})**

(Vit B)

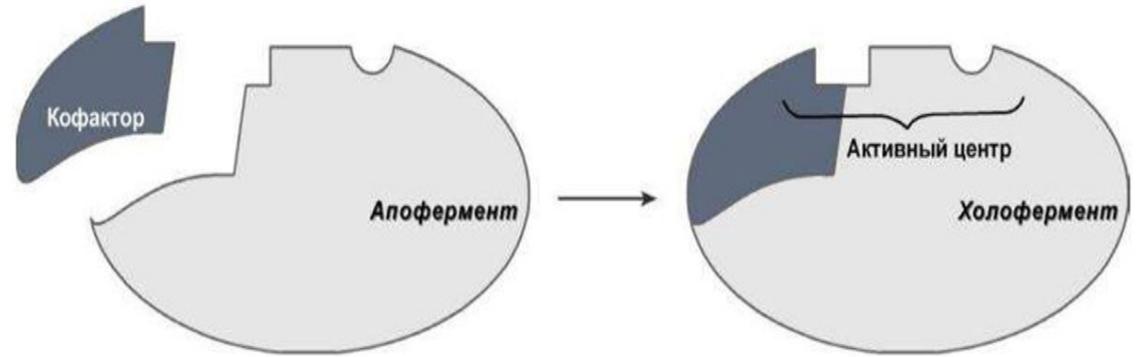
СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ

Простые ферменты – однокомпонентные, состоят только из полипептидной части;

Сложные ферменты (холофермент) – двухкомпонентные, кроме полипептида (апофермента) содержат дополнительный компонент небелковой природы (кофактор).

Область фермента, в которой происходит связывание и превращение субстрата, называется **активным центром**.

Схема формирования сложного фермента



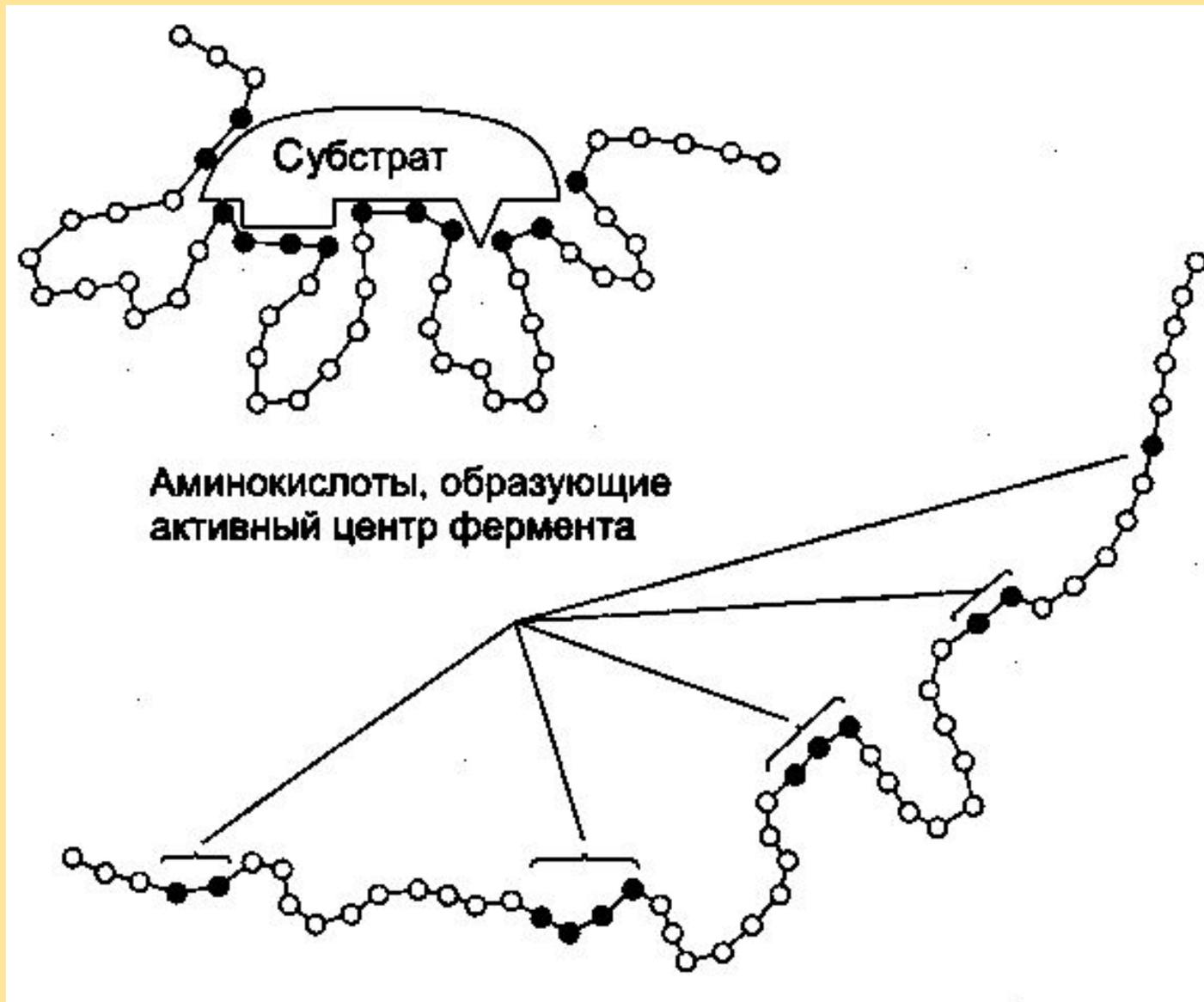
Кофактор + апофермент = холофермент
holo – весь, целый

Кофактор м.б. прочно связан с белком (**протетическая группа**), или образовывать легко диссоциирующие комплексы (**кофермент**).

Строение активного центра фермента



Активный центр фермента



Структурная организация ферментов

Небелковый компонент (кофактор)

- любой фактор, абсолютно необходимый для выполнения белком его каталитической или любой другой биологической роли.

Простетическая группа

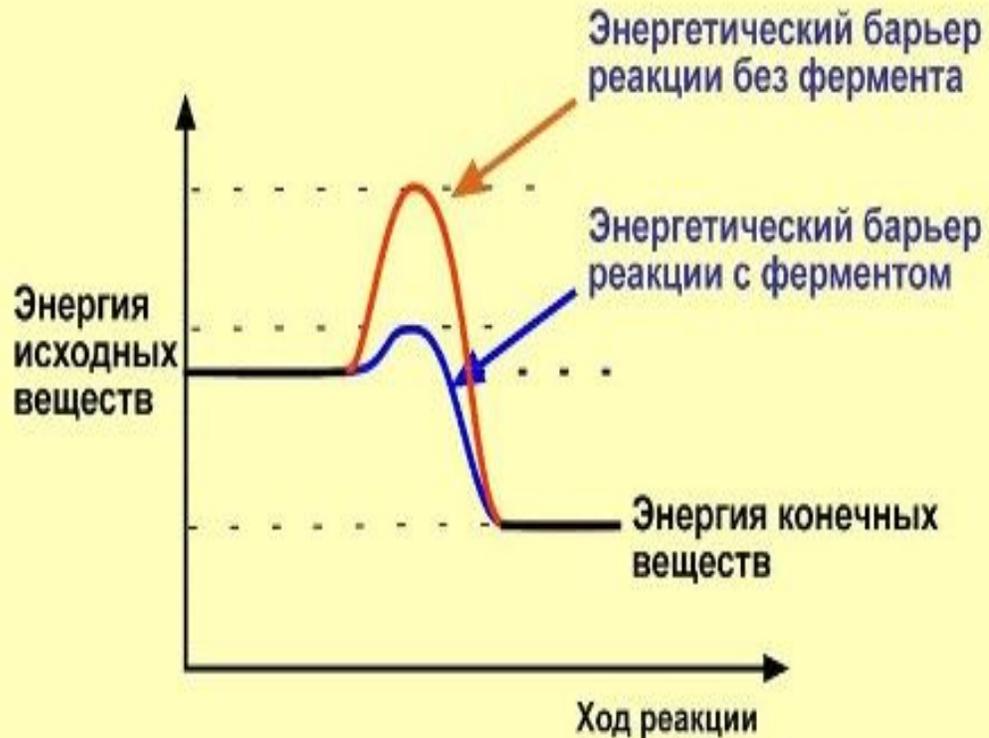
- кофактор, прочно связанный с полипептидной цепью и не отделяемый от нее при выделении и очистке (ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота, геммы).

Фермент содержащий простетическую группу – **холофермент.**

Кофермент

- небелковый фактор, легко отделяемый от белкового компонента при диссоциации и непосредственно вовлеченный в реакцию энзиматического катализа (НАД⁺, НАДФ⁺).

Механизм действия ферментов



Применение ферментов снижает $E_{\text{активации}}$ (энергетический барьер), осуществив превращение исходного вещества в конечное через промежуточное состояние или состояние активного комплекса, что энергетически более выгодно.

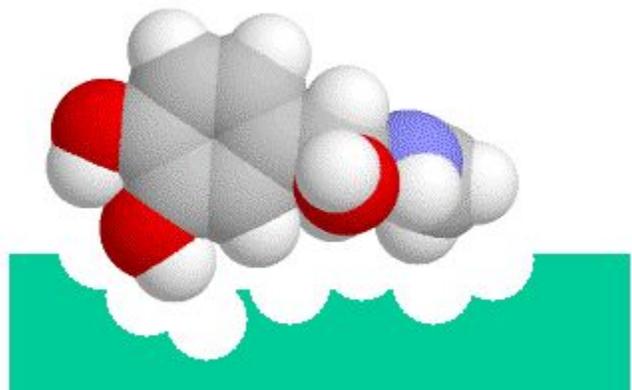
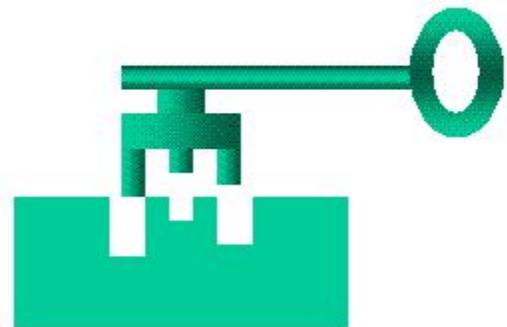
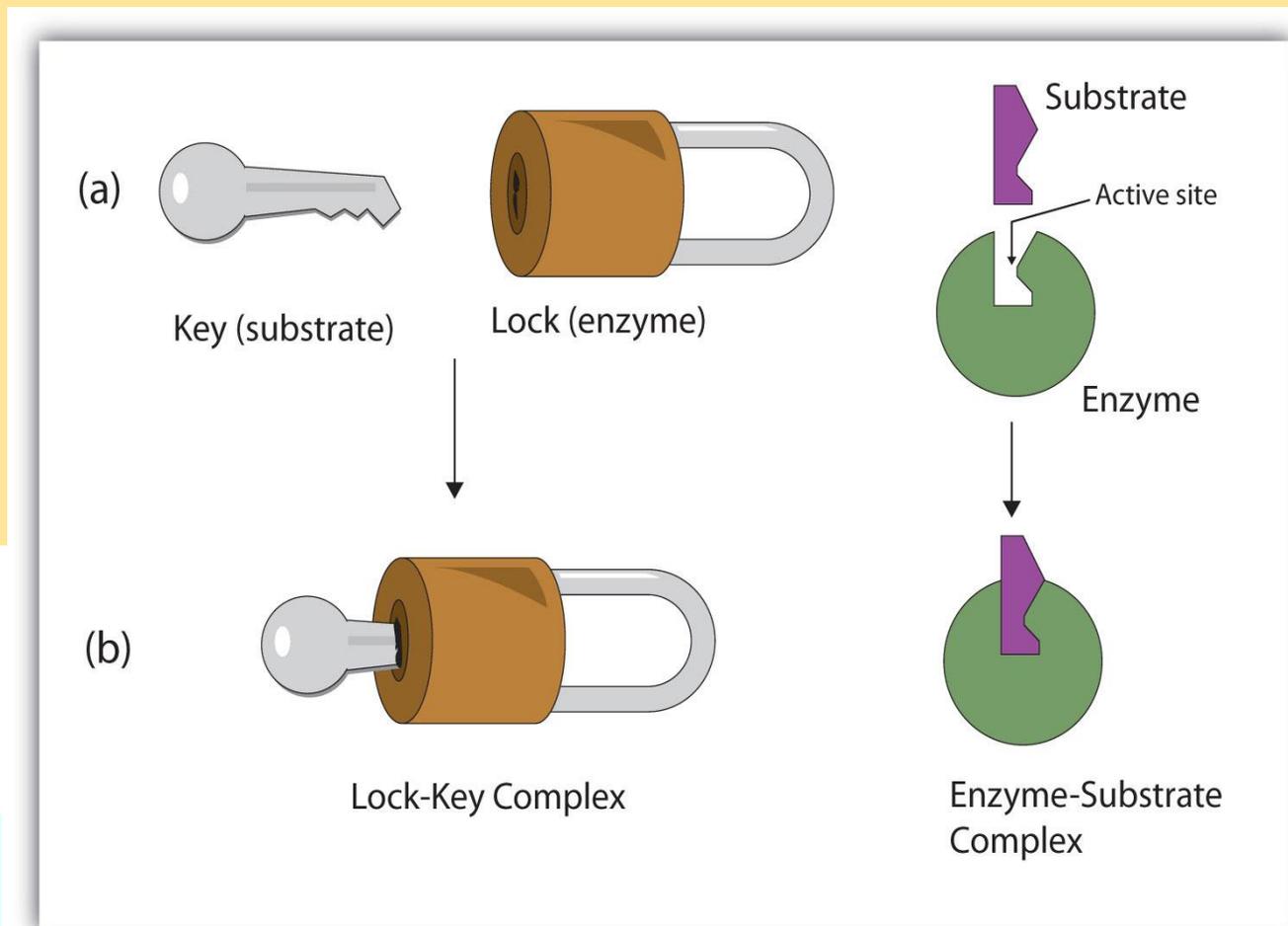
Энергия активации - это энергия необходимая для того, чтобы вещества вступили в химическую реакцию, т.е. энергия, требуемая для преодоления энергетического барьера.

