

Лекция 3. Статическая биохимия

Ферменты

*Строение, свойства, механизм
действия*

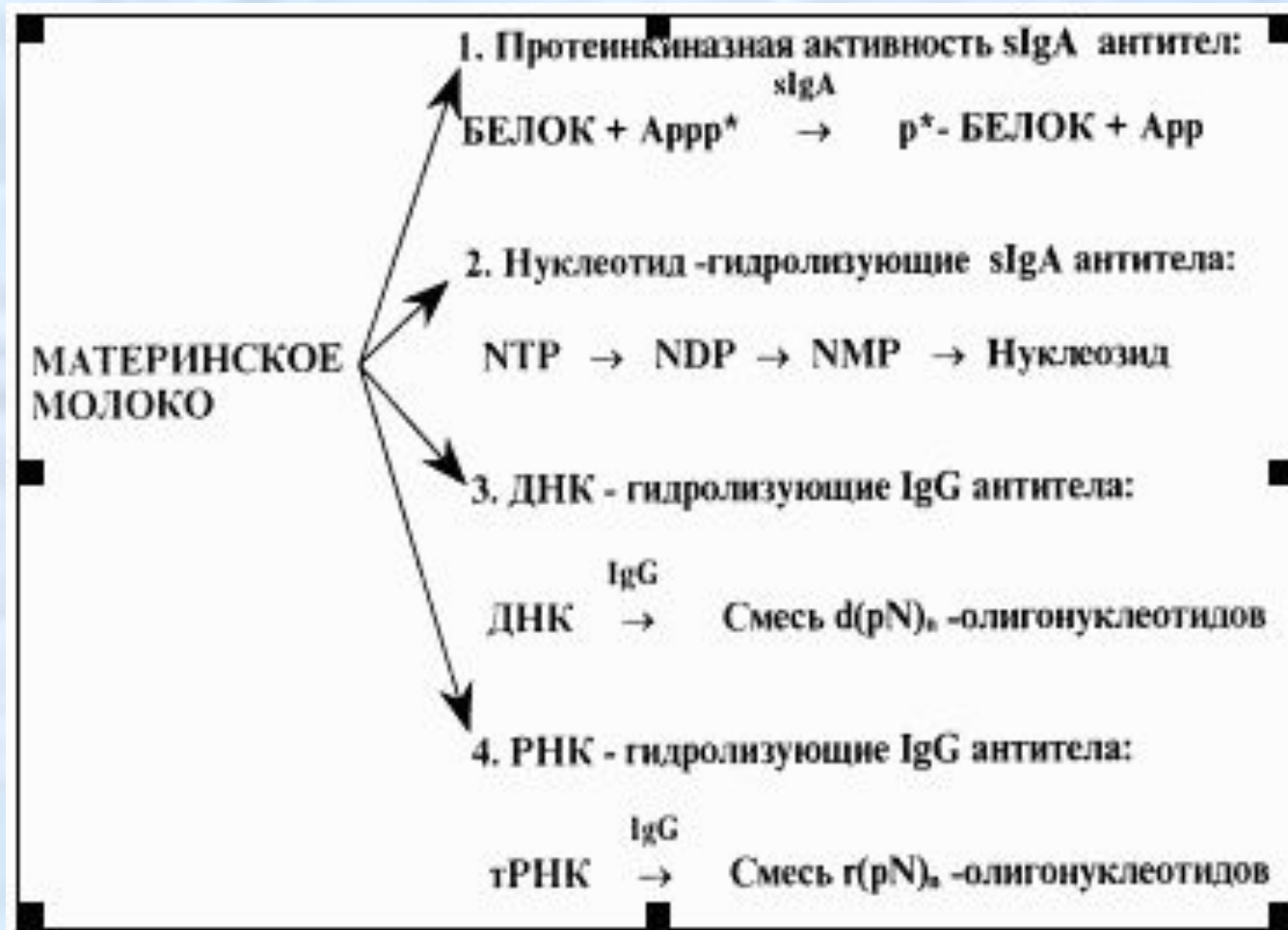
Понятие о ферментах

Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых **ферментами**, или **энзимами**.

Слово «фермент» происходит от лат. *fermentum* – закваска, а «энзим» – от греч. *en* – в, внутри и *zyme* – дрожжи.

В настоящее время известно более 3700 ферментов.

Идея W. Jencks (1969) о способности белков-антител катализировать химические реакции была подтверждена в конце 80-х годов прошлого века. Были введены термины **«каталитические антитела»** или **«абзимы»** (от **antibody enzyme**). В настоящее время известны несколько классов химических реакций, катализируемых антителами: ацилтрансферазные, изомеразные, бимолекулярной ассоциации и окислительно-восстановительные.



Молоко здоровых женщин содержит каталитически активные антитела с протеинкиназой, АРТ-, ДНК- и РНК- гидролизующей активностями.

<http://www.nsc.ru/win/sbras/rep/96/biol96.html>

Каталитические РНК (рибозимы) были описаны в 80-х годах прошлого века (Т.Р. Chech et al., 1981; С. Guerrier-Takada et al., 1983). Рибозимы достаточно широко представлены в природе и играют важную роль в эволюции живых организмов, поскольку они могут обеспечивать репродукцию и процессинг РНК без участия белков-ферментов. В частности, рибозимы участвуют в удалении неинформативных интронов из пре-м-РНК, на этапе синтеза белков путем созревания тРНК с помощью рибонуклеазы Р РНК, а также в процессе саморепликации вирусного РНК генома (патогенные вирусы для растений и человека). Ранее неоднократно сообщалось, что синтез белка в рибосомах зависит от уровня рРНК.

Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что ферменты:

- 1) катализируют только энергетически возможные реакции, т. е. те реакции, которые могут протекать и без них;
- 2) не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов реакции;
- 3) не сдвигают равновесие обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление;
- 4) не расходуются в процессе реакции и выходят из реакции в первоначальном виде.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов заключаются в том, что:

- 1) Ферменты (большинство белковой природы) катализируют реакции в очень мягких условиях (давление 1 атм., нейтральная рН, $\approx 37^\circ\text{C}$);
- 2) Ферменты обладают физико-химическими свойствами, характерными для белков: высокой молекулярной массой, амфотерностью, не способны к диализу, подвергаются высаливанию и денатурации.
- 3) Для ферментов характерна более высокая эффективность. Например, энергия активации разложения перекиси водорода $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$ равна 75,2 кДж/моль. При добавлении неорганического катализатора платины энергия активации снижается до 50,2 кДж/моль. Фермент каталаза снижает энергию активации до 8,3 кДж/моль.

- 4) активность ферментов в клетках строго регулируется как на генетическом уровне (на этапе синтеза белка-фермента и его фолдинга), так и посредством определённых низкомолекулярных соединений (субстратов, продуктов реакции и других низкомолекулярных эффекторов);
- 5) Ферменты *обладают субстратной и каталитической специфичностью.*

Различают 4 вида субстратной специфичности ферментов:

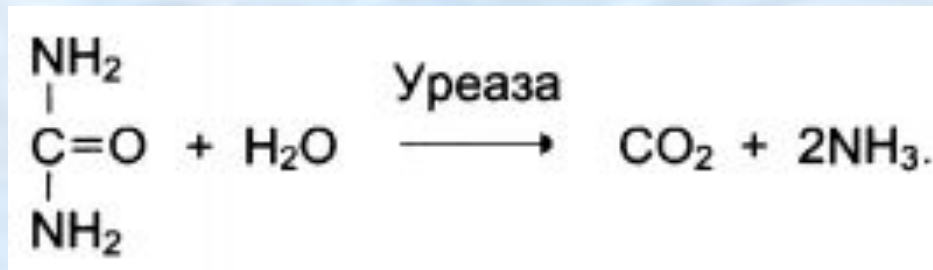
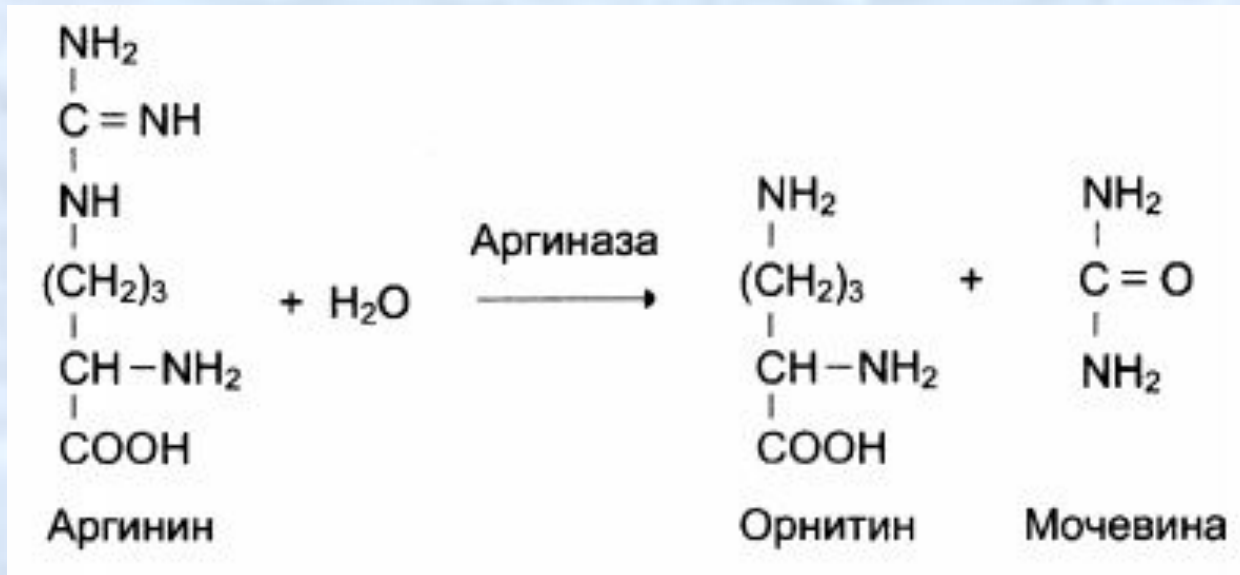
Абсолютная специфичность

Относительная специфичность

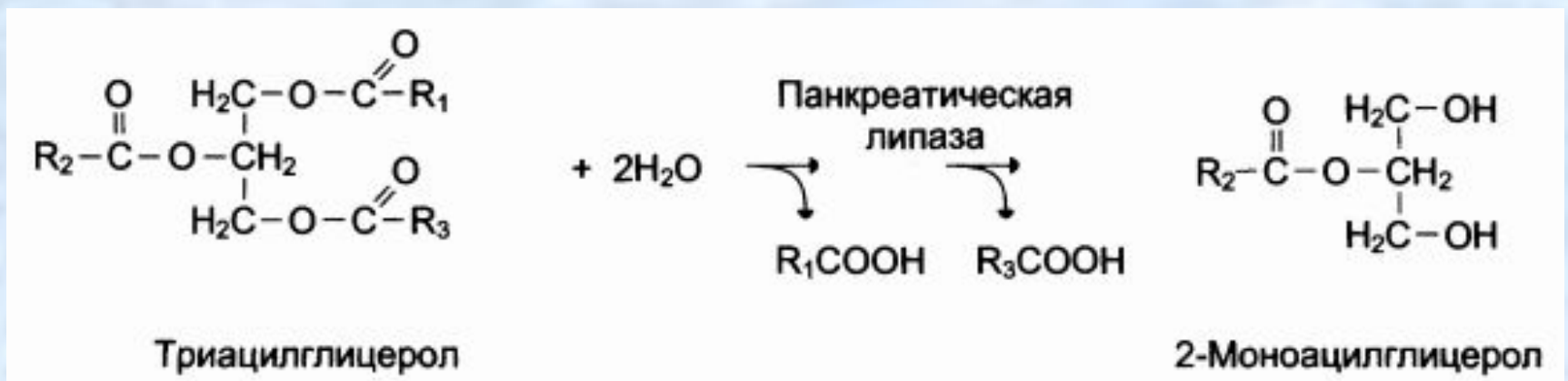
Относительная групповая специфичность

Стереохимическая специфичность

Абсолютная специфичность – фермент катализирует превращение только *одного субстрата*. Например, аргиназа расщепляет аргинин, уреаза – мочевину.