Модель «ключ-замок»



Герман Эмиль Фишер
1852, Ойскирхен – 1919, Берлин
Немецкий химик-органик и
биохимик
Нобелевская премия
по химии 1902 г.

В 1890 г. Эмиль Фишер предположил, что специфичность ферментов определяется точным соответствием формы фермента и субстрата



Механизм специфичности ферментов



Согласно другой теории (теория Кошланда, «рука-перчатка») присоединение субстрата вызывает изменения в молекуле фермента, которые приводят его каталитический центр в соответствие с формой субстрата. Эта теория хорошо объясняет групповую специфичность.



Специфичность

субстрата

способность фермента реагировать с каким-либо одним или ограниченным числом субстратов

значение имеют распределение зарядов, пространственное расположение атомных групп и другие свойства субстрата

реакции

абсолютная

действует только на одно вещество и/или осуществляет только одну реакцию

Пример - уреазы, расщепляющая только мочевины и не действующая даже на ее производные

абсолютная групповая

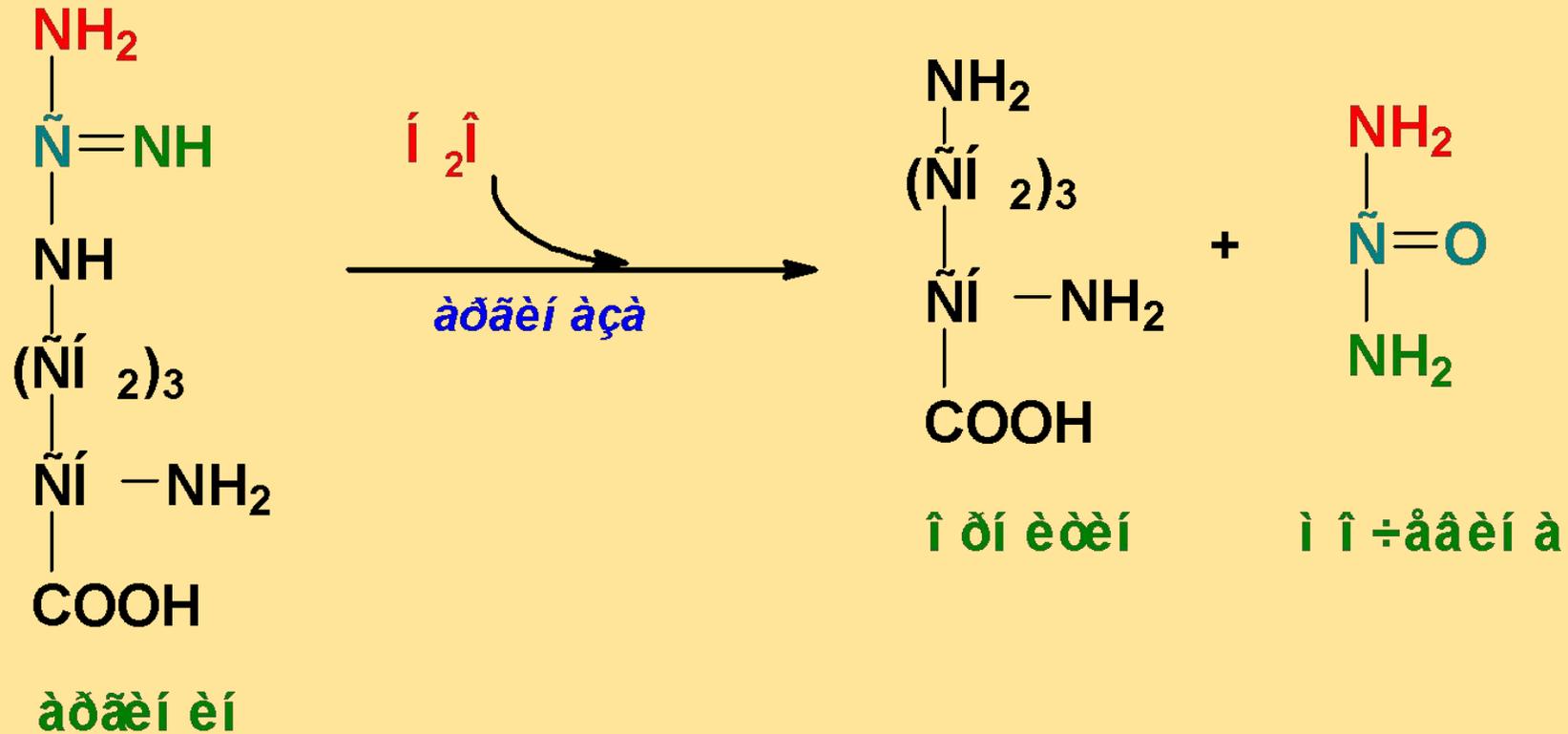
фермент действует на ряд соединений с общим типом строения

имеет значение тип связи и структура прилегающего к ней радикала или радикалов

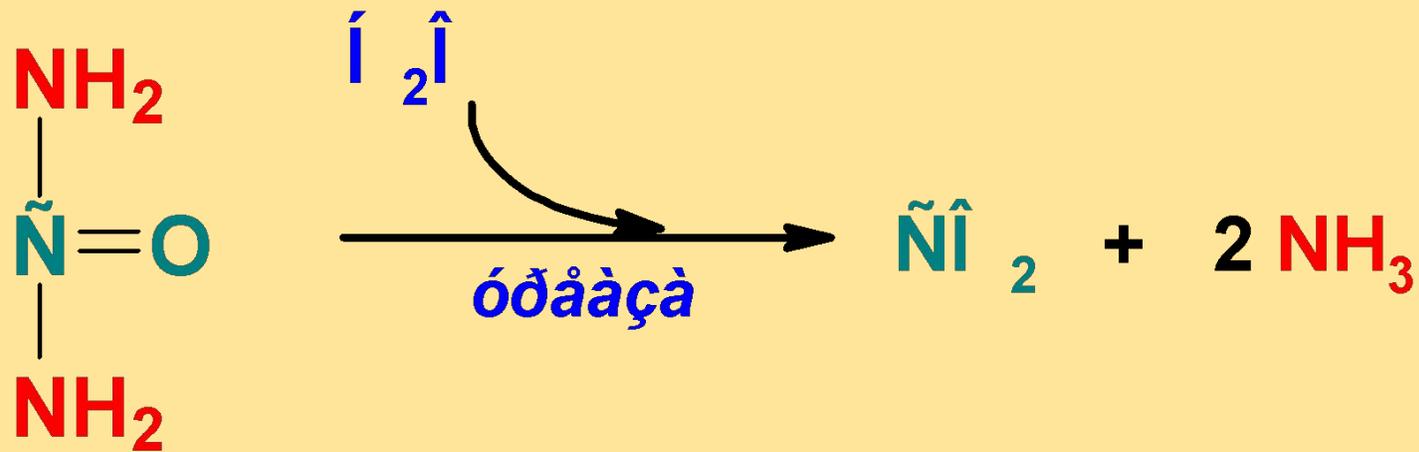
Относительная групповая

фермент безразличен к структуре соединения и имеет значение лишь тип связи

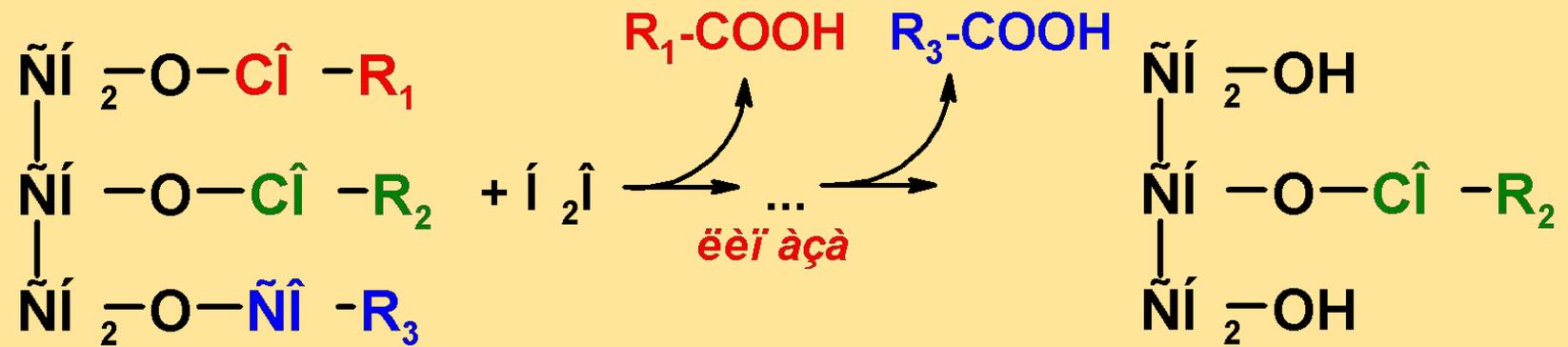
Абсолютная специфичность



Абсолютная специфичность



Относительная специфичность



òðèàöèëæèöåðî ë
 (í áéòðàèüí û é æèð)

ì î í î àöèëæèöåðî ë

Стереоспецифичность

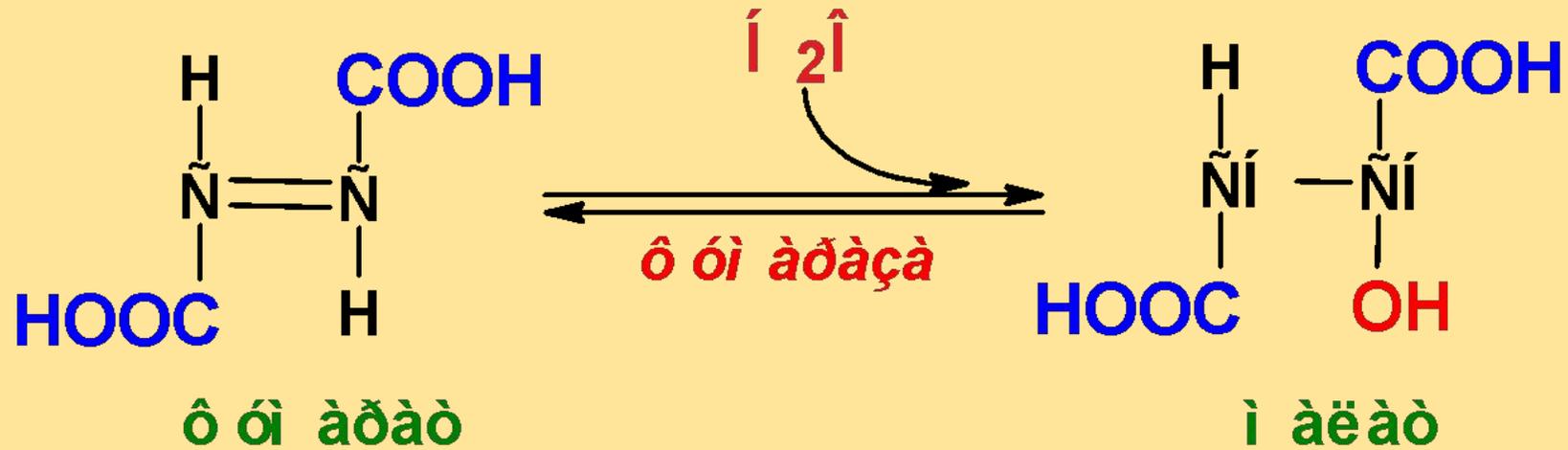
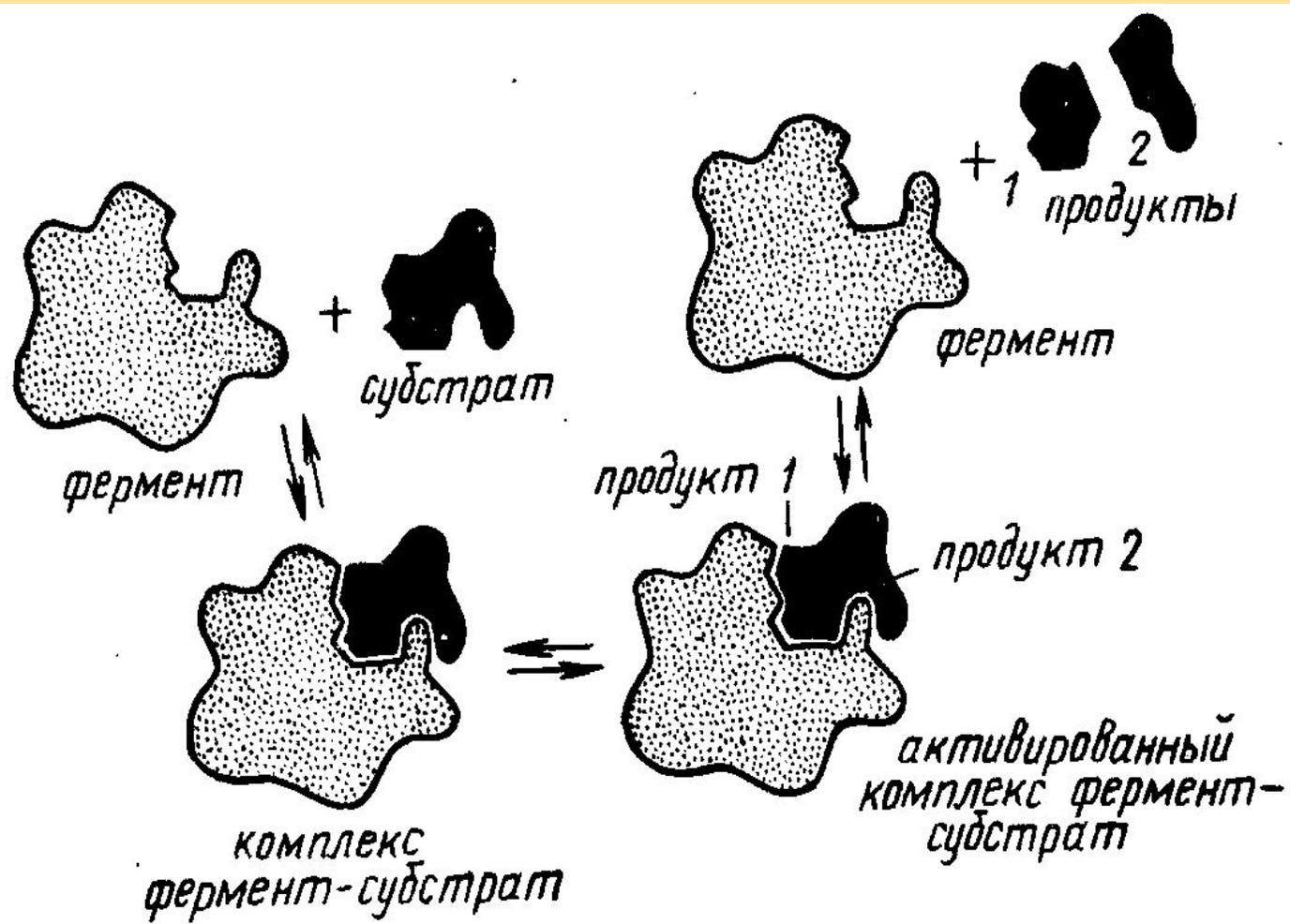


Схема ферментативной реакции

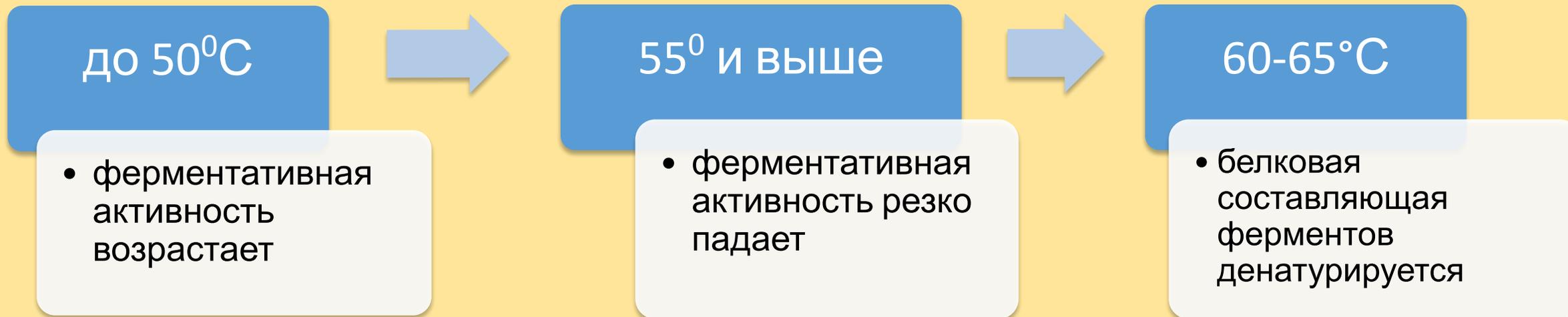


1. Между субстратом (S) и ферментом (E) возникает связь (ионная, ковалентная или др.), (E подходит к S по типу «ключ-замок» или «рука-перчатка»).
2. ES претерпевает изменение, делающее его более доступным для соответствующей ХР.
3. Происходит сама ХР.
4. Образующиеся продукты освобождаются из фермент-продуктного комплекса.



Факторы, влияющие на активность ферментов

1. $t^{\circ}\text{C}$ ($t_{\text{opt}} = 30-50^{\circ}\text{C}$);



t_{opt} непостоянен, зависит от продолжительности реакции

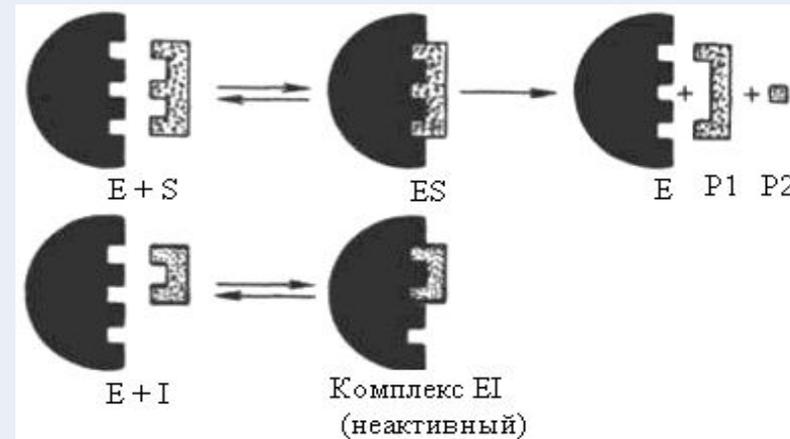
2. **pH** – *max kat* активность лежит в узких пределах pH (~7). В резко кислой и щелочной средах работают лишь некоторые ферменты.

Факторы, влияющие на активность ферментов

3. Наличие активаторов и ингибиторов

- Ионы Me и некоторые анионы (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} , Co^{2+} , Cl^{-}). Действие:
 - * входят в состав кофермента;
 - * облегчают образование ES комплекса;
 - * способствуют присоединению кофермента к апоферменту;
 - * обеспечивают становление 4° структуры фермента.
- Сульфгидрильные соединения (группа SH): цистеин, восст. глутатион

- белковые осадители (танин, соли Pb , Hg)
- специфические ингибиторы проявляют свое действие специфично, связываясь с определенными химическими группировками в активном центре фермента и тем самым его инактивируют



Факторы, влияющие на активность ферментов

4. pH – *max kat* активность лежит в узких пределах pH (~7). В резко кислой и щелочной средах работают лишь некоторые ферменты.

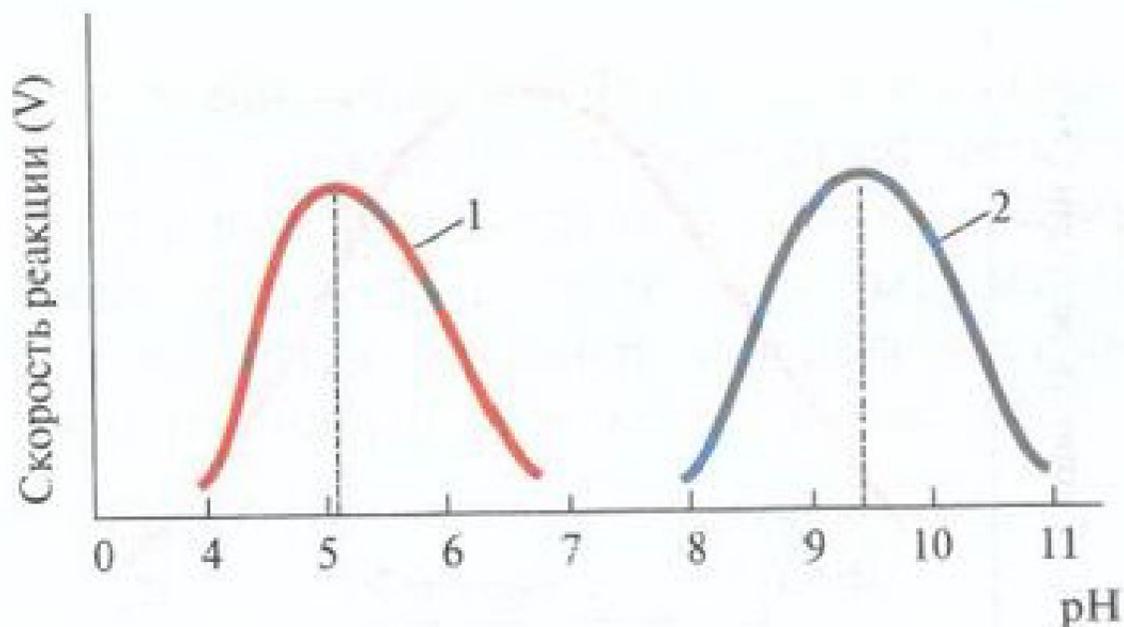
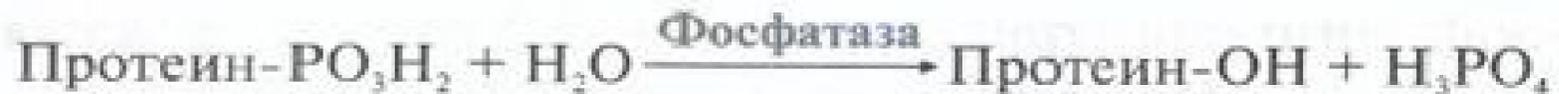


Рис. 2.10. Кривые зависимости активности кислой (1) и щелочной (2) фосфатаз от pH

Отклонение от pH_{opt} вызывает ионизацию функциональных групп → заряда фермента → конформации активного центра → сродства E к S → V_{xp}

Для большинства людей сдвиги величины pH крови за пределы 6,8-7,8 (при норме 7,35-7,45) несовместимы с жизнью из-за дисбаланса скорости ферментативных реакций.

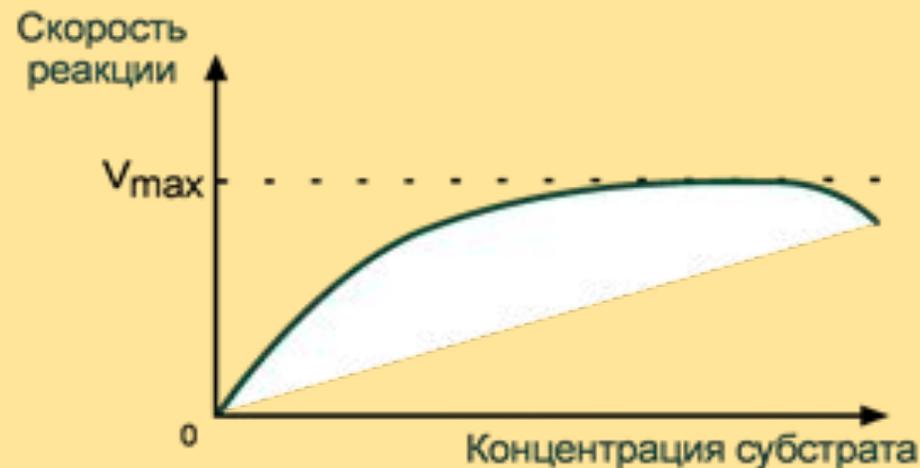
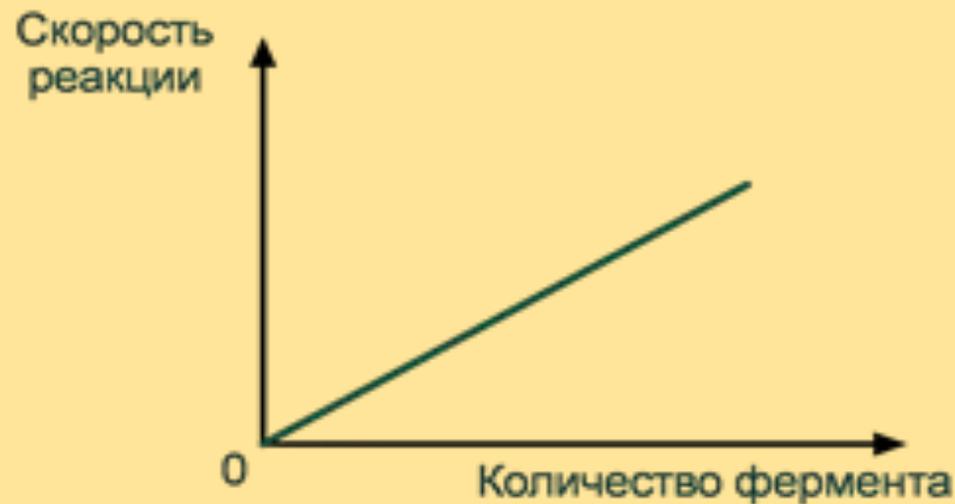
Оптимальное значение pH