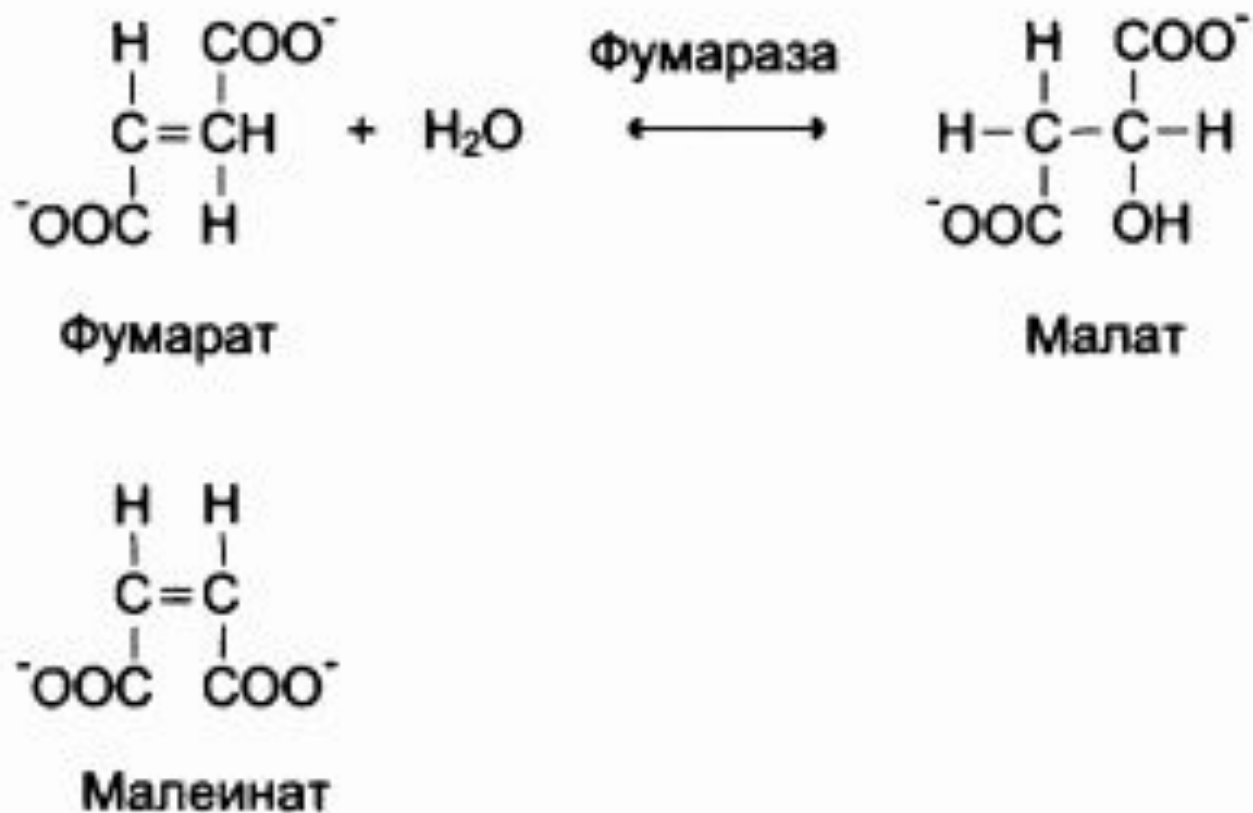


Относительная специфичность – фермент расщепляет определенный *тип связи*. Например, липаза гидролизует жиры по месту сложноэфирной связи на глицерин и жирные кислоты.



Относительная групповая специфичность – фермент расщепляет определенный тип связи, но в ее образовании участвуют определенные функциональные группы. Такие ферменты обычно участвуют в процессе пищеварения. Например, пищеварительные ферменты гидролизующие пептидную связь в белках относятся к протеиназам (*относительная специфичность*), но среди них пепсин расщепляет пептидную связь, образованную аминогруппой ароматических аминокислот; трипсин – пептидную связь, образованную карбоксильной группой основных аминокислот, а химотрипсин – карбоксильной группой ароматических аминокислот (*относительная групповая специфичность*).

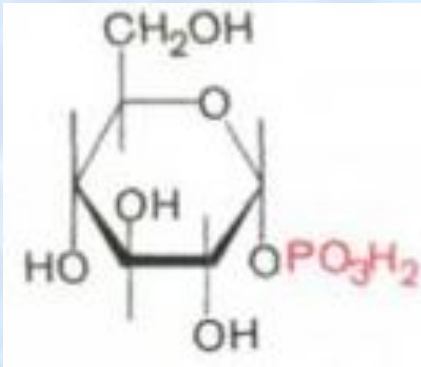
Стереохимическая специфичность – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера. Например, большинство ферментов специфичны к D-сахарам и L-аминокислотам; существует цис-транс специфичность.



КАТАЛИТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

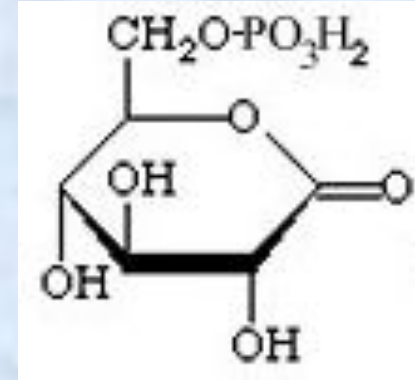
ФЕРМЕНТОВ

Фосфоглюкомутаза



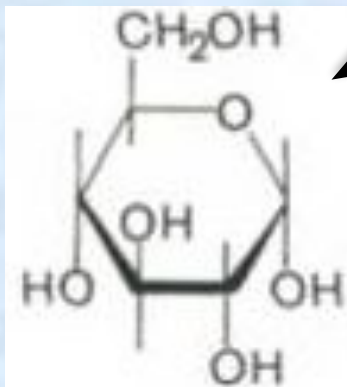
Глюкозо-1-фосфат

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа

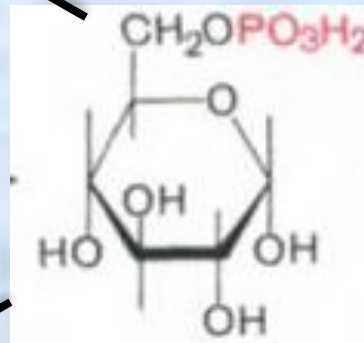


6-фосфоглюконолактон

Глюкозо-6-фосфатаза

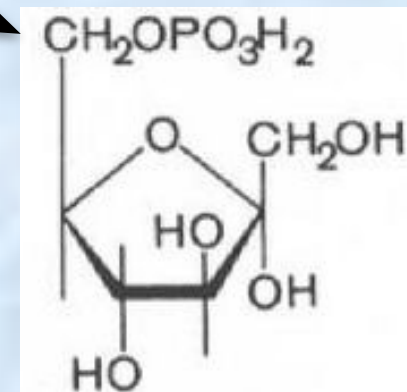


Глюкоза



Глюкоза-6-фосфат

Фосфоглюкоизомераза



Фруктоза-6-фосфат

6. В организме действуют, как правило, **полиферментные системы**, в результате чего происходит многоэтапное превращение вещества с допустимыми для организма перепадами энергии.

Полиферментные системы (комплексы) представляют собой несколько ферментов, катализирующих ряд согласованных реакций, причем конечные продукты одной ферментативной реакции являются субстратами для следующей. Различают три типа полиферментных комплексов:

- а) ферменты растворены в цитоплазме и контакт субстратов с ними осуществляется посредством диффузии;
- б) ферменты соединены друг с другом за счет белок-белковых взаимодействий;
- в) ферменты соединены друг с другом и иммобилизованы на внутриклеточных или цитоплазматических мембранах.

Классификация и номенклатура ферментов

1. Ферменты называются добавлением суффикса *-аза* к названию субстрата, на который данный фермент действует. Например, уреаза катализирует гидролиз мочевины; ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы амилазами; гидролизующие жиры (липос) – липазами; фермент, гидролизующие белки (протеины) – протеиназами.
2. Используются названия для групп ферментов, катализирующих сходные по механизму реакции. Их название строится по принципу – «субстрат-тип реакции». Например, ферменты, которые переносят остаток фосфорной кислоты от АТФ на другую молекулу, называются киназами (глюкокиназа катализирует перенос остатка глюкозы от АТФ на глюкозу).
3. Тривиальные названия не показывают механизма действия, но они широко используются. Например, пепсин, трипсин и др.
4. Международный Совет Биохимиков (IUB) предложил систематическое название и классификацию ферментов по типу и механизму катализируемой реакции

Характеристика отдельных классов ферментов

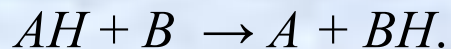
Международная классификация ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)
4	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6	Лигаза (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей С–С, С–О, С–S и С–N, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

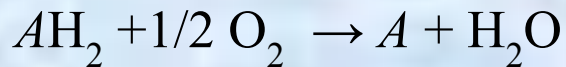
Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции)

Катализируют различные окислительно-восстановительные реакции с участием 2 субстратов (перенос электронов или атомов водорода с одного субстрата на другой).

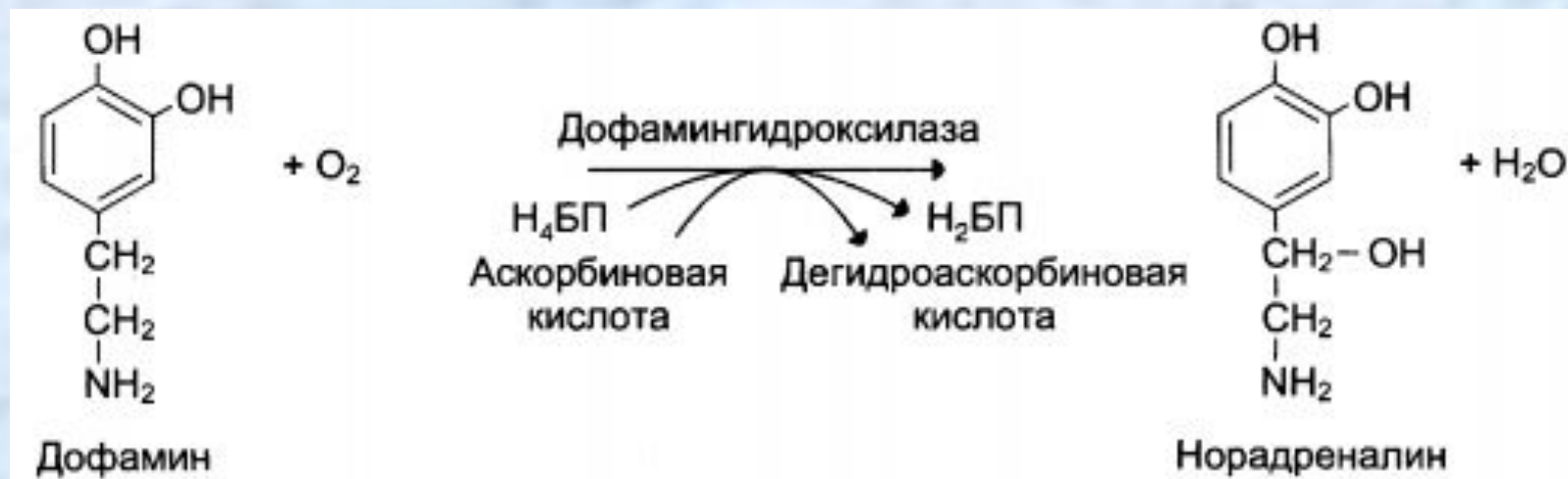
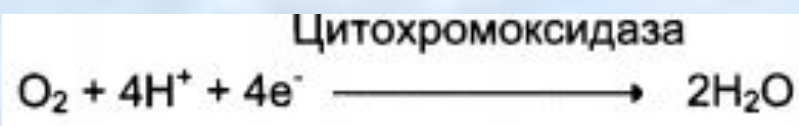
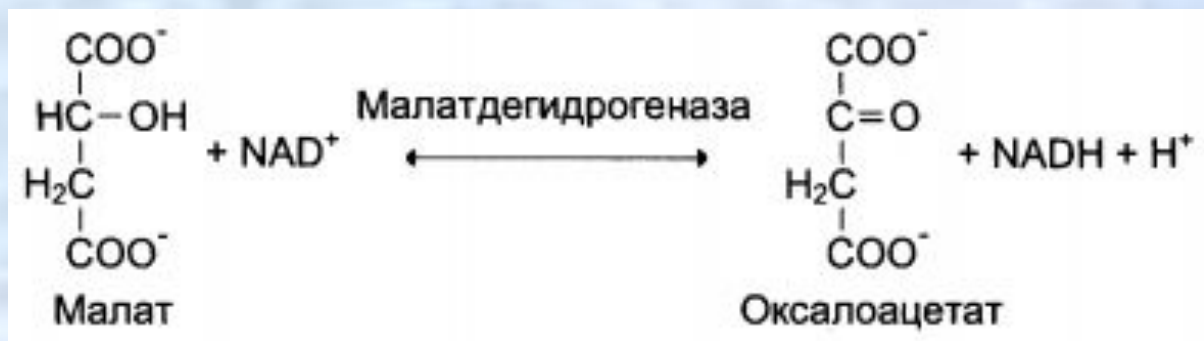
Дегидрогеназы – реакции дегидрирования (перенос атома водорода от одного субстрата на другой, акцепторы - NAD^+ , NADP^+ , FAD , FMN) (Пр.: малат-дегидрогеназа):



Оксидазы катализируют перенос водорода с субстрата на кислород (Пр: цитохромоксидаза):

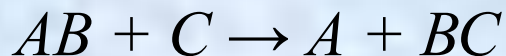


Гидроксилазы и оксигеназы ускоряют некоторые реакции биологического окисления, протекающие с присоединением гидроксила или кислорода к окисляемому веществу.



Трансферазы (перенос функциональных групп)

Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому. Подразделяют в зависимости от переносимой группы.