Пепсин	1,5-2,5
Трипсин	8,0-9,0
Сахараза	6,2
Мальтаза	6,1
Амилаза	≈ 7,0
Липаза	7,0-8,5
Фосфатаза	6,0-9,0
Аргиназа	9,8
Карбоксилаза	4,8

Факторы, влияющие на активность ферментов

При оптимальных условиях активность ферментов зависит от

- количества субстрата (S);
- количества продукта (P);
- количества фермента (E);
- концентрации кофактора;
- наличия **активаторов** и **ингибиторов**



Константа Михаэлиса-Ментен

$$K_m = \frac{k_1}{k_2 + k_3}$$

Константа Михаэлиса-Ментен (K_m) - это $[S]$, при которой $V_{xp} = \frac{V_{max}}{2}$. Чем ниже K_m фермента, тем выше его сродство к S , и наоборот.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

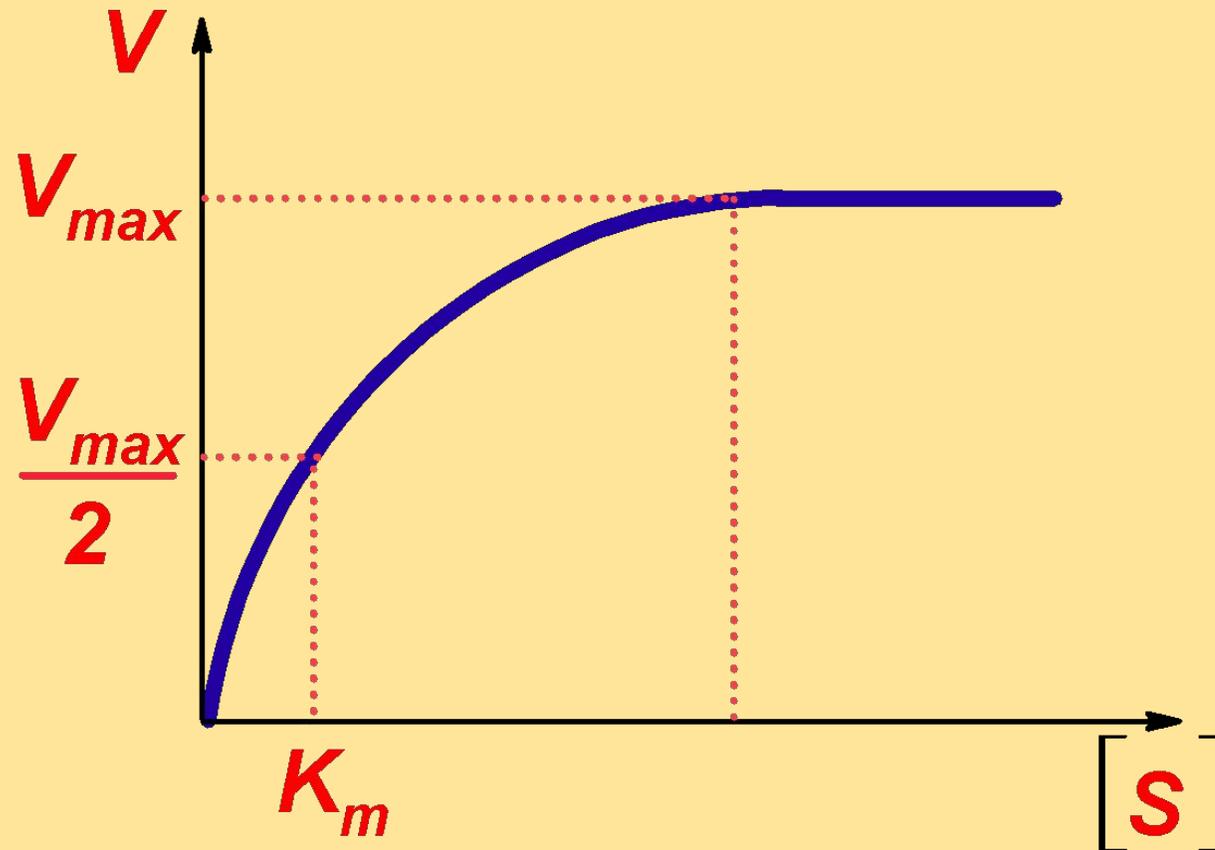
$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$[S] \gg K_m; V = V_{max}$$

$$[S] \ll K_m; V = V_{max} [S] / K_m$$

$$[S] = K_m; V = \frac{1}{2} V_{max}$$

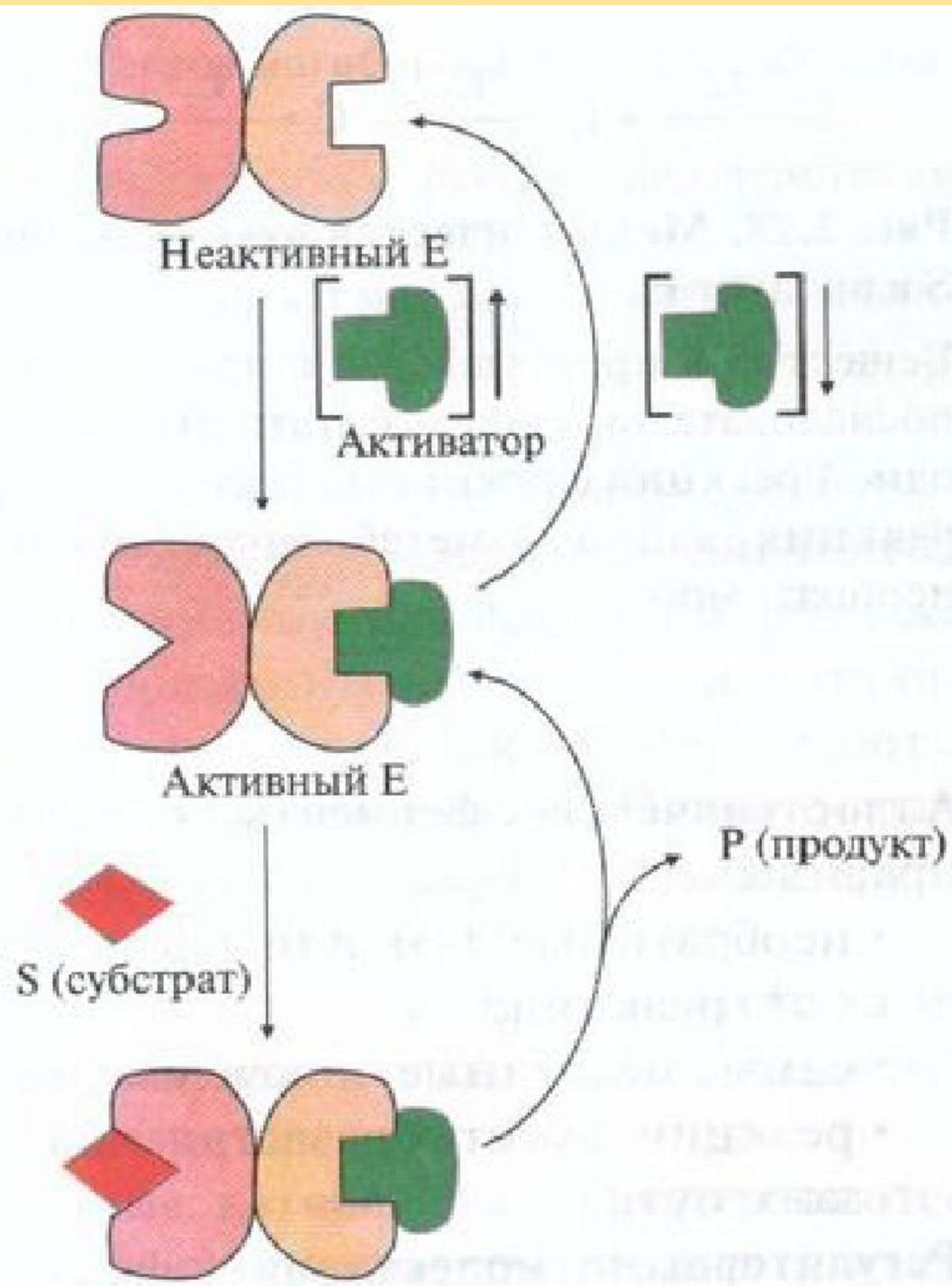
График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации **субстрата**



Регуляция скорости ферментативных реакций

- 1. Количеством ферментов**
- 2. Доступностью фермента и субстрата**
- 3. Регуляцией активности самого фермента:**
 - аллостерическая
 - химическая модификация
 - частичный протеолиз

Аллостерическая регуляция



Аллостерические ферменты являются полимерными белками, активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.



Активность фермента
восстанавливается при
удалении ингибитора
из среды

обратимые

конкуретные

Игибитор и субстрат конкурируют
между собой стремясь вытеснить
один другого из ES комплекса

неконкурентные

присоединяются к E не в активном центре, а в
другом месте, вызывая изменение конформации
фермента и его активного центра.

Ингибиторы

специфические

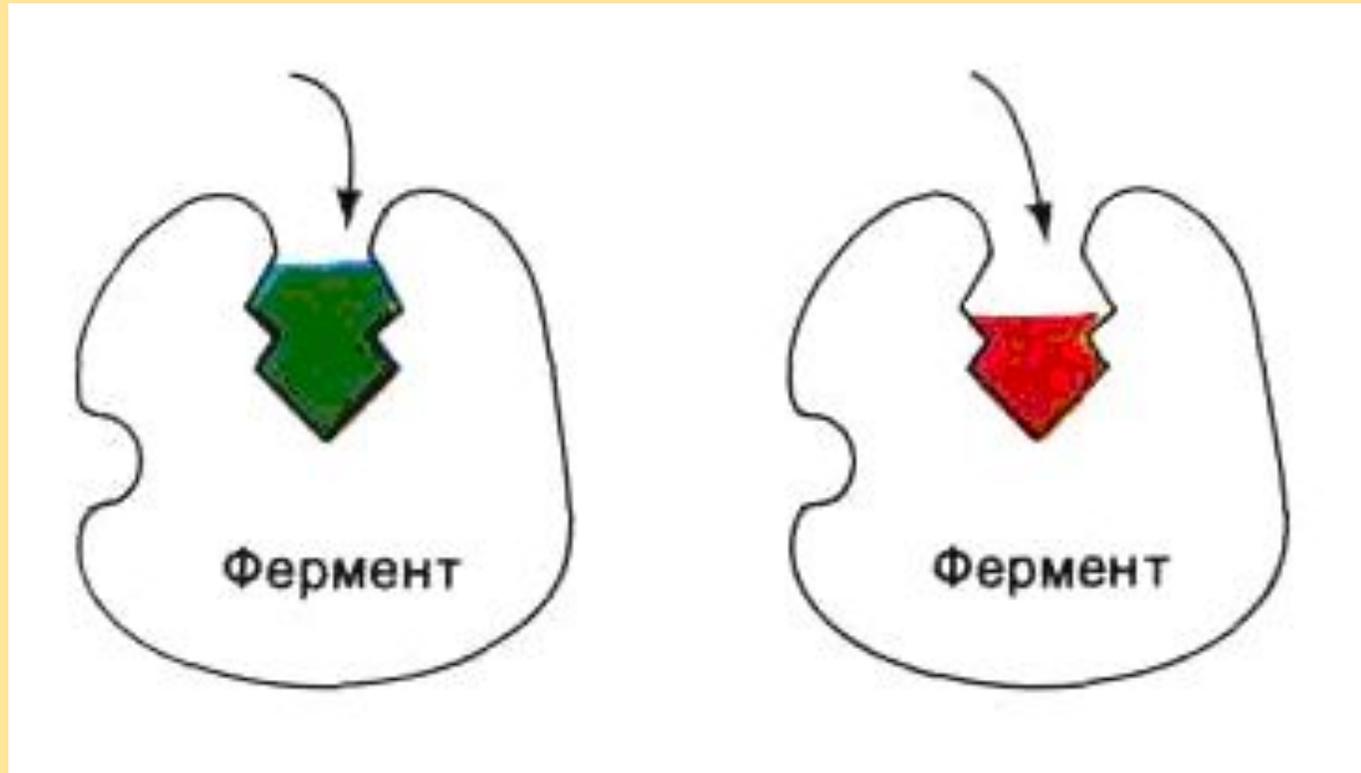
ковалентно связываются или разрушают
функционально значимую молекулы активного
центра.

необратимые

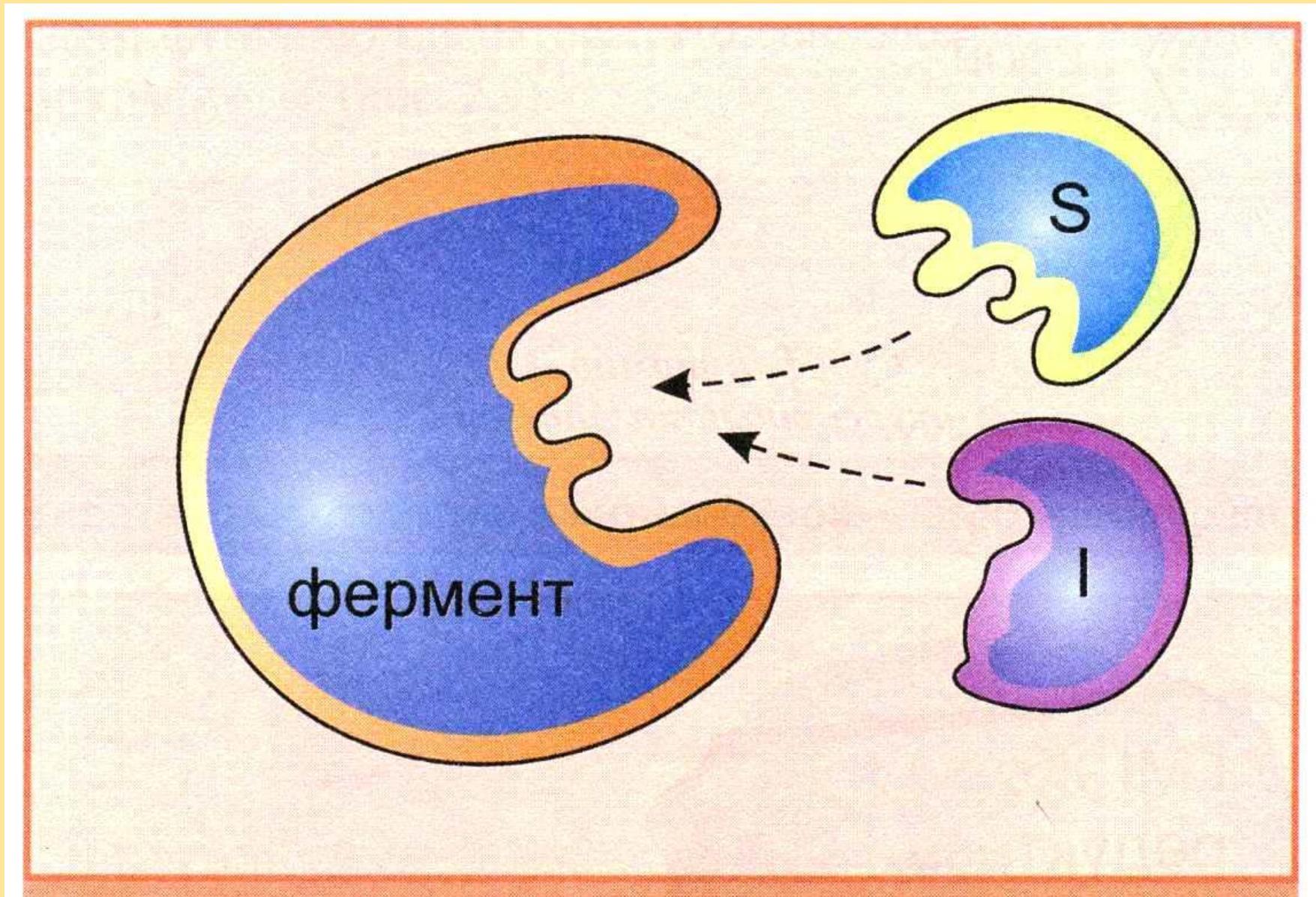
Конкурентное ингибирование

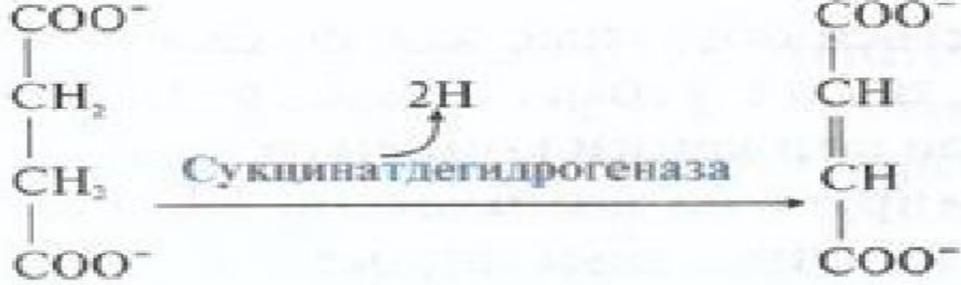
субстрат

конкурентный
ингибитор



Конкурентное ингибирование

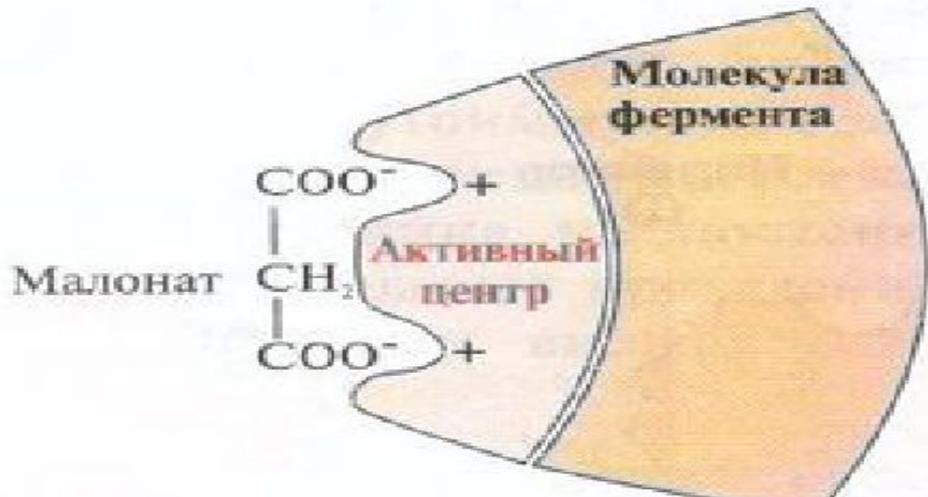
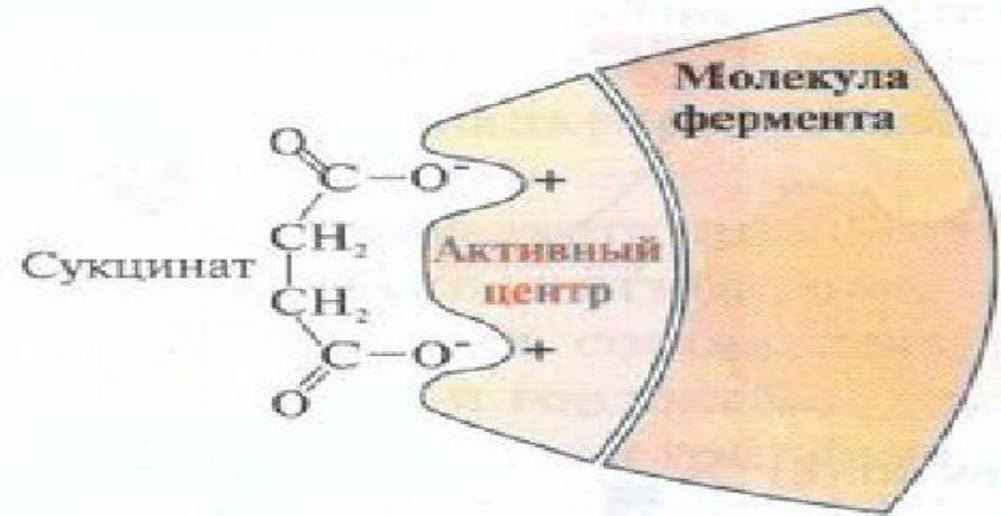




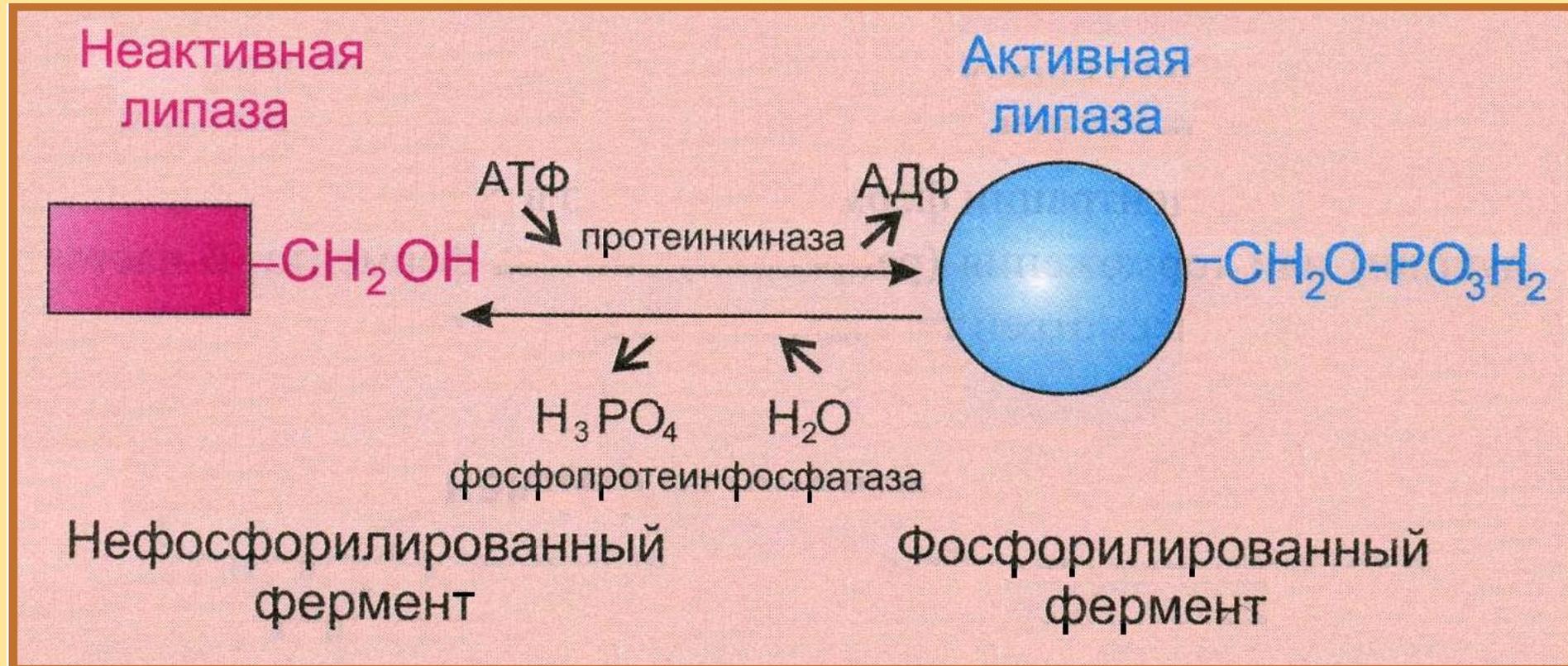
Обратимые конкурентные ингибиторы – структурные аналоги S. Ингибитор и субстрат конкурируют между собой стремясь вытеснить один другого из ES комплекса

Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарственных средств

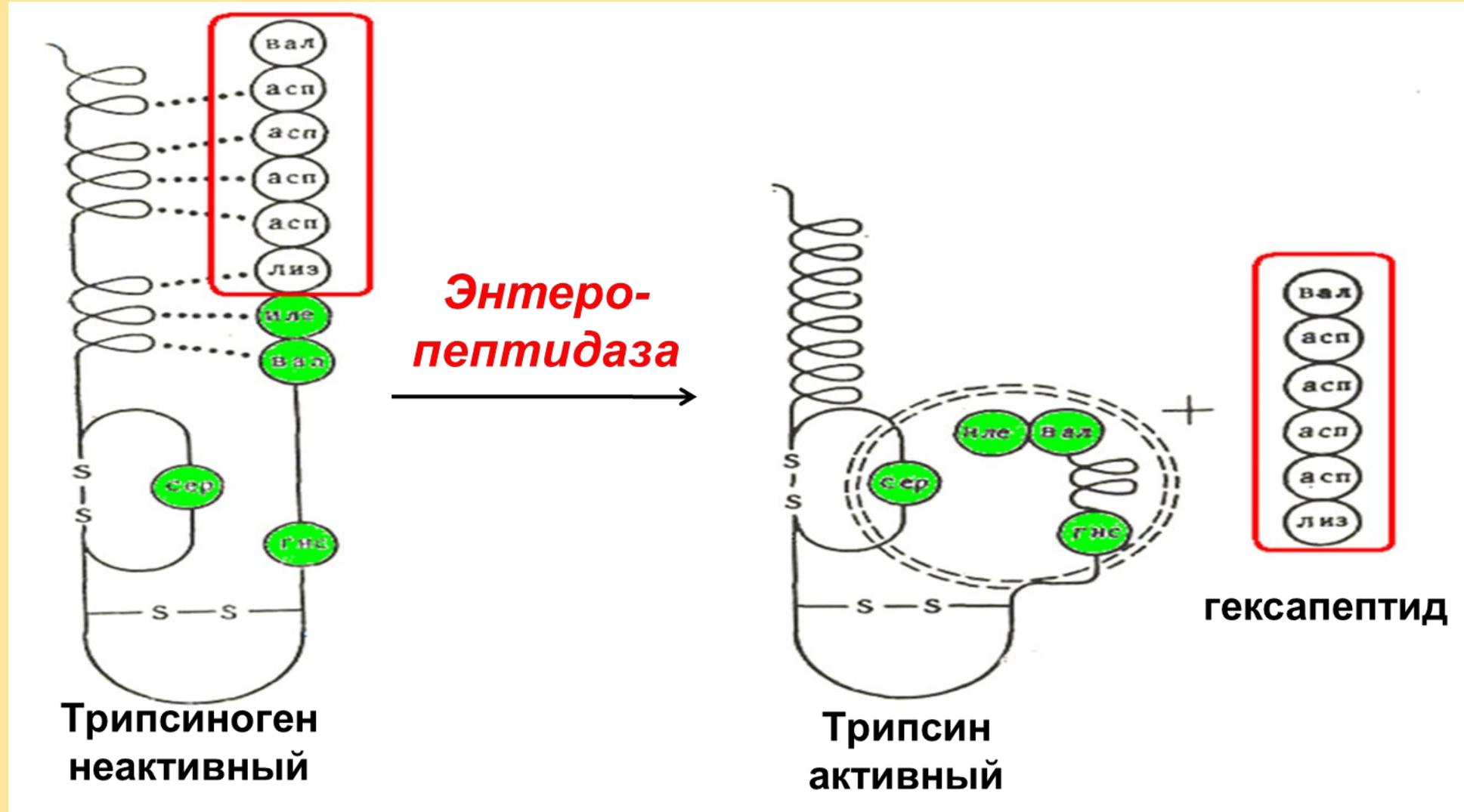
При панкреатите происходит преждевременная активация трипсина, что приводит к протеолизу белков ткани поджелудочной железы (самопереваривание). Одна из мер защиты – присутствие в секрете железы небольшого белка – панкреатического ингибитора трипсина. При лечении используют его структурные аналоги (апротинин, входит в состав трасилола и гордокса).