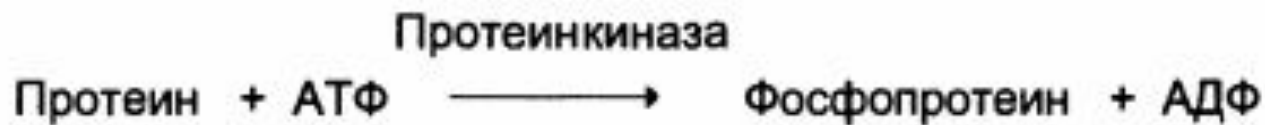
Метилтрансферазы переносят метильную группу,

Ацилтрансферазы – кислотный остаток (ацил),

Гликозилтрансферазы – моносахаридный остаток (гликозил),

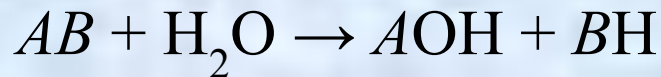
Аминотрансферазы – аминную группу,

Киназы(фосфотрансферазы) – остаток фосфорной кислоты (фосфорил).



Гидролазы (реакции гидролиза)

Ускоряют реакции гидролиза (расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва), при которых из субстрата образуются 2 продукта. К гидролазам относятся все пищеварительные ферменты:

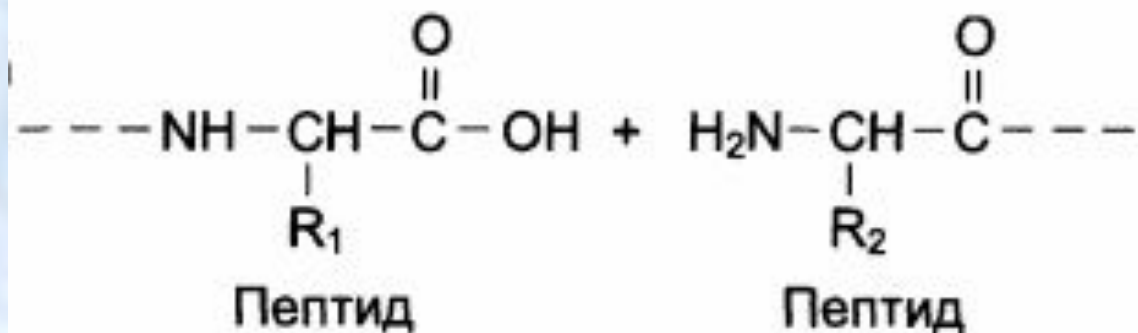
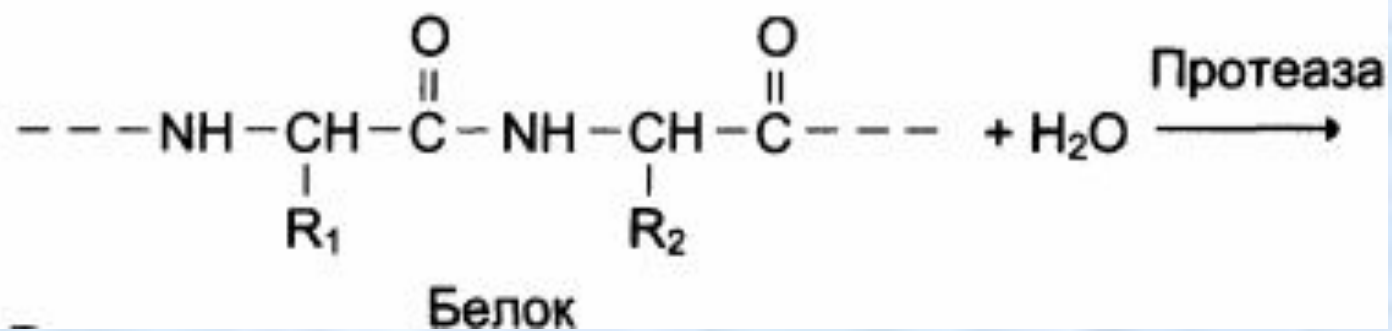


Эстеразы ускоряют гидролиз сложных эфиров (различных липидов) на спирты и кислоты.

Фосфатазы катализируют гидролитическое отщепление фосфорной кислоты от нуклеотидов и фосфорных эфиров углеводов.

Глюкозидазы ускоряют гидролиз сложных углеводов.

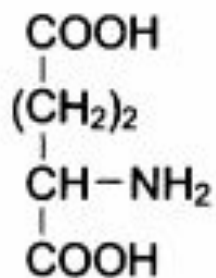
Пептидгидролазы ускоряют гидролиз пептидных связей в белках и пептидах.



Лиазы

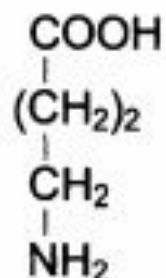
Лиазы ускоряют отщепление от субстратов негидролитическим путем определенных групп (CO_2 , H_2O , NH_2 , SH_2 и др.), либо присоединение чаще всего молекул воды по двойной связи. При этом могут разрываться связи:

$\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{S}$.

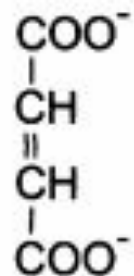


Глутаминовая кислота

Глутаматдекарбоксилаза

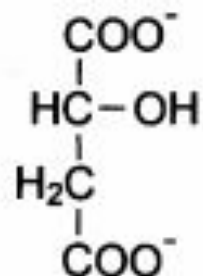


γ -Аминomásляная кислота (ГАМК)



Фумарат

Фумаратгидратаза (фумараза)

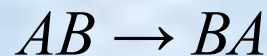


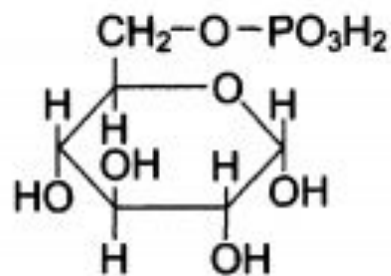
Малат

Изомеразы (реакции изомеризации)

Катализируют превращения различных типов оптических, геометрических и позиционных изомеров друг в друга. Название этих ферментов составляется с учетом типа реакции:

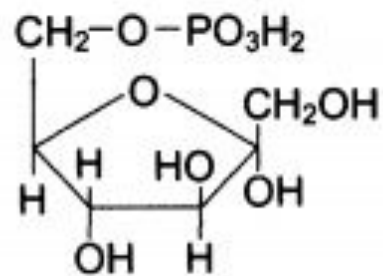
"Субстрат-цис-транс-изомераза (например транс-ретиаль - 11 цис-транс изомераза катализирует превращения транс-ретиала в 11-цис-ретиаль при восприятии света); "альдегид-кетон-изомераза" (D-глицеральдегид-3-фосфаткетон-изомераза катализирует превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в дигидроксиацетонфосфат); если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, то фермент получает название мутазы. К классу изомераз относят так же рацемазы и эпимеразы. Внутримолекулярные перестройки:



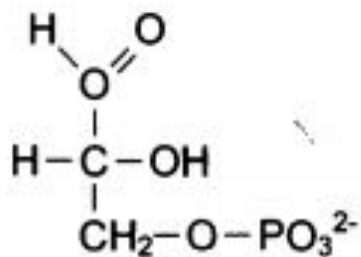


Глюкозо-6-фосфат

Фосфоглюкоизомераза

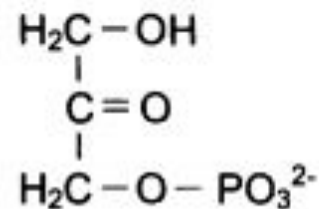


Фруктозо-6-фосфат

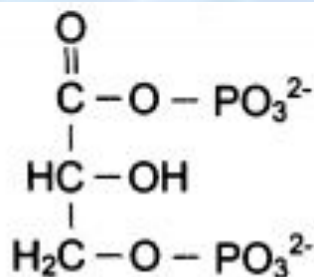


Глицеральдегид-3-фосфат

Триозофосфатизомераза

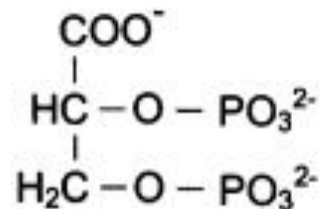


Дигидроксиацетонфосфат



1,3-Бисфосфоглицерат

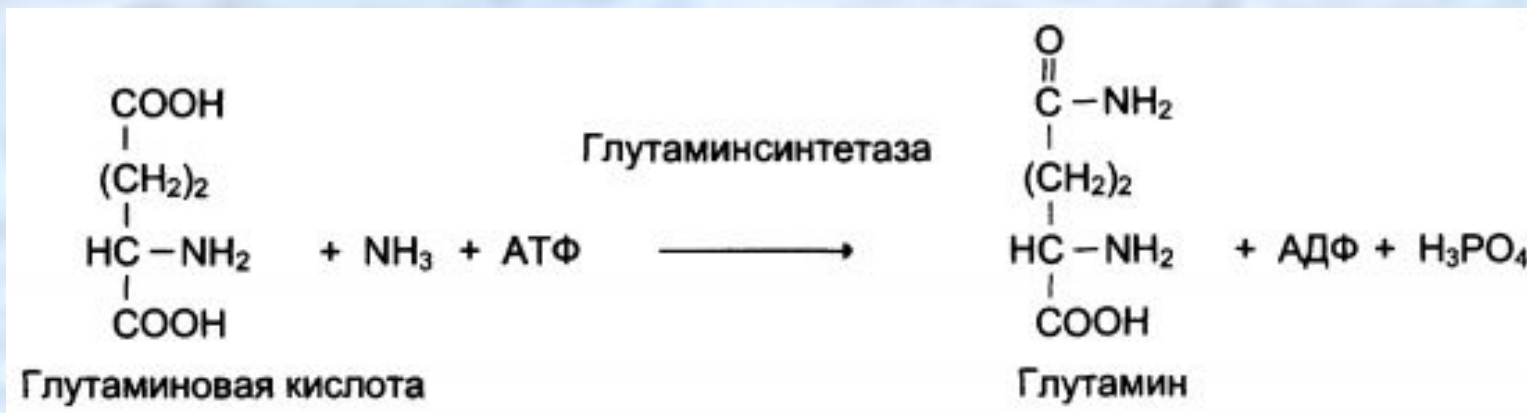
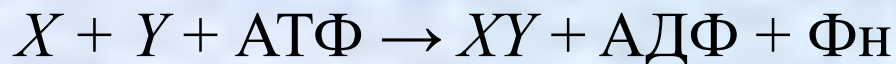
Дифосфоглицератмутаза



2,3-Бисфосфоглицерат

Лигазы (образование связей за счет АТФ)

Лигазы катализируют реакции синтеза высокомолекулярных полимеров из мономеров за счет энергии гидролиза АТФ:



Каждый фермент имеет *специальный шифр*, состоящий из 4-х кодовых чисел, разделенных точками; первая цифра характеризует класс реакции, вторая – подкласс, третья – подподкласс, четвертая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, лактатдегидрогеназа имеет шифр 1.1.1.27, т.е. фермент относится к 1-му классу (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН-ОН-группировки в качестве доноров атомов водорода), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит никотинамидадениндинуклеотид) и занимает 27-ю позицию в перечне ферментов упомянутого подкласса.

Название класса указывает на тип химической реакции, катализируемой ферментами. Классы делятся на подклассы, а те, в свою очередь, на подподклассы. Подкласс уточняет действие фермента, т.к. указывает на природу химической группы субстрата, атакуемой ферментом. Подподкласс уточняет природу атакуемой связи субстрата или природу акцептора, который участвует в реакции. *Дополнительная информация*, если она необходима для уточнения, заключается в скобки. Например, фермент, катализирующий реакцию $L\text{-малат} + \text{НАД}^+ = \text{пируват} + \text{CO}_2 + \text{НАДН} + \text{H}^+$ называется L-малат: НАД⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

Структура ферментов



Важнейшие коферменты и простетические группы ферментов (производные витаминов)

Наименование	Участвующий витамин	Группы, подлежащие переносу
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD, NADP)	Никотинамид, витамин PP	Атомы водорода (электроны)
Флаavinмононуклеотид, рибофлавинфосфат (FMN, FAD)	Рибофлавин, витамин B ₂	Атомы водорода (электроны)
Коэнзим А (CoA)	Пантотеновая кислота	Ацильные, ацетильные и др. группы
Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФ)	Фолиевая кислота	Метильные, метиленовые, формильные группы или форминогруппы (одноуглеродные остатки)
Биоцитин	Биотин, витамин H	Двуокись углерода (активная форма CO ₂)
Тиаминдифосфат (ТДФ)	Тиамин, витамин B ₁	Альдегиды и кетоны
Пиридоксальфосфат (ПФ)	Пиридоксин, витамин B ₆	Аминогруппы Карбоксильные группы
Дезоксиаденозил–(метил)–кобаломинаминокобаламин (B ₁₂ – коферменты)	Цианкоаломин, витамин B ₁₂	Атомы водорода, протоны и электроны

Невитаминные кофакторы

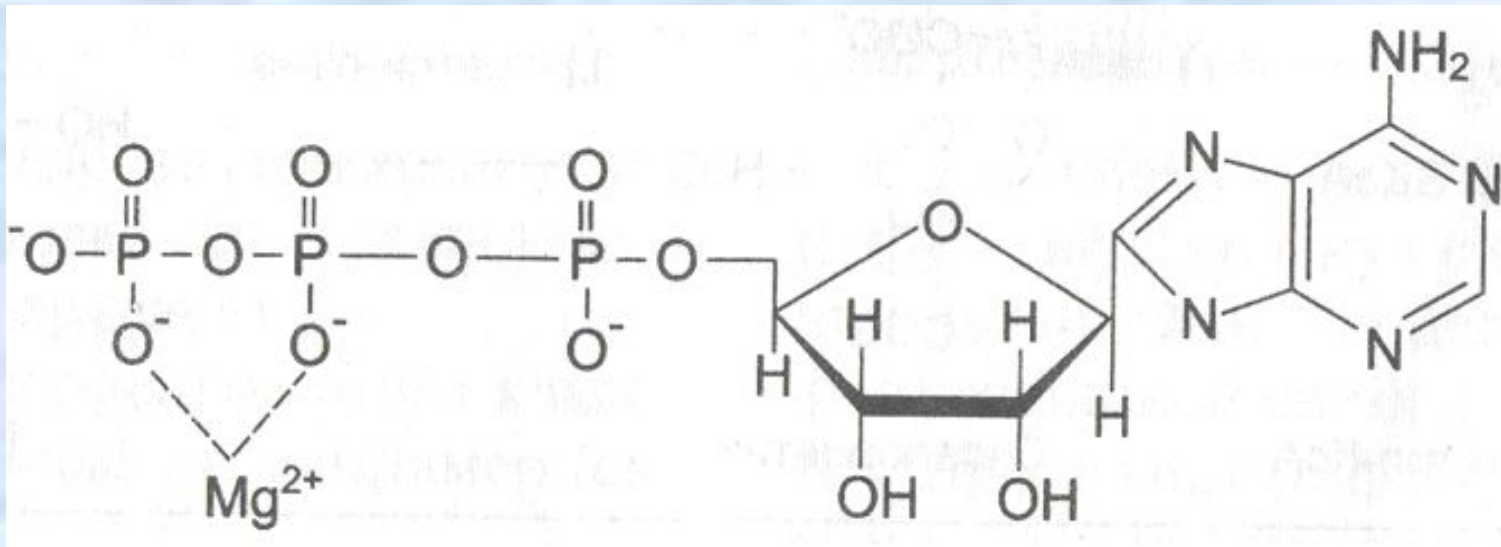
К невитаминным кофакторам относят следующие соединения:

- HS-глутатион,
- АТФ,
- липоевая кислота,
- производные нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозинфосфосульфат),
- порфиринсодержащие вещества,
- тРНК, которые в составе ферментов аминоксил-тРНК-синтетаз принимают активное участие в транспорте аминокислот к рибосоме, где осуществляется синтез белка.

Роль металлов в функционировании ферментов

1. Ионы металла выполняют *функцию стабилизаторов* молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур:
 - а) ионы металлов – стабилизаторы молекулы субстрата;
 - б) ионы металлов – стабилизаторы активного центра фермента;
 - в) роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента;
2. Ионы металлов могут принимать непосредственное *участие в акте катализа*:
 - а) участие в электрофильном катализе;
 - б) участие в окислительно-восстановительных реакциях;
3. Роль металлов в *регуляции активности* ферментов.

Роль металлов в функционировании ферментов

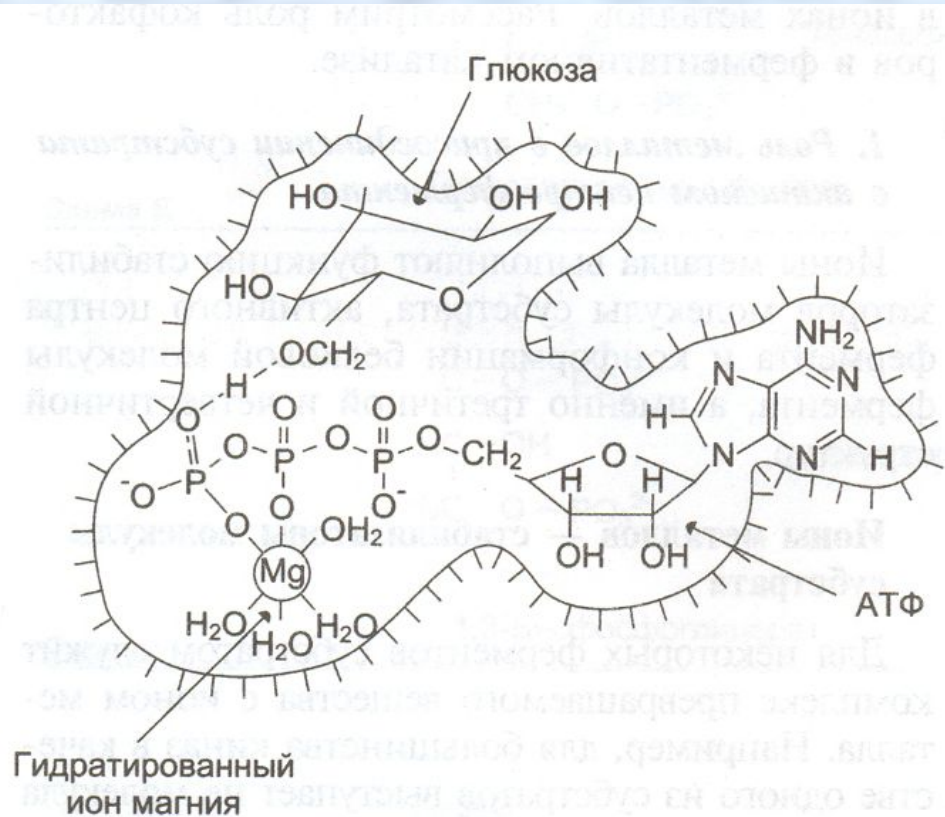


Структура АТФ

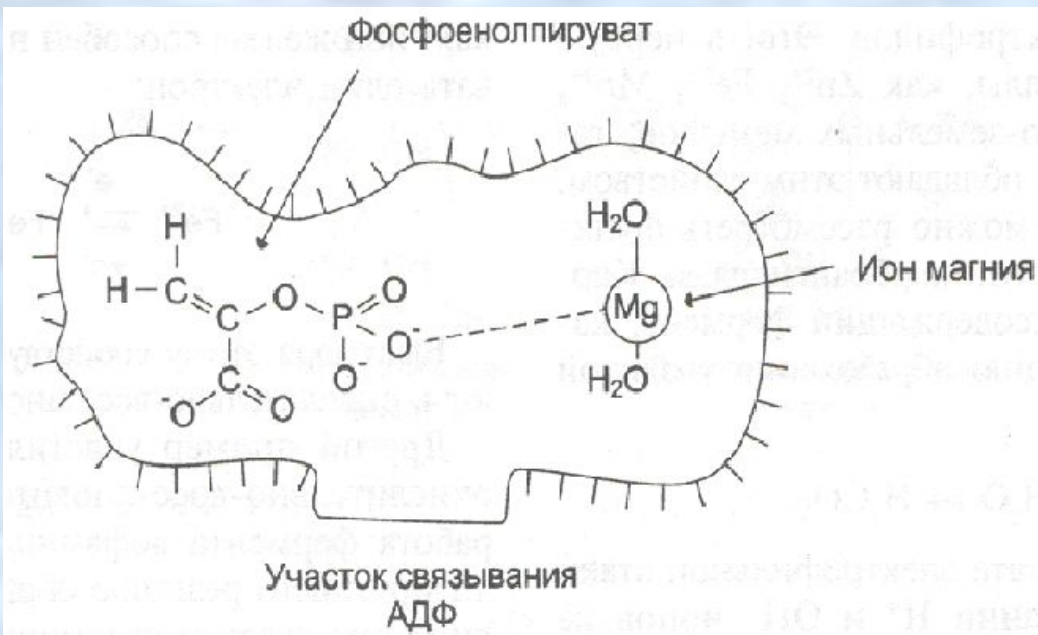
Роль металлов в функционировании ферментов

Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре гексокиназы.

В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса Mg^{2+} -АТФ. В результате ферментативной реакции происходит перенос конечного, γ -фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата

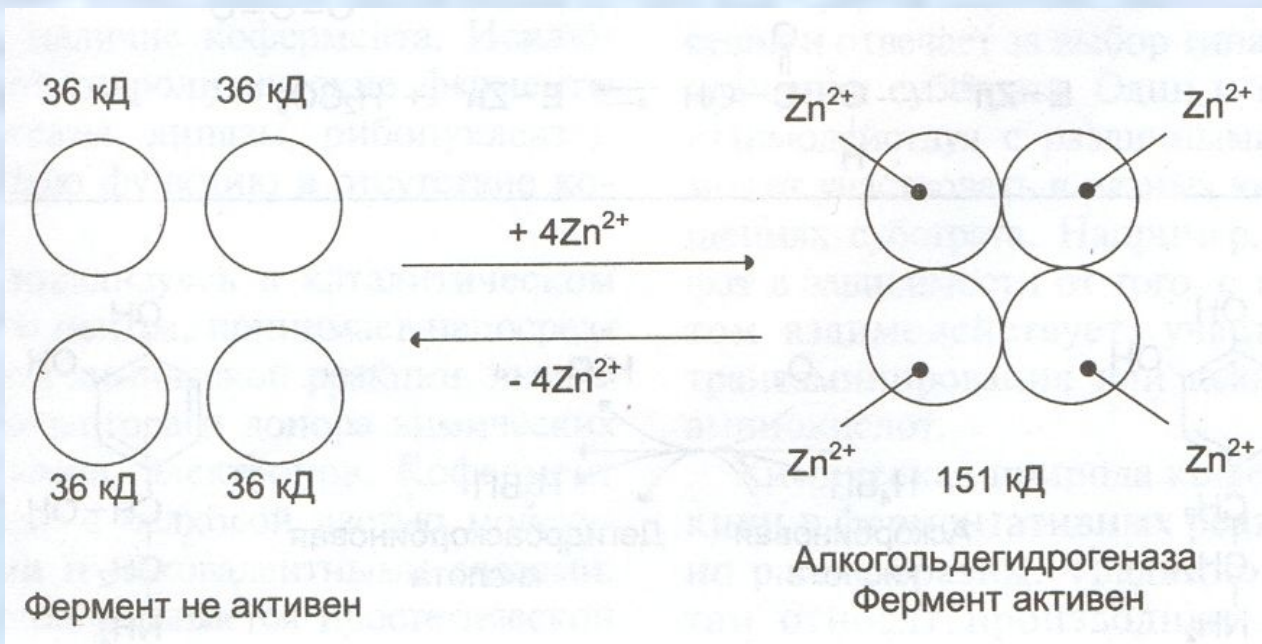


Роль металлов в функционировании ферментов



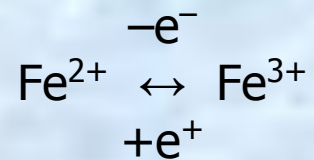
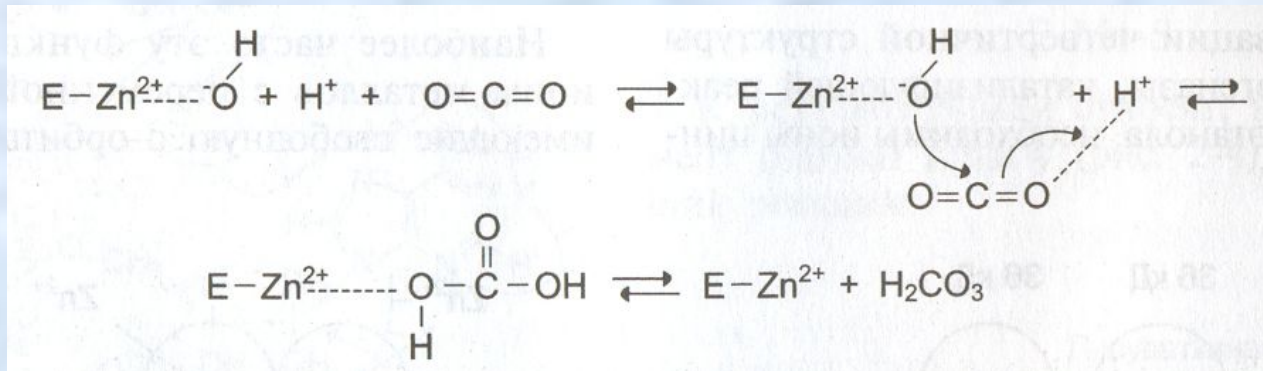
Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре пируваткиназы. Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и АДФ. Mg^{2+} участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоенолпирувата. В ходе ферментативной реакции образуются пируват и АТФ.

Роль металлов в функционировании ферментов



Роль ионов цинка в стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы

Роль металлов в функционировании ферментов



Функциональная организация ферментов

В трехмерной структуре фермента выделяют несколько участков, несущих определенную функцию. В молекуле фермента выделяют *активный центр*, т.е. участок с которым связывается субстрат и протекает каталитическая реакция. Характеристика активного центра:

1. Активный центр фермента формируется при образовании *третичной структуры* белка за счет пространственного сближения радикалов аминокислот (чаще сер, гис, тре, цис, глу, асп, арг). Потеря конформации фермента в результате денатурации приводит к разрушению активного центра.

2. Активный центр образуется *боковыми радикалами* аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в первичной структуре. Например, в активный центр химотрипсина входят гис-57, асп-102 и сер-195, а всего фермент образуют 246 аминокислотных остатков. Лизоцим осуществляет разрушение клеточных стенок некоторых бактерий благодаря активному центру, образованному 35, 52, 62, 63, 101 и 108 остатками аминокислот полипептидной цепи, которая включает 129 аминокислот.