Регуляция активности фермента путем **фосфорилирования/дефосфорилирования**



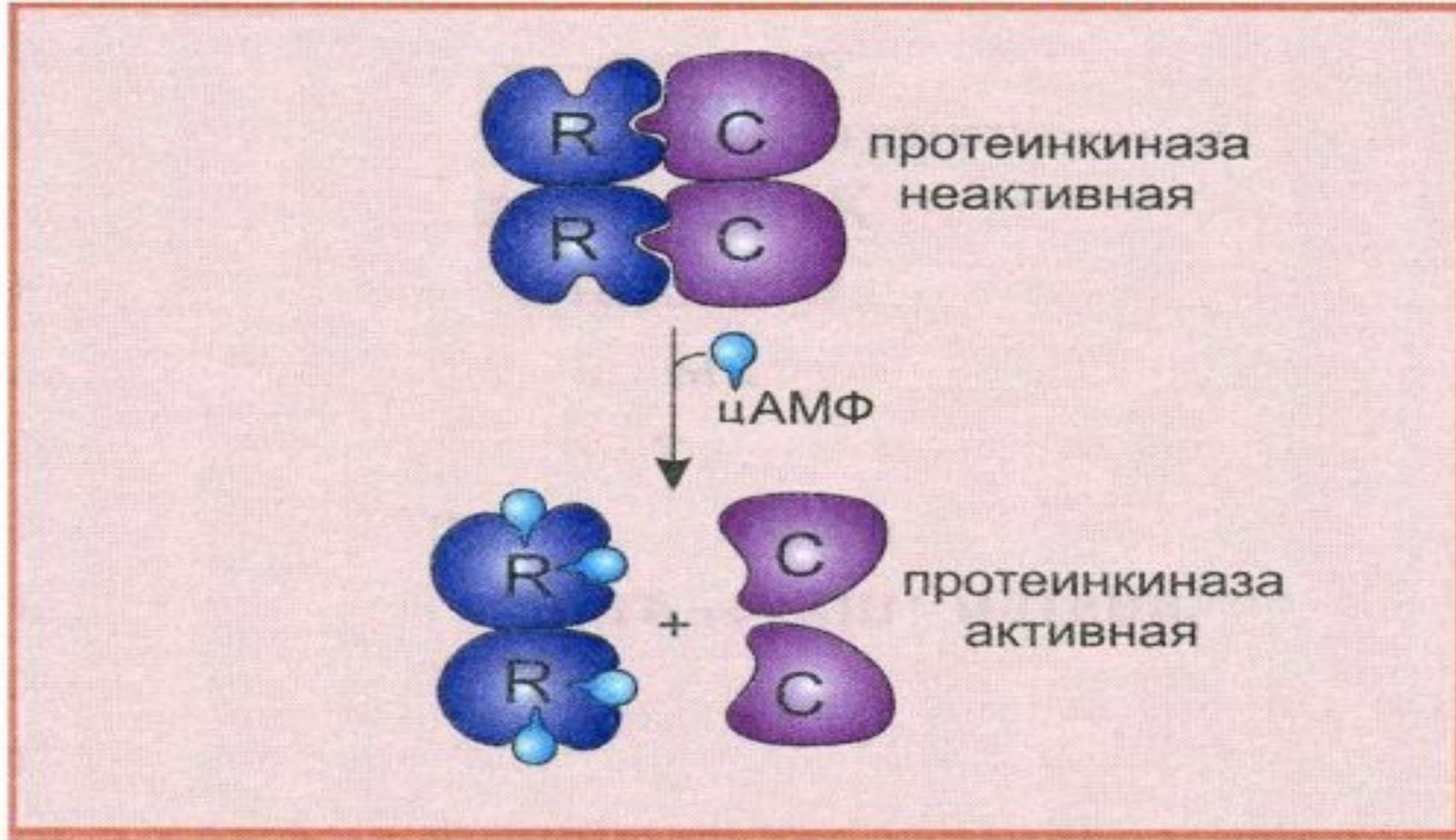
Частичный протеолиз. Ряд Е вырабатывается клетками в виде проферментов или зимогенов (кат неактивны). В результате частичного протеолиза (отщепления пептида) изменяются I^0 , Mr, конформация, повышается сродство к S.



Синтез пептидаз в неактивной форме предотвращает их разрушающее действие на клетки органов, в которых они образуются. Данный процесс регуляции необратим.

Регуляция активности Е путем ассоциации-диссоциации протомеров

Регуляция путём ассоциации-диссоциации



Номенклатура ферментов

- **Тривиальная** (по случайным признакам)

Пепсин - «пищеварение», трипсин - «разжижающий»,

клетка цвет

Цитохромы - окрашенные внутриклеточные ферменты, kat O-B
реакции

- **Рациональная** - по названию S (в окончании «-аза», н-р сахараза)
- **По типу каталитической реакции и характеру S** -
сукцинатдегидрогеназа
- **По названию простетической группы** - геминфермент (гем),
перидоксальфермент.

• По химическому составу фермента

В 1961 г. Международная комиссия по номенклатуре представила V Международному биохимическому конгрессу проект номенклатуры, построенной на строго научных принципах:

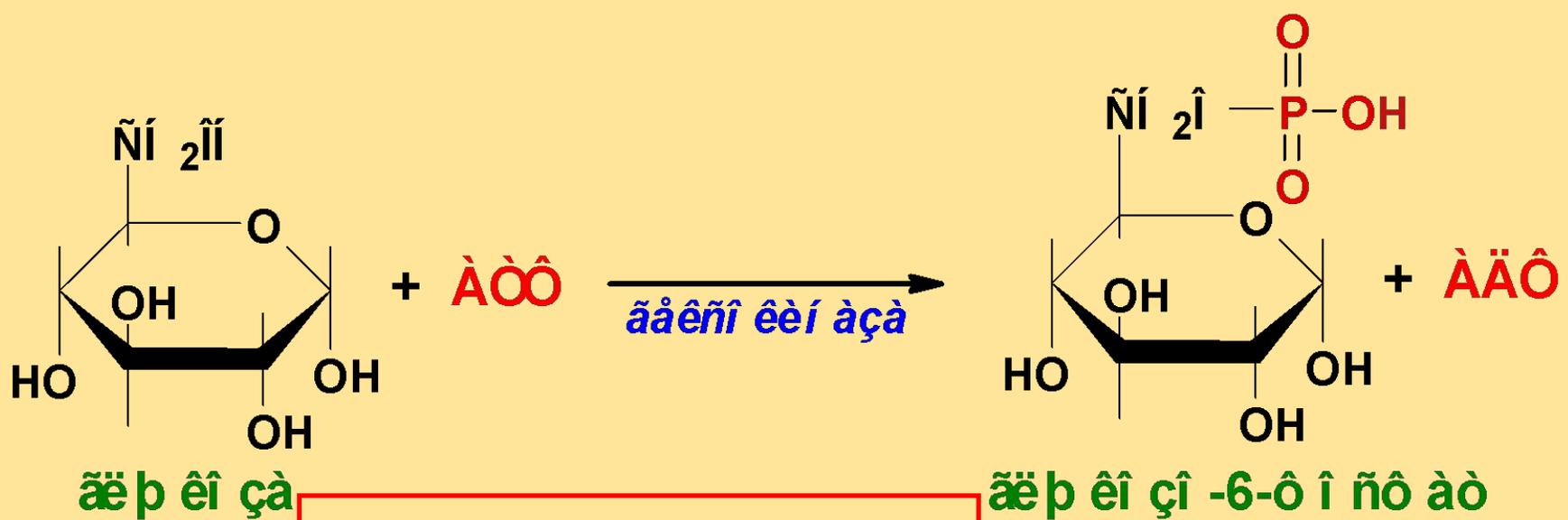
Название фермента = химическое название S + название реакции + химическое название акцептора, если реакция сопровождается переносом группировки атомов

Например: пиридоксальфермент – L-аланин2кетоглутаратаминотрансфераза

В связи с усложнением научных названий новая номенклатура допускает сохранение наряду с новыми старых тривиальных названий. Например, уреазы – карбамид-аминотрансфераза.

• Шифрование ферментов

Международной комиссией был составлен список всех известных в то время ферментов, дополненный в 1972 г. Каждому ферменту присвоен шифр (1-я цифра – класс фермента, 2 – п/кл, 3- п/п/кл, 4-я – порядковый № фермента в этом п/п/кл.



EC 2.7.1.1

класс 2 –
трансфераза

подподкласс 1 –
акцептором фосфата
является OH-группа

подкласс 7 –
перенос фосфата

D-гексозо-6-фосфотрансфераза

Классификация ферментов (6 классов)

1. **Оксидоредуктазы (О-В ферменты)** катализируют перенос атомов Н и e^- (180-200 Е).
2. **Трансферазы (ферменты переноса)** - катализируют перенос функциональных групп и молекулярных остатков (реакции фосфорилирования, переаминирования).
3. **Гидролазы** катализируют реакции гидролитического распада .
4. **Лиазы** катализируют негидролитическое отщепление каких-либо групп от субстратов (альдолаза, декарбоксилазы, реакции дезаминирования).
5. **Изомеразы** ускоряют пространственные или структурные изменения в пределах одной молекулы (реакции изомеризации).
6. **Лигаза (синтетаза)** катализируют реакции синтеза, сопряженные с распадом макроэргических связей в молекуле АТФ.

Класс 1: Оксидоредуктазы.

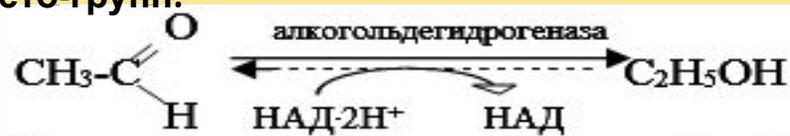
Катализируют окислительно-восстановительные реакции, в которых, как правило, участвуют два субстрата

общее название оксидоредуктаз, отщепляющих атомы водорода или электроны и переносящих их на любой акцептор, кроме кислорода, представлено **дегидрогеназами**.

Как альтернатива, некоторые ферменты, которые преимущественно характеризуются восстанавливающим действием, носят название **редуктаз**. Оксидоредуктазы, использующие кислород в качестве акцептора атомов водорода или электронов, называются **оксидазами**.

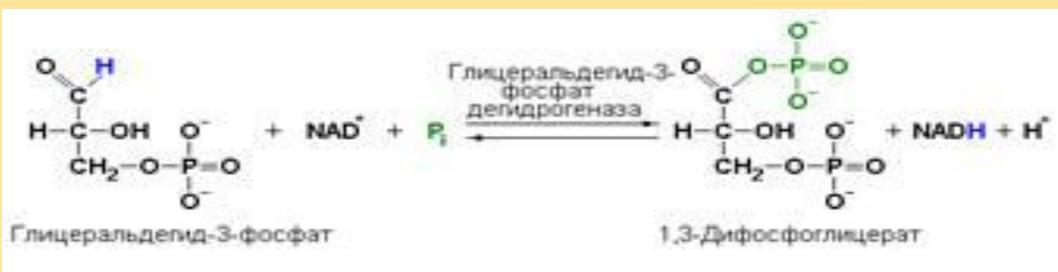
Ферменты, осуществляющие перенос электронов, называются **цитохромами**.

Подкласс 1.1 составляют оксидоредуктазы, действующие на спиртовые группы доноров, окисляя их до альдегидных или кето-групп.