3. Активный центр представляет собой полость, щель или карман, который занимает малую область фермента. Большинство ферментов состоят из более, чем 100 аминокислотных остатков, имеют молекулярную массу более 10 кДа и диаметр более 2,5 нм. На область активного центра приходится всего лишь незначительная часть от объема фермента.

4. Активный центр не является жесткой структурой. Его конформация изменяется при связывании субстрата. При связывании субстрата со структурами активного центра обычно не участвует вода, за исключением случаев, когда она является реагентом.

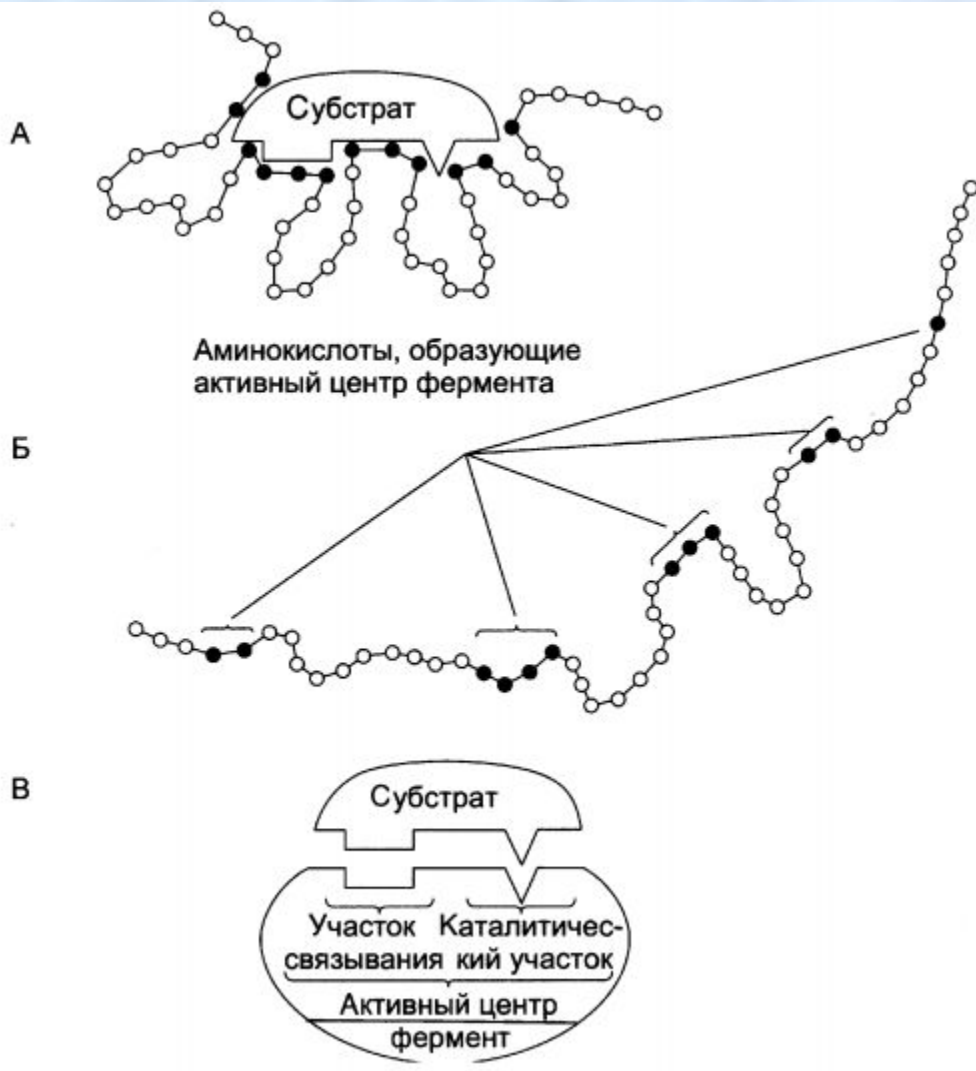
5. У сложных ферментов в состав активного центра входят кофакторы.

6. В активном центре выделяют контактный (якорный) участок, связывающий субстрат и каталитический участок, где происходит превращение субстрата.

Строение активного центра фермента.

А - присоединение субстрата к ферменту в активном центре;
Б – положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка;

В - активный центр фермента условно разделяется на участок связывания и каталитический участок. **Участок связывания** представлен радикалами аминокислот, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата. **Каталитический участок** образован радикалами аминокислотных остатков, функциональные группы которых обеспечивают химическое превращение субстрата.



Структура активного центра молекулы химотрипсина



7. Субстрат связывается с активным центром фермента *не ковалентными* связями. Фермент-субстратные комплексы характеризуются константами равновесия от 10^{-2} до 10^{-8} молей, что соответствует свободной энергии взаимодействия всего от -3 до -12 ккал/моль (от -13 до 50 кДж/моль). Напомним, что для ковалентных связей свободная энергия связи составляет от -50 до -110 ккал/моль (от -210 до -460 кДж/моль).

Кроме активного центра у ряда ферментов имеется *регуляторный*, или *аллостерический* (от греч. allos – иной, чужой) центр, который в молекуле фермента, как правило, пространственно отделен от активного центра. К аллостерическому центру присоединяются вещества – *эффекторы*, которые делятся на *активаторы* и *ингибиторы*. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и/или четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются *аллостерическими*.

Аллостерический центр (или центры) (от греч. allos- другой, иной и steros— пространственный, структурный) — участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эфффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются по структуре от субстратов.

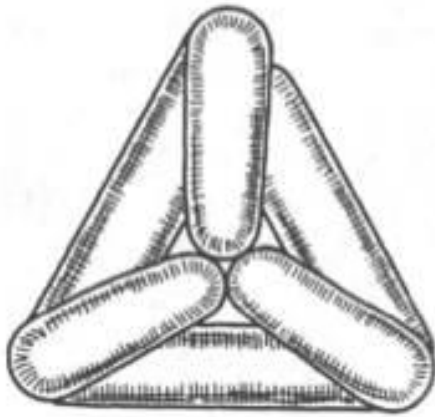
Локализация ферментов в клетке

Цитозоль	Амилаза, Липаза панкреатическая, Глицеро-3-фосфатдегидрогеназа, Гистидаза, Сорбитолдегидрогеназа, Лактатдегидрогеназа, Алкогольдегидрогеназа, Креатинкиназа, Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Аланинаминотрансфераза, Аспартатаминотрансфераза, Гликогенсинтетаза
Митохондрии	Пируватдегидрогеназный комп лекс, Цитратсинтаза, Малатдегидрогеназа, Уроканиназа, Глутаматдегидрогеназа, Креатинкиназа, Ацил-СоА-дегидрогеназа, δ -аминолевулинатсинтетаза, Аспартатаминотрансфераза, Пируваткиназа
Лизосомы	Кислая фосфатаза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, гиалуронидаза, коллагеназа, β -Глюкуронидаза, Арилсульфатаза, Кислая рибонуклеаза, Кислая дезоксирибонуклеаза, Катепсин, α -Маннозидаза
Микросомы	Глюкозо-6-фосфатаза, γ -глутамил транспептидаза, Моноаминоксидаза, Церулоплазмин, Глюкуронидтрансфераза
Ядро	ДНК-полимераза, ДНК-лигаза, Топоизомераза, Эндонуклеаза, РНК-полимераза, Хеликаза, NAD-синтетаза
Клеточная мембрана	Нуклеотидаза, Щелочная фосфатаза, γ -Глутамил транспептидаза, K^+ , Na^+ -АТРаза, Аденилатциклаза

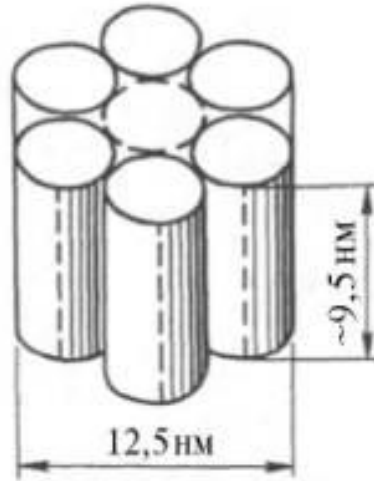
Олигомерные ферменты

Модели строения некоторых олигомерных ферментов:

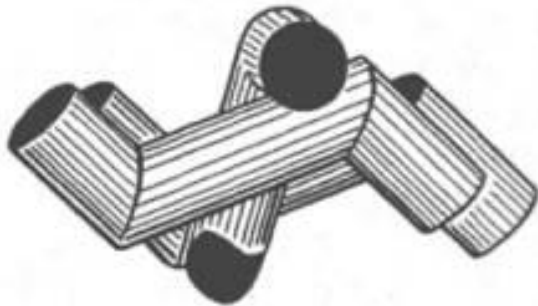
- а* – молекула глутаматдегидрогеназы, состоящая из 6 протомеров (общая мол. м. 336000);
- б* – молекула РНК-полимеразы;
- в* – половина молекулы каталазы;
- г* – молекулярный комплекс пируватдегидрогеназы



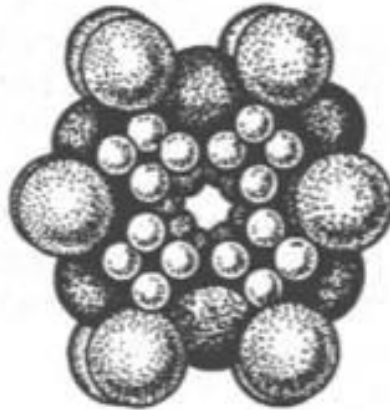
а



б

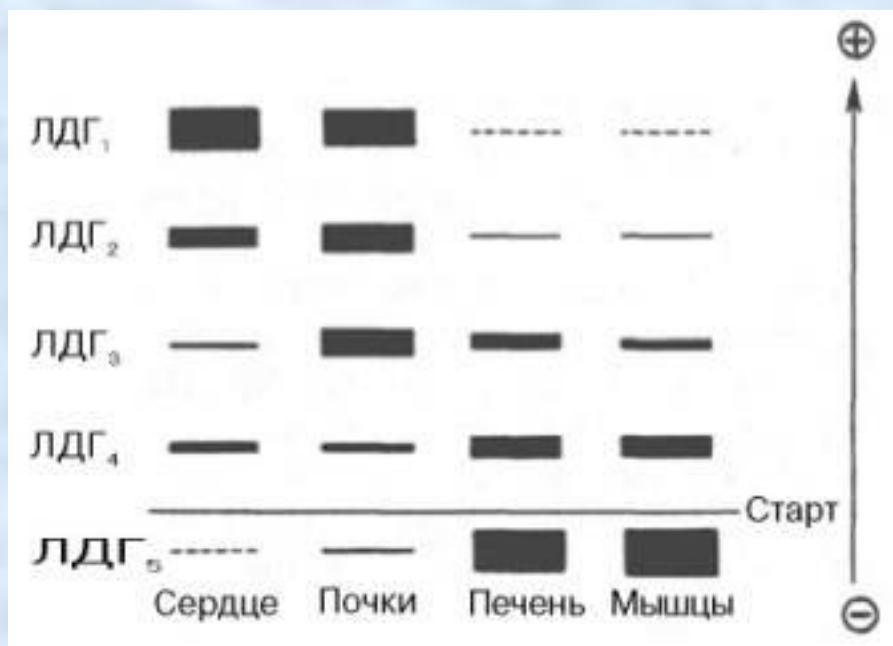


в



г

Изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ)



Распределение и относительные количества изоферментов ЛДГ в различных органах. Экстракты нанесены на линию, отмеченную надписью «Старт». При заданных условиях опыта (рН) 4 изофермента ЛДГ движутся к аноду, а один (ЛДГ₅) к катоду.

Теории и стадии ферментативного катализа



Leonor Michaelis,
1875–1949



Maud Menten,
1879–1960



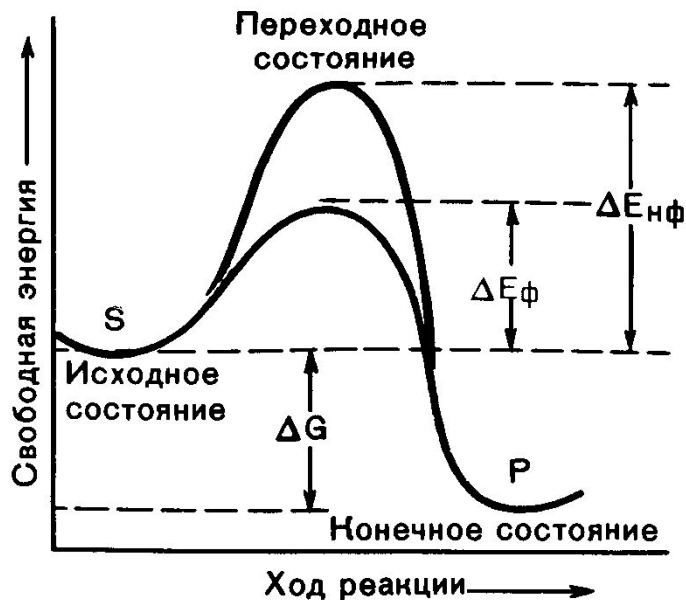
I. Диффузия субстрата к ферменту и стерическое связывание его с активным центром фермента, т. е. образование фермент-субстратного комплекса (ES).