Подкласс 1.2 оксидоредуктаз включает ферменты, действующие на карбонильные (альдегидные или кето-группы) группы доноров. Эти ферменты окисляют альдегиды и кетоны до карбоновых кислот.

Пример: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (D-глицеральдегид-3-фосфат: NAD-оксидоредуктаза (фосфорилирующая), КФ 1.2.1.12) катализирует одну из промежуточных реакций гликолитического распада глюкозы:



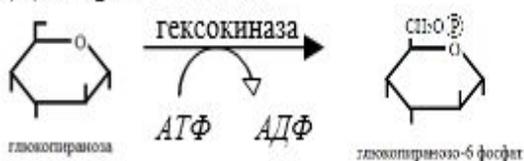
2 класс: Трансферазы.

катализируют реакции переноса функциональных групп и молекулярных остатков от одного соединения к другому (≈ 500 ферментов).

Фосфо-

катализируют реакции переноса остатков H_3PO_4 с образованием фосфорных эфиров – лабильных химических соединений.

Донор P – АТФ



Амино-

катализируют реакции переаминирования АК с кетокислотами

Гликозил-

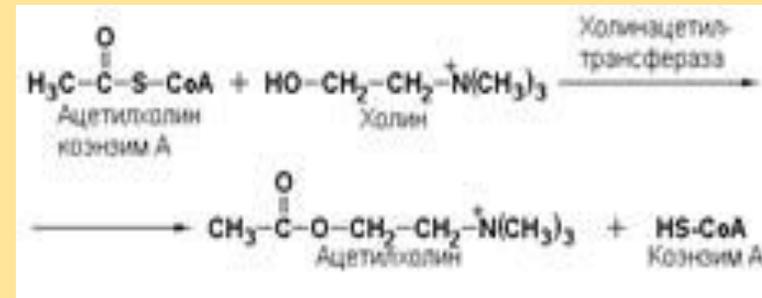
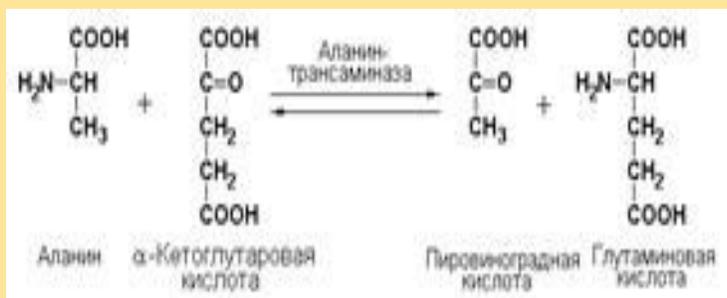
катализируют реакции переноса гликозильных (углеводных) остатков от одних молекул к другим
Фосфорилазы – реакции типа гидролиза, но вместо H_2O действует H_3PO_4

Ацил-

катализируют перенос ацилов (остатков карбоновых кислот) на $R-NH_2$, АК, $R-OH$ и др. Источник ацилов – ацилкоэнзим А (КоА), чаще ацетил коА.

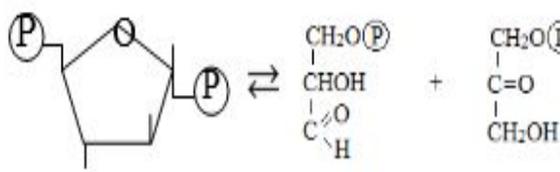
Метил-(формил-)

катализируют перенос 1С остатков



4 кл. Лиазы

катализируют негидролитическое отщепление определенной группы с образованием $-C=C-$ (или присоединение группы атомов по $-C=C-$), при этом выделяются такие продукты как CO_2 , H_2O , NH_3 и т.д.

<u>n/кл C-C лиазы</u> (углерод-углерод лиазы)		<u>n/кл C-O лиазы</u>	<u>n/кл C-N-лиазы</u>
<p>карбоскилазы</p> <p>коферменты: B_1, B_6</p> <p>пируватдекарбоксилаза</p> $CH_3-CO-COOH \longrightarrow CH_3-COOH + CO_2 \uparrow$ <p>ПВК уксусная кислота</p> <p>декарбоксилаза щавелево-уксусной кислоты</p> $HOOC-CH_2-CO-COOH \longrightarrow CH_3-CO-COOH + CO_2$	<p>Альдегидлиазы</p>  <p>фруктофураноза-1,6-дифосфат 3-фосфо-глицериновый альдегид фосфо-доксацетон</p>	<p>(<u>гидролиазы</u>) катализируют реакции присоединения H_2O (гидратации и дегидратации)</p> $HOOC-CH_2-CH-COOH \rightleftharpoons HOOC-CH=CH-COOH + H_2O$ <p style="text-align: center;">ОН</p>	

5. Изомеразы

Изомеризация

- 5.1 Рацемазы и эпимеразы
- 5.2 *цис-транс*-Изомеразы
- 5.3 Внутримолекулярные оксидоредуктазы
- 5.4 Внутримолекулярные трансферазы

6. Лигазы

Образование связей с использованием АТФ

- 6.1 $\begin{array}{c} >C=O \\ | \end{array}$
- 6.2 $\begin{array}{c} -C-S- \\ | \end{array}$
- 6.3 $\begin{array}{c} >C=N= \\ > \end{array}$
- 6.4 $-C-C-$

Металлы, содержащиеся в ферментах

Алкогольдегидрогеназа, карбоангидраза	Zn
Аргиназа, аминопептидаза	Mn
Дипептидаза	Co
Фосфатаза, фосфокиназа	Mg
Тирозиназа	Cu
Сукцинатдегидрогеназа	Fe
Ксантиноксидаза	Mo

Классификация коферментов

По химическому строению

1. **Алифатические** (липоевая кислота);
2. **Ароматические** (коэнзим Q);
3. **Гетероциклические** (ТПФ, ПФ);
4. **Нуклеотиды** (НАД, НАДФ, ФАД, ФМН)

Коферменты

Витаминные

Аскорбиновая кислота	Витамин С
Никотинамидаденин- динуклеотид (НАД)	(никотиновая кислота, В3)
Коэнзим А	(пантотеновая к-та, В5)
Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК)	(фолиевая кислота, В9)

Коферменты

Невитаминные

S-Аденозилметионин (SAM),

Фосфоаденозилфосфосульфат (ФАФС),

Глутатион,

Убихинон (Кофермент Q)

Простетические группы

Витаминовые

Пиридоксальфосфат (ПФ)	(пиридоксин, В6)
5'-Дезоксиаденозил-кобаламин	(кобаламины, В12)
Биоцитин	(биотин, Н)
Тиаминдифосфат (ТДФ)	(тиамин, В1)
Флавинадениндинуклеотид (ФАД)	(рибофлавин, В2)
Флавинмононуклеотид (ФМН)	(рибофлавин, В2)

Простетические группы

Невитаминовые

Гем

Липоевая кислота

Металлы

Ca²⁺

Cu²⁺

Fe²⁺

Fe³⁺

Mg²⁺

Mn²⁺

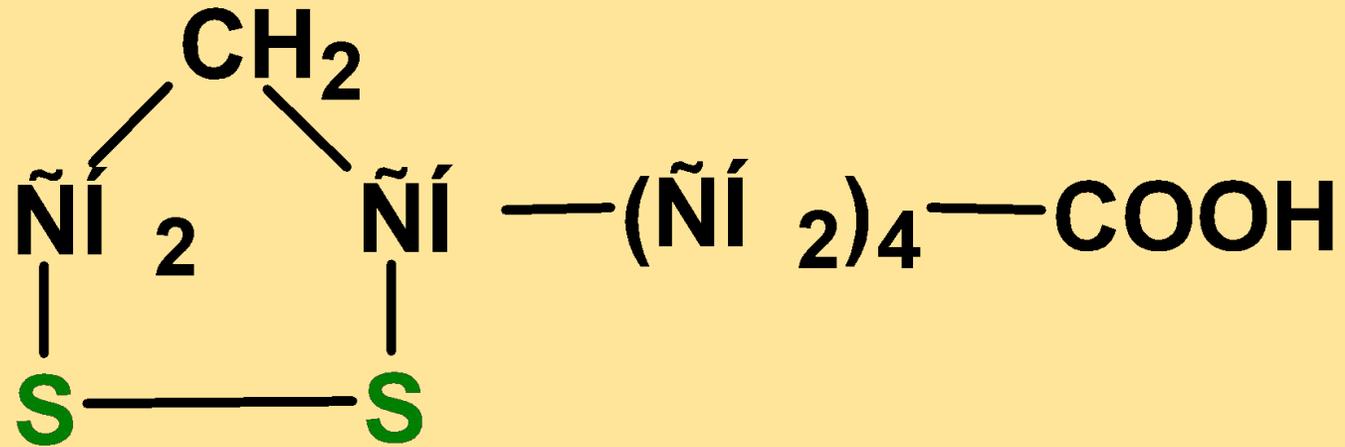
Mo

Ni²⁺

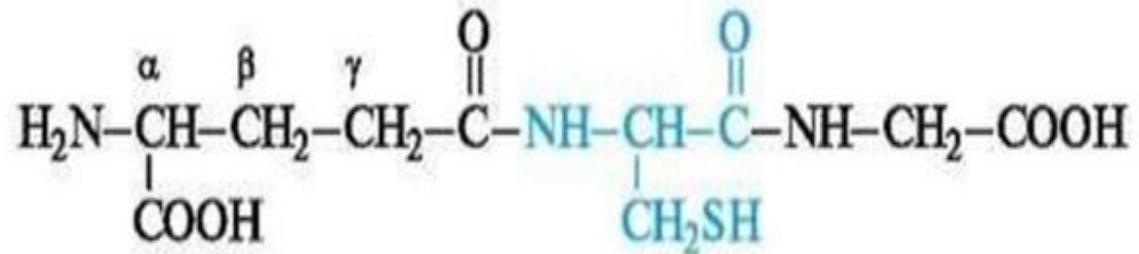
Se

Zn²⁺

Липоевая кислота

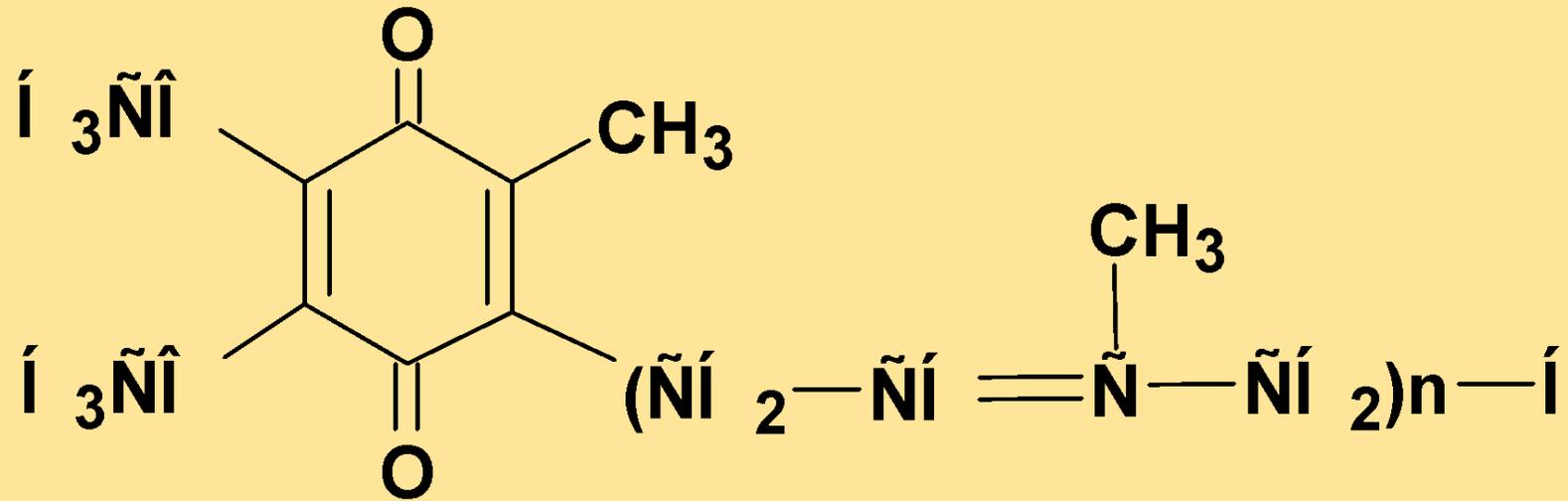


ГЛУТАТИОН

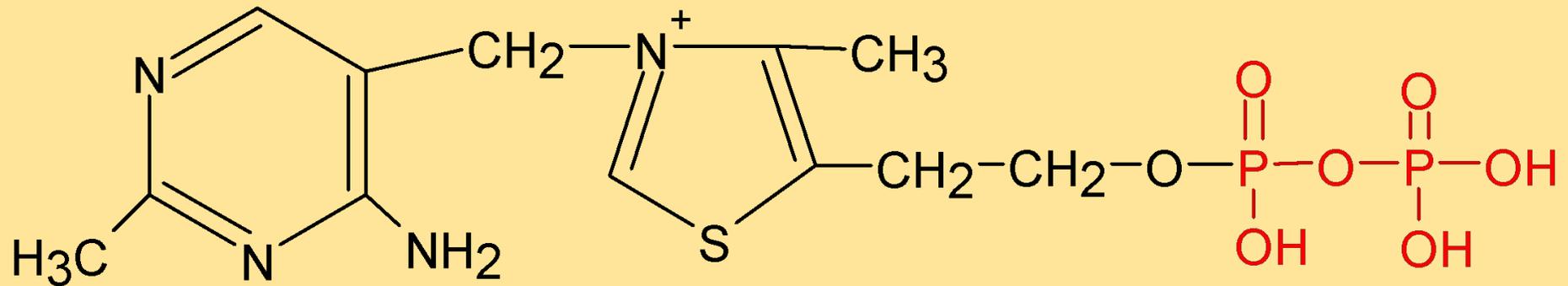


γ-глутамилцистеинилглицин (γ-Glu-Cys-Gly)

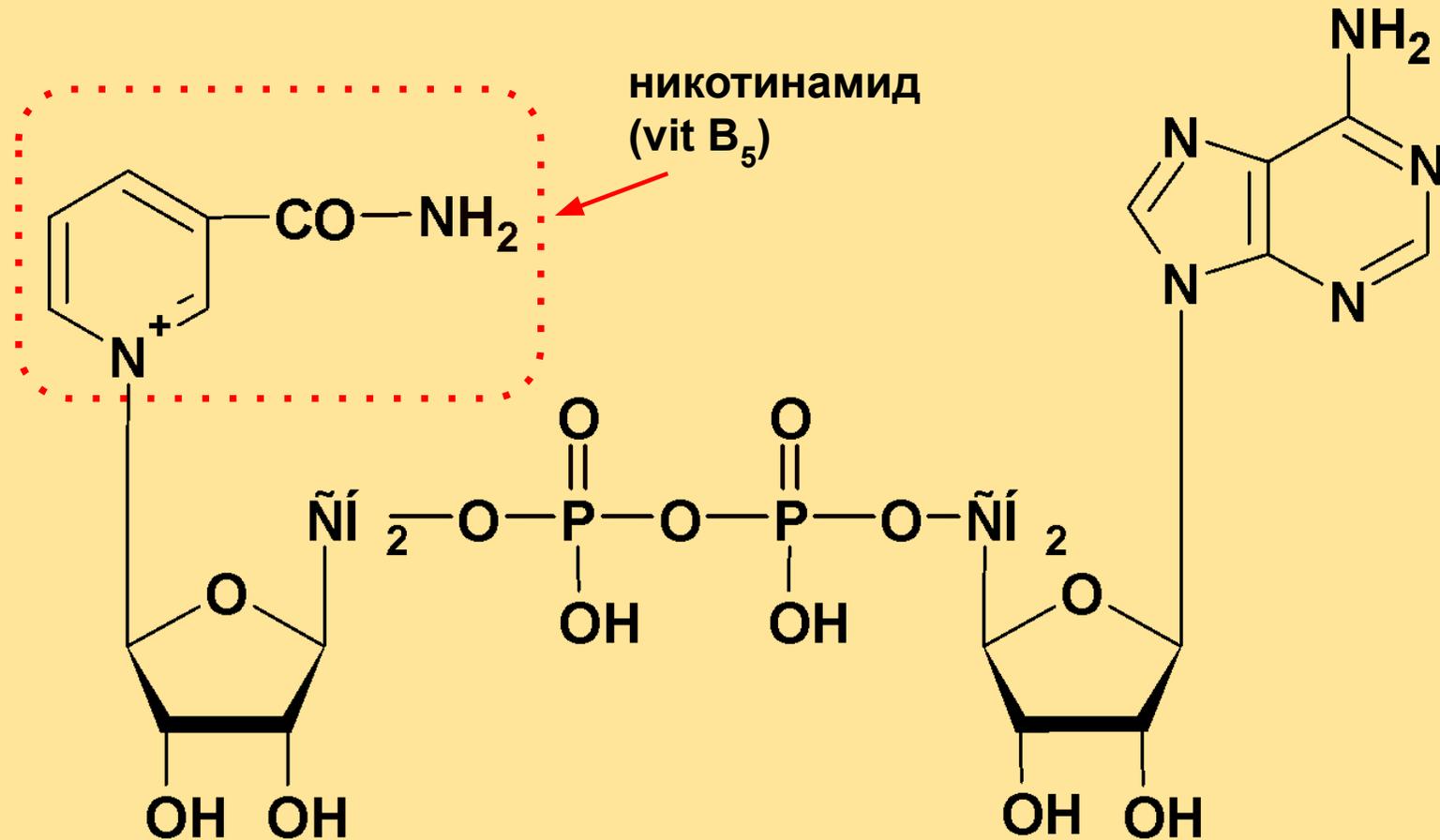
КоQ (коэнзим Q, убихинон)



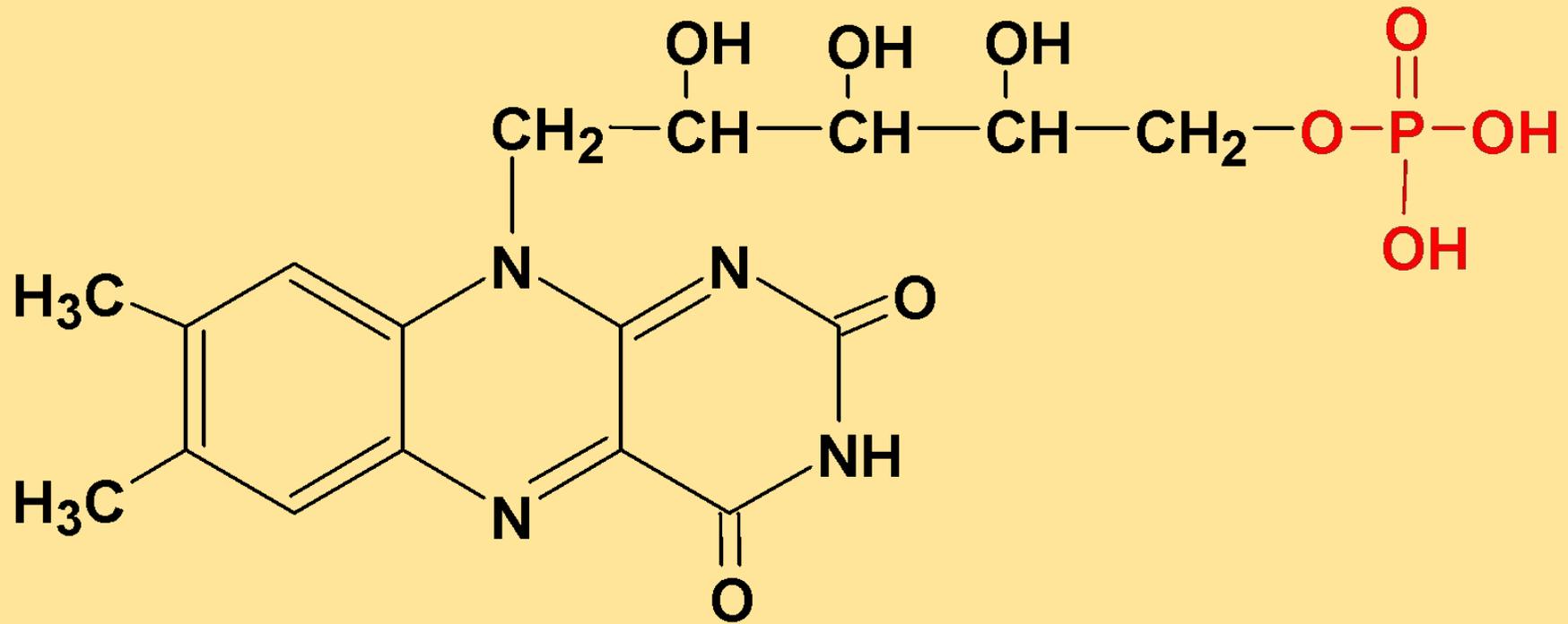
Тиаминпирофосфат (ТПФ)



Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺)



Флавинмононуклеотид (ФМН)



По выполняемым функциям

- 1. Переносчики протонов и электронов (НАД, ФАД, Ко Q);**
- 2. Переносчики групп (ТПФ, ПФ, КоА);**
- 3. Коферменты синтеза и изомеризации**

По механизму действия

1. Коферменты с высоким потенциалом переноса энергии (переносчики энергии);
2. Коферменты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях;
3. Коферменты, формирующие активный центр фермента.

**Единицы измерения
количества и активности
фермента**

$$1 \text{ ME} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного S}}{1 \text{ мин}}$$

**nME – количество единиц
активности**

$$nME = \frac{\text{Кол-во превращенного S (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

Катал

$$1 \text{ катал} = \frac{1 \text{ моль превращенного } S}{1 \text{ секунда}}$$

Связь международной единицы ферментативной активности с каталом

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль S/с} = 60 \text{ моль S/мин} = 60 \times 10^6 \text{ мкмоль/мин} = 6 \times 10^7 \text{ ME},$$

$$1 \text{ ME} = 1 \text{ мкмоль/мин} = 1/60 \text{ мкмоль/с} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}.$$

Применение ферментов в медицине

Энзимодиагностика – определение активности ферментов в природном биоматериале (кровь, моча, спинномозговая жидкость, слюна, кишечный сок) с целью диагностики.

Требования к ферментам в энзимодиагностике

- органоспецифичность (тканеспецифичность);
- выход фермента в кровь при повреждении органа или ткани;
- низкая активность фермента в крови в норме.

Условно различают

- *неспецифические ферменты* – присутствуют во всех тканях в разных количествах;
- *тканеспецифические ферменты* – присутствуют в конкретных тканях или органах.

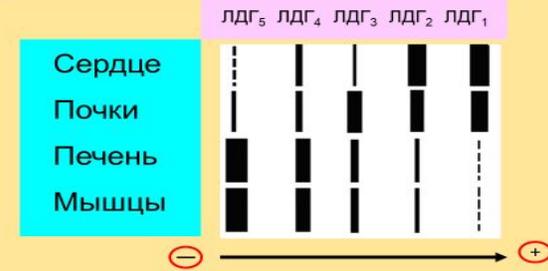
По локализации в клетке различают цитоплазматические, митохондриальные, ядерные, лизосомные ферменты.

При **воспалительных процессах** повышается проницаемость мембран и в крови обнаруживаются **цитоплазматические ферменты**.

При **некрозе ткани** (разрушение клеток) в крови определяют **митохондриальные ферменты**.

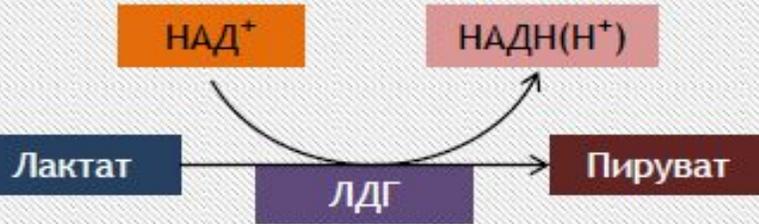


Изоферменты ЛДГ



ПЕЧЕНЬ

Происходит окисление лактата до пирувата.

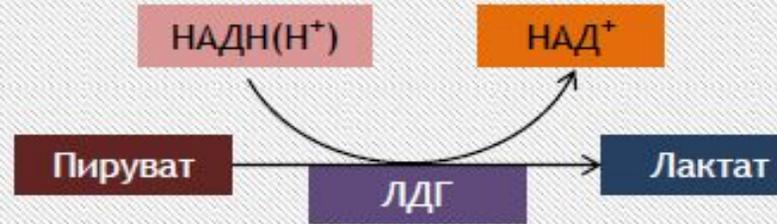


Печеночные изоферменты (М-субъединицы 4 и 5):



МЫШЦА

Происходит восстановление пирувата в лактат.



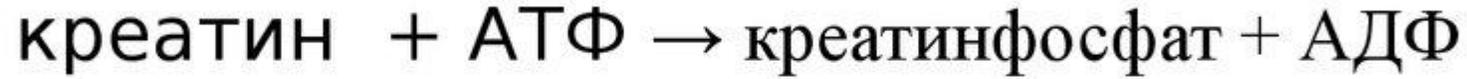
Сердечные изоферменты (Н-субъединицы 1 и 2):



Неспецифические ферменты могут быть представлены в тканях различными *изоформами*

Изоформы в диагностике

- **Креатинкиназа** (КК)



Назовите класс фермента!

- Креатинфосфат – энергетический субстрат в мышечной и нервной тканях
- Олигомерный белок: димер из субъединиц 2-х типов

Мозг **миокард**

мышцы



КК-1



КК-2



КК-3

B - Brain, мозг

M - Muscle, мышца

Энзимотерапия – использование ферментов в качестве лечебных средств (хирургия, терапия, акушерство, гинекология, урология, стоматология, отоларингологии и д.).

- **Трипсин и химотрипсин** не атакуют живые клетки, а расщепляют белки мертвых клеток, что используется для лечения гнойных ран, ожогов, отморожений, пролежней и др.
- Ферменты крови **плазмин, урокиназу** применяют для предотвращения тромбообразования, т.к. они быстро разрушают тромб.
- Заместительную энзимотерапию проводят при отсутствии ферментов в организме (наследственном или приобретенном), используют при лечении заболеваний ЖКТ.