II. Преобразование первичного комплекса в один или несколько активированных фермент-субстратных комплексов (ES*, ES**...).

III. Отделение продуктов (P) реакции от активного центра и диффузия его в окружающую среду.

Механизм действия ферментов

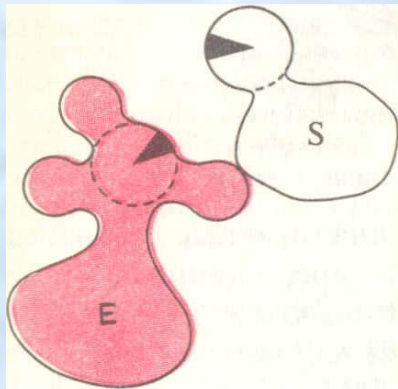
Энергия активации – это дополнительное количество энергии, которое необходимо дать молекуле для преодоления энергетического барьера (или для достижения переходного состояния), т.е. это энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние. Ферменты ускоряют реакцию путем *снижения энергии активации* за счет увеличения числа активизированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.



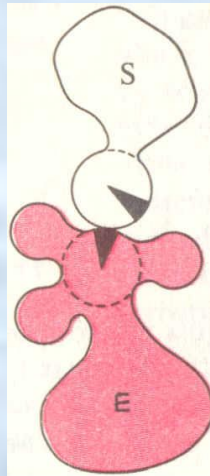
Изменения свободной энергии катализируемой и некатализируемой реакции. S – исходный субстрат; P – продукт; $\Delta E_{нф}$ – энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ – энергия активации ферментативной реакции; ΔG – стандартное изменение свободной энергии.

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

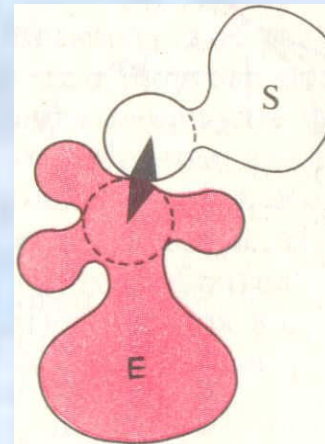
1. Сближение и ориентация



Неправильная ориентация, неправильное сближение



Правильное сближение, неправильная ориентация

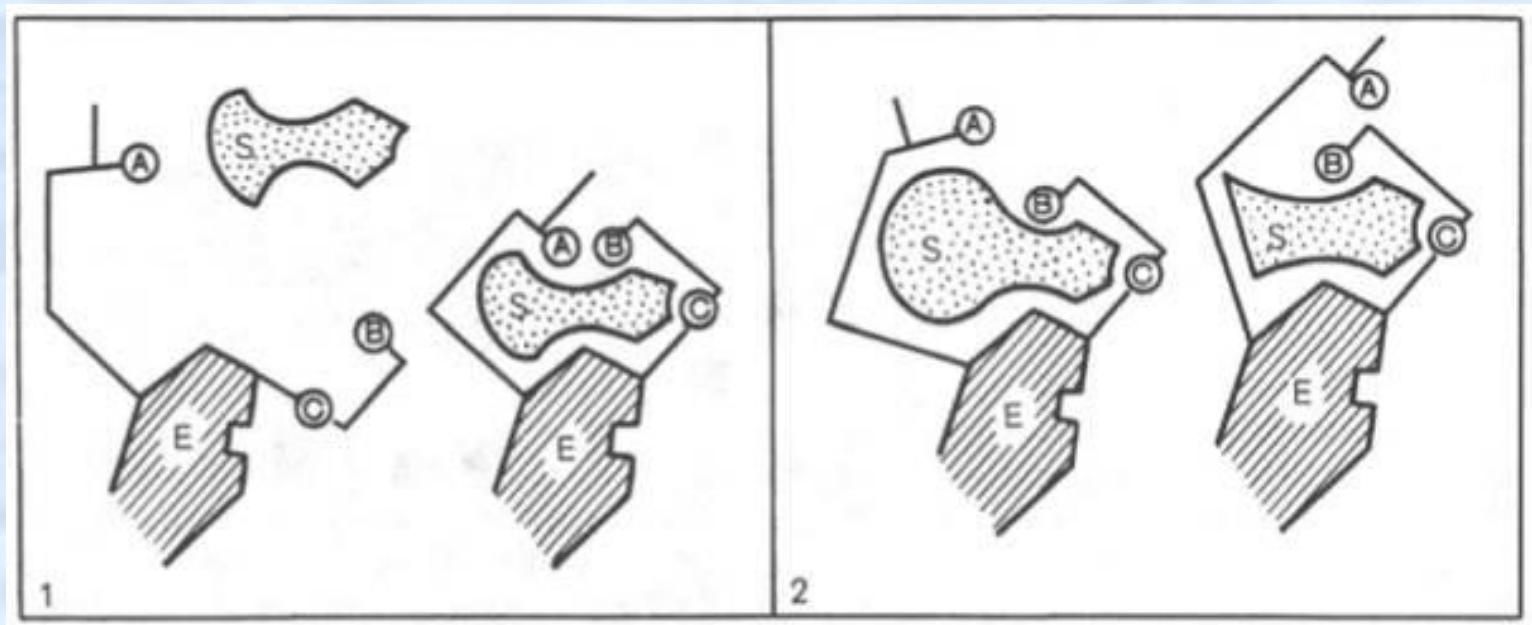


Правильное сближение, правильная ориентация

Схематическое изображение процессов сближения и ориентации при взаимодействии молекулы субстрата S с каталитической группой в активном центре фермента E.

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

2. Напряжение и деформация: индуцированное соответствие



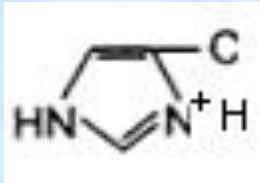
Индуцированное соответствие между активным центром фермента и напряженной формой молекулы субстрата

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

3. Общий кислотно-основный катализ

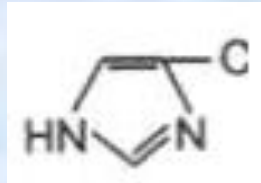
Некоторые протон-донорные группы:

- COOH
- $^+\text{NH}_3$
- SH



Некоторые протон-акцепторные группы:

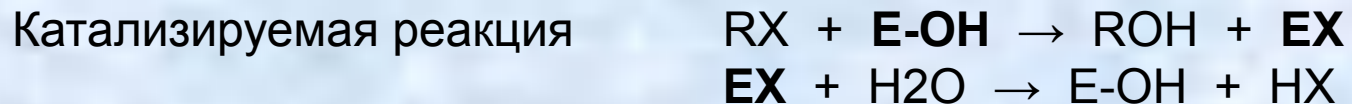
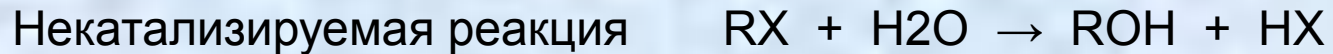
- COO⁻
- NH₂
- S⁻



Многие органические реакции ускоряются донорами или акцепторами протонов, т. е. обобщенными кислотами или основаниями. Активные центры ряда ферментов содержат функциональные группы аминокислотных остатков, принимающие участие в каталитических процессах в качестве доноров или акцепторов протонов. Здесь показаны некоторые из этих групп. – SH-группа принадлежит цистеину, имидазольная группа – гистидину.

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

4. Ковалентный катализ



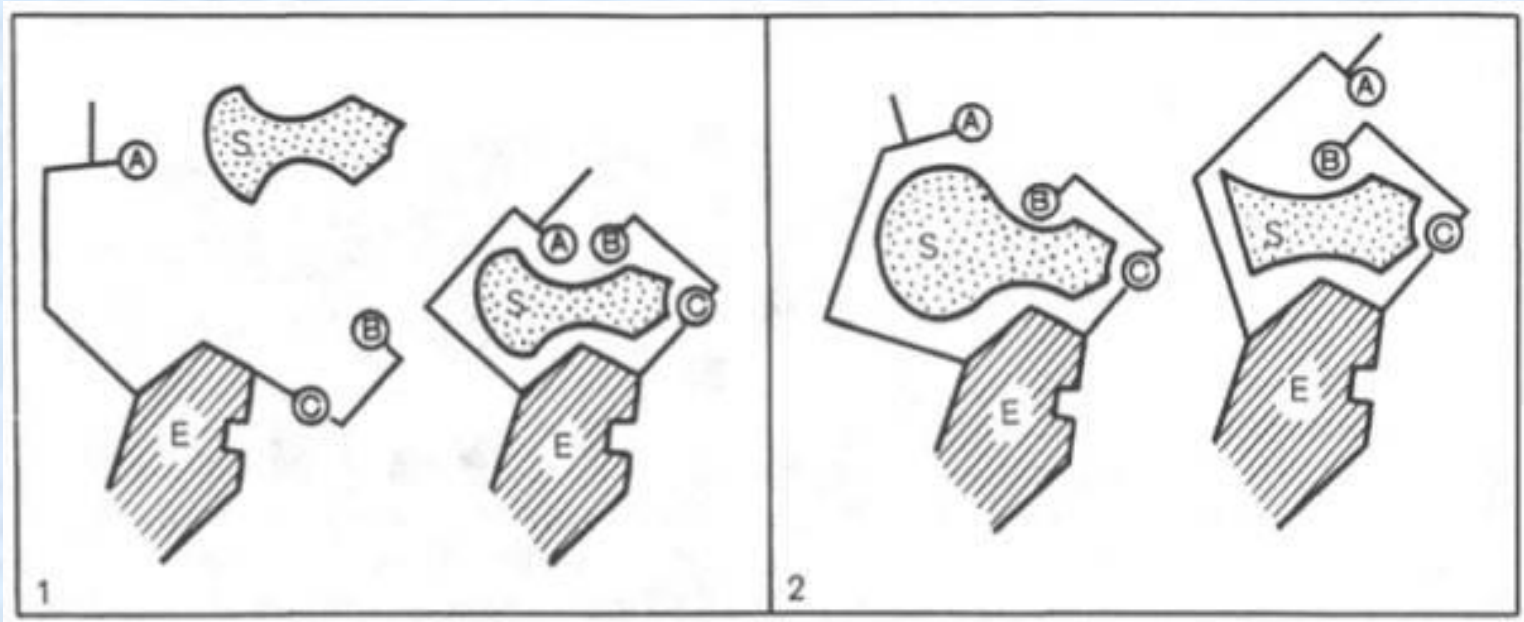
Одна из моделей ковалентного катализа. В некоторых ферментативных реакциях фермент замещает функциональную группу R в субстрате RX, в результате чего образуется ковалентный комплекс EX. Он нестабилен и гидролизуеться значительно быстрее, чем RX. К ферментам, осуществляющим ковалентный катализ, относится химотрипсин.

Гипотеза «ключа и замка»



Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок»

Гипотеза индуцированного соответствия



Изменения структуры активного центра фермента,
вызванные субстратом, согласно модели
«индуцированного соответствия» Д. Кошленда

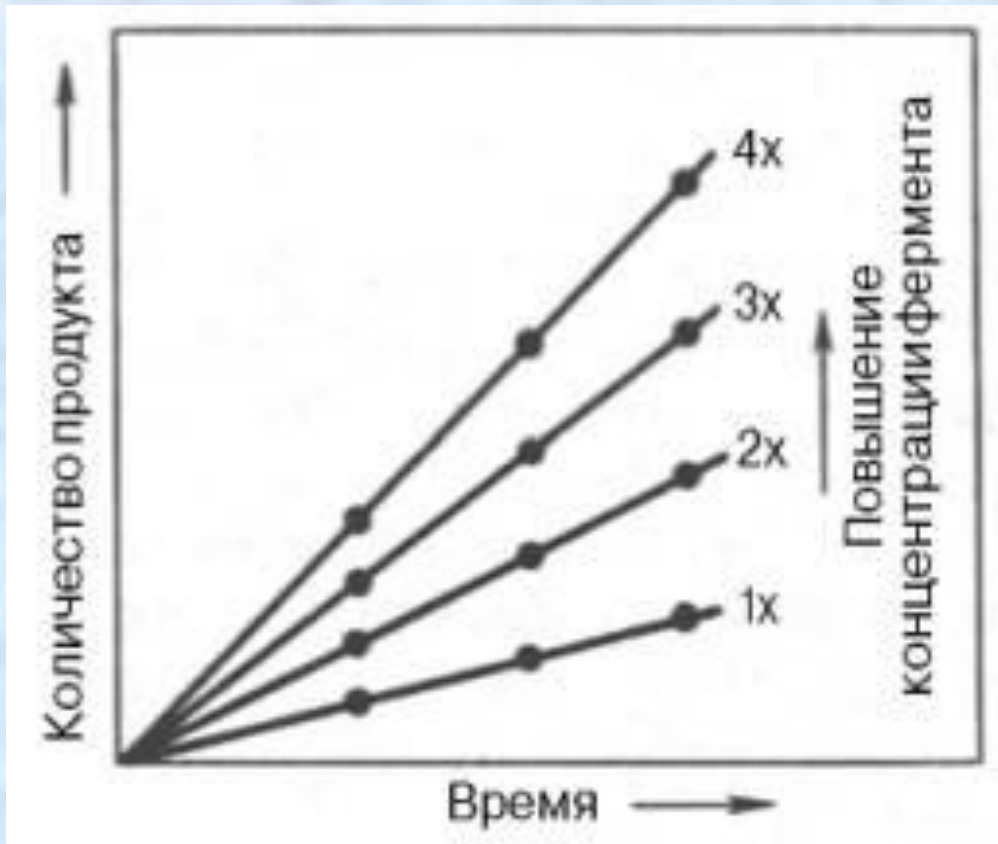
Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции



Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента:

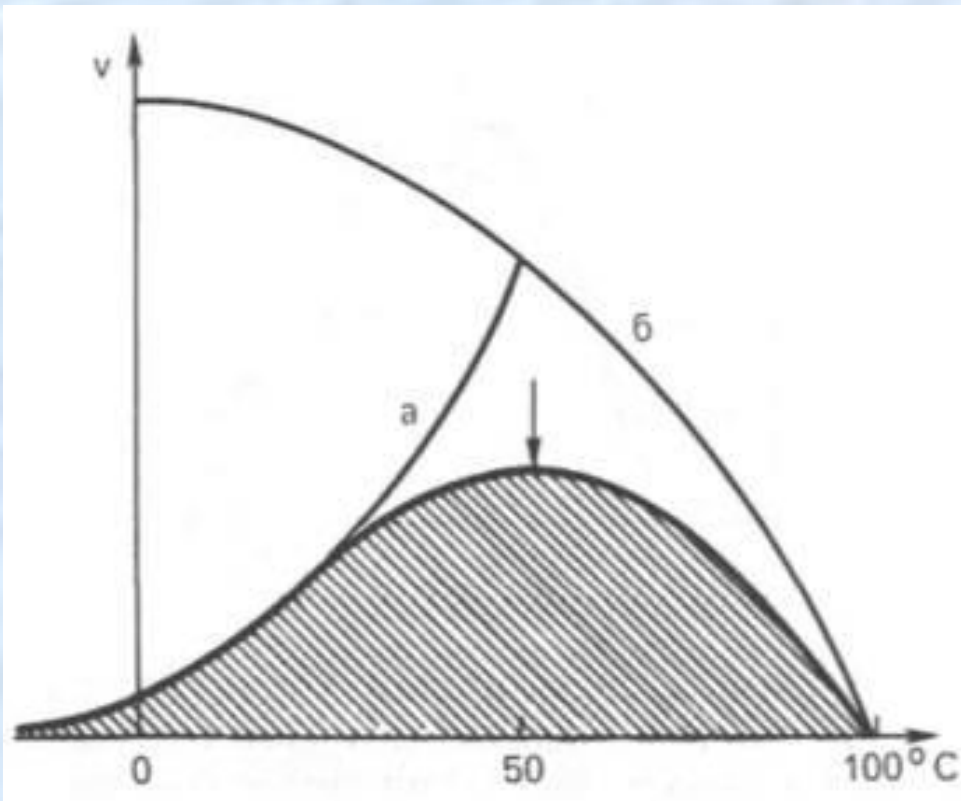
- а – реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата);
- б – реакция смешанного порядка;
- в – реакция нулевого порядка, когда $v = V_{max}$ и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата

Влияние концентрации фермента на скорость ферментативной реакции



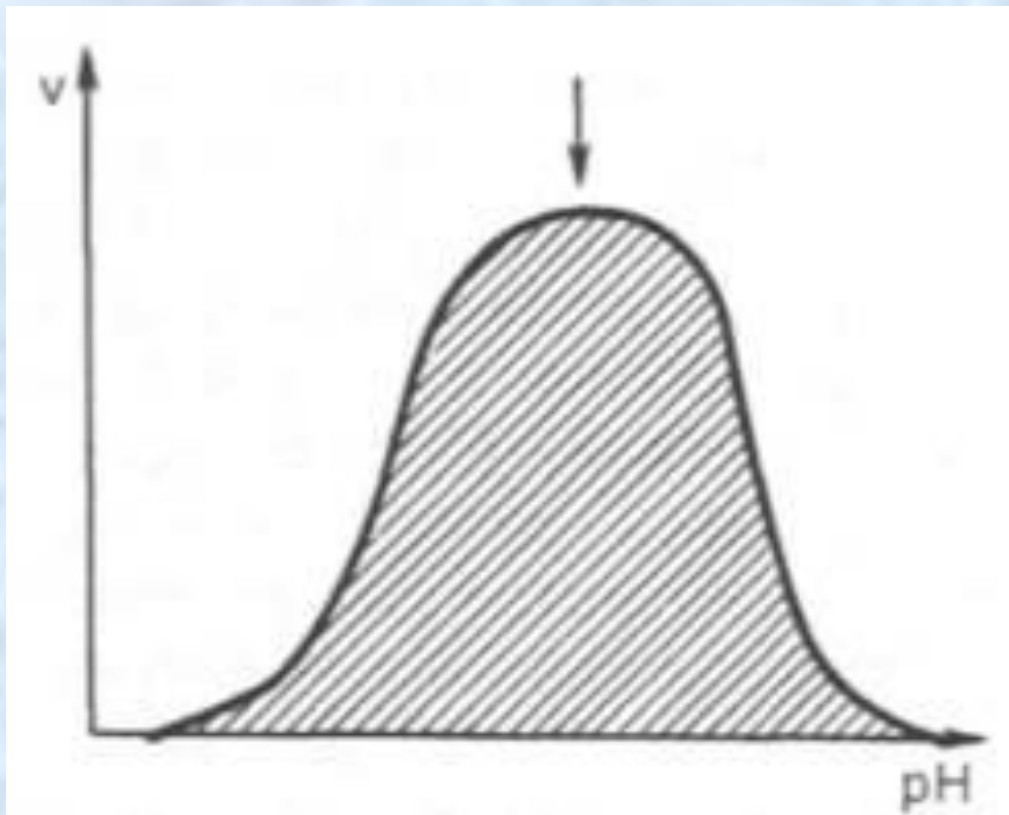
Зависимость скорости реакции от концентрации фермента в присутствии насыщающих концентраций субстрата.

Влияние температуры на скорость ферментативной реакции



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры:
а – повышение скорости реакции как функция температуры;
б – снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры.

Влияние pH среды на скорость ферментативной реакции



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от pH (стрелка указывает оптимум pH).

Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции



Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента.

a – реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата);

b – реакция смешанного порядка;

v – реакция нулевого порядка, когда $v = V_{max}$ и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.

Уравнение Михаэлиса – Ментен
выражает количественное соотношение между концентрацией
субстрата и скоростью ферментативной реакции:

$$v = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_S + [S]},$$

где v – наблюдаемая скорость реакции при данной
концентрации субстрата $[S]$;

K_S – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса,
моль/л;

v_{\max} – максимальная скорость реакции при полном насыщении
фермента субстратом.

Определение количественного содержания ферментов

- О количестве ферментов судят по скорости катализируемой реакции в определенных, согласованных условиях измерения.
- О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования продукта реакции.
- За единицу активности любого фермента (E или U) принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин) .
- 1 катал есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 молю в 1 с (1 моль/с).

Регуляция ферментативной активности.

Примеры активаторов

Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы, например:

- соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока;

- желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы;

- соединения, содержащие свободные SH-группы (глутатион, цистеин), активируют некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназу), растительную протеиназу и др.

- ионы металлов особенно часто выступают активаторами. Около четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов.

Необратимое ингибирование

Если ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп фермента, то такой тип ингибирования называется *необратимым*.

Необратимое действие ингибитора в самом простом случае может быть описано уравнением:

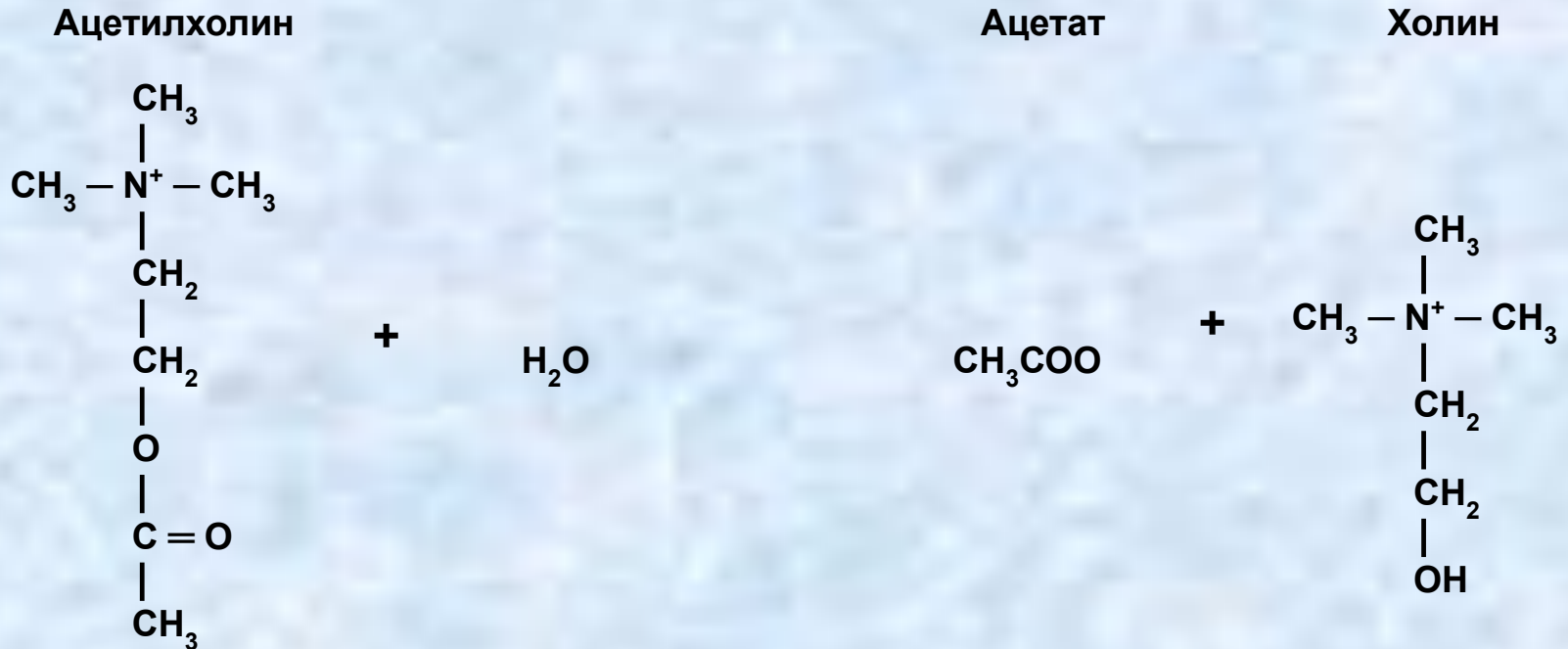


где E – фермент, I – ингибитор, EI – комплекс.

При **необратимом ингибировании** происходит непрерывная модификация молекул фермента, в результате чего фермент частично или полностью теряет свою активность. Сюда относят ингибиторы, которые прочно и необратимо связывают функциональные группы **активного центра** или стойко изменяют валентность металла в активном центре:

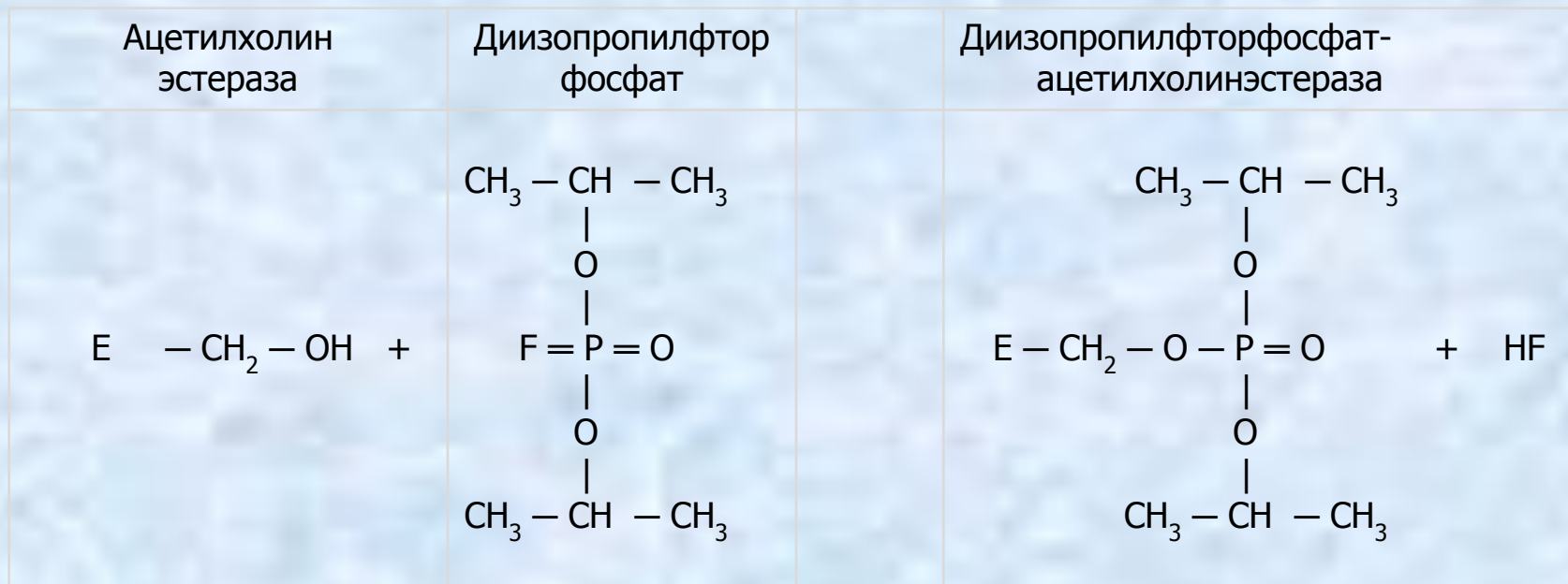
- 1) ингибиторы металлосодержащих ферментов (HCN , KCN , CO , NaN_3) – дыхательные яды, т.к. стойко меняют валентность Fe и Cu, препятствуя переносу электронов;
- 2) вещества, связывающие SH-группы (монойодацетат, соединения ртути и мышьяка);
- 3) вещества, связывающие OH-группы серина в активном центре (фосфорорганические соединения, например, диизопропилфторфосфат).

Необратимое ингибирование на примере ацетилхолинэстеразы



Реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой

Необратимое ингибирование на примере ацетилхолинэстеразы



Необратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы
диизопропилфторфосфатом

Обратимое ингибирование

В случае обратимого действия ингибитор образует с ферментом непрочный комплекс, способный распасться, в результате чего снова возникает активный фермент.

Обратимое действие ингибитора может быть описано уравнением:

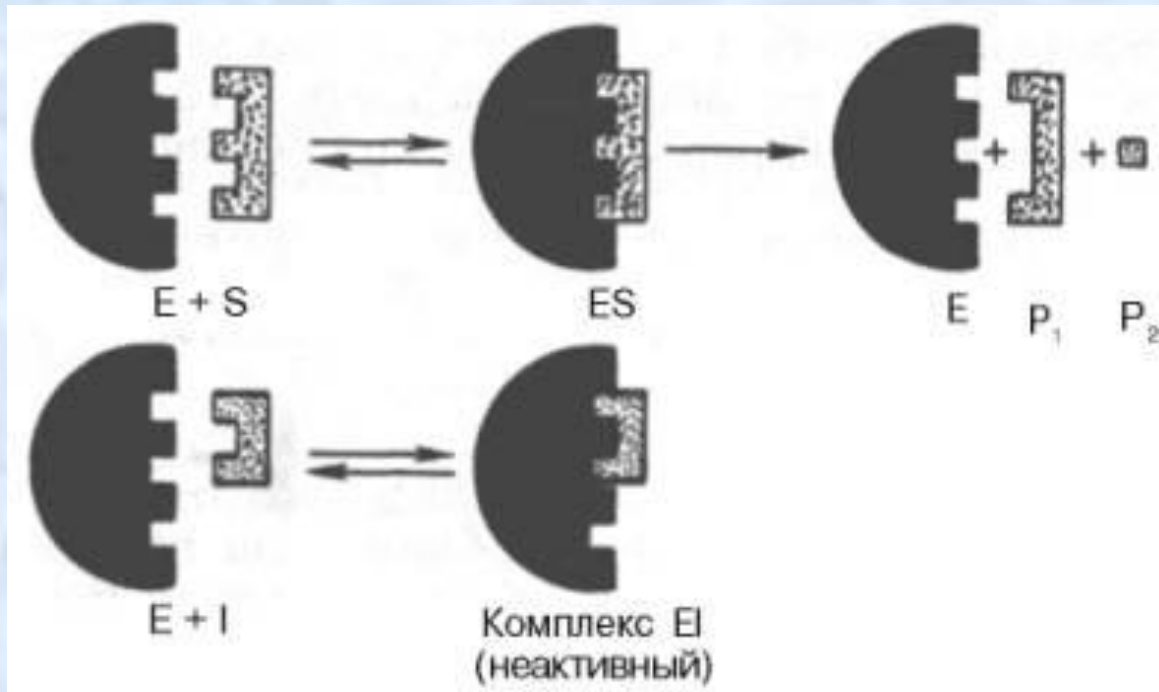


где E – фермент, I – ингибитор, EI – комплекс.

Обратимое ингибирование делят на:

- *конкурентное,*
- *неконкурентное.*

Обратимое конкурентное ингибирование

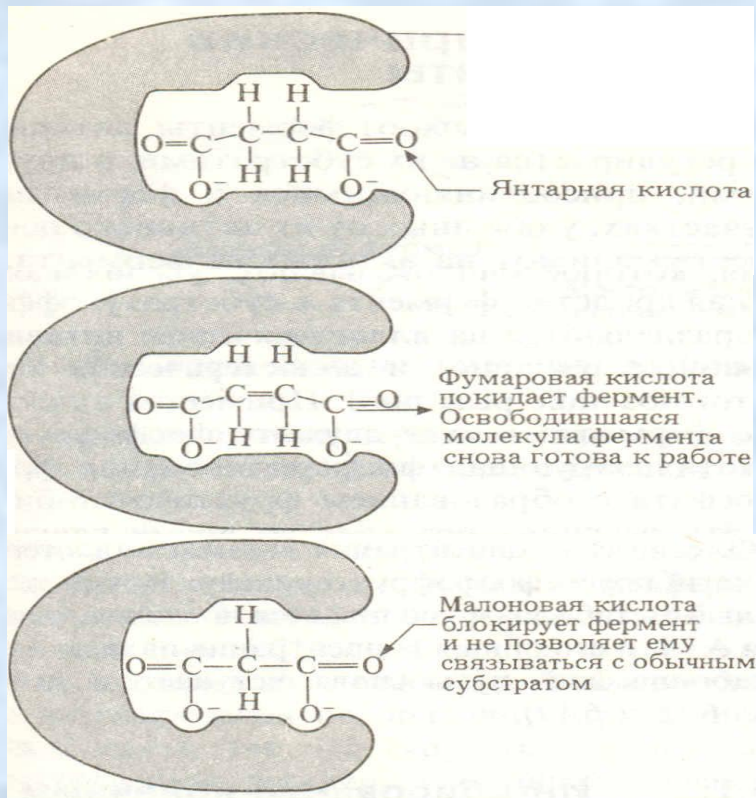


Действие конкурентного ингибитора (схема по В.Л. Кретовичу):
 E – фермент; S – субстрат; P_1 и P_2 – продукты реакции;
 I – ингибитор

Обратимое ингибирование на примере сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа

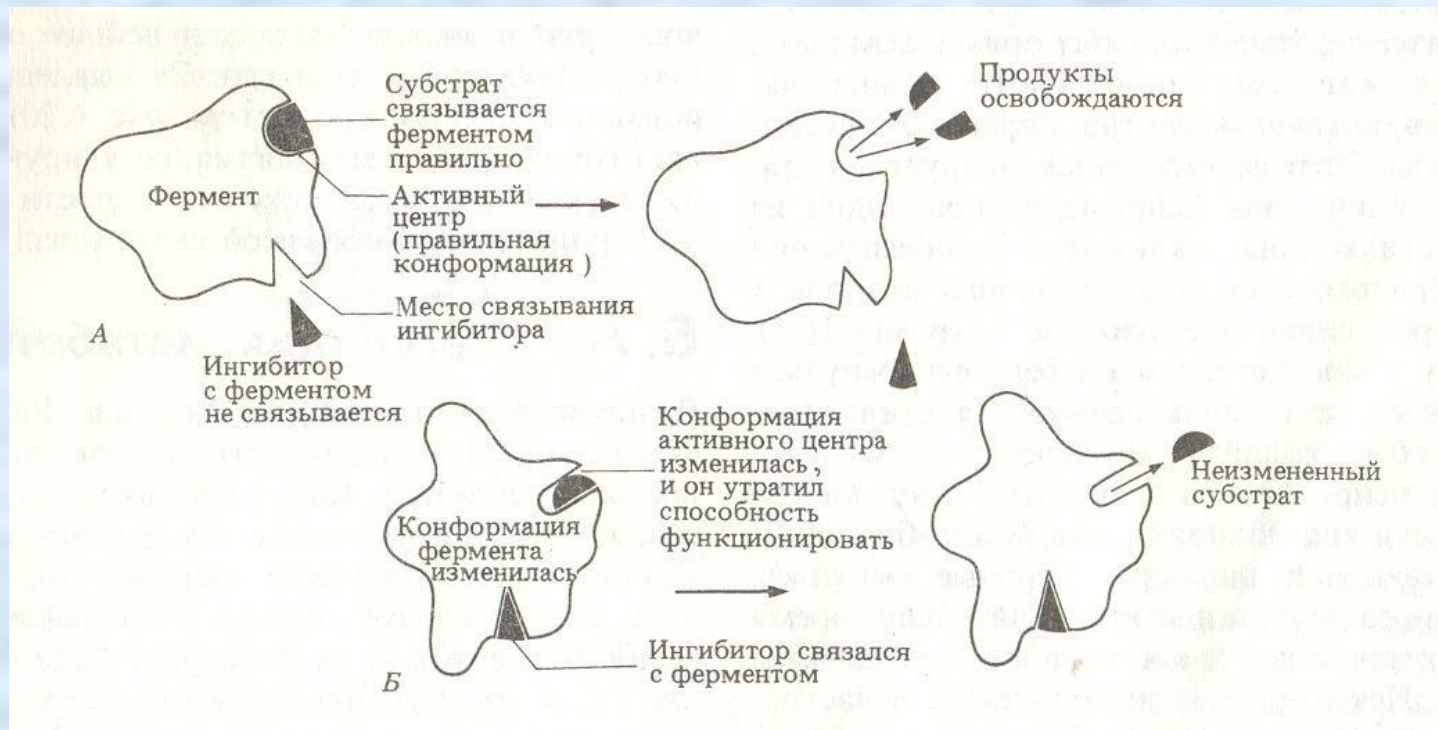
А



Б

Пример конкурентного ингибирования:
А – фермент сукцинатдегидрогеназа катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую;
Б – конкурентное ингибирование

Обратимое неконкурентное ингибирование

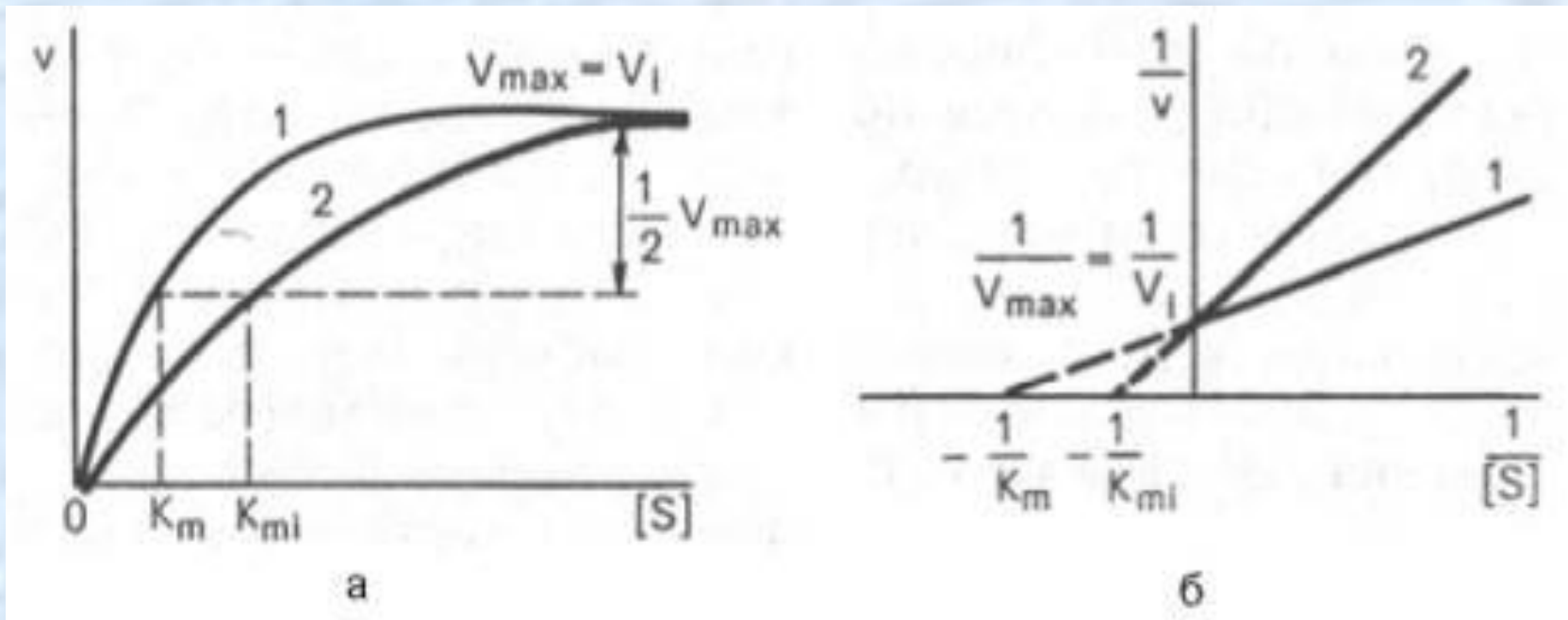


Проявление неконкурентного ингибирования:

А – нормальная реакция;

Б – неконкурентное ингибирование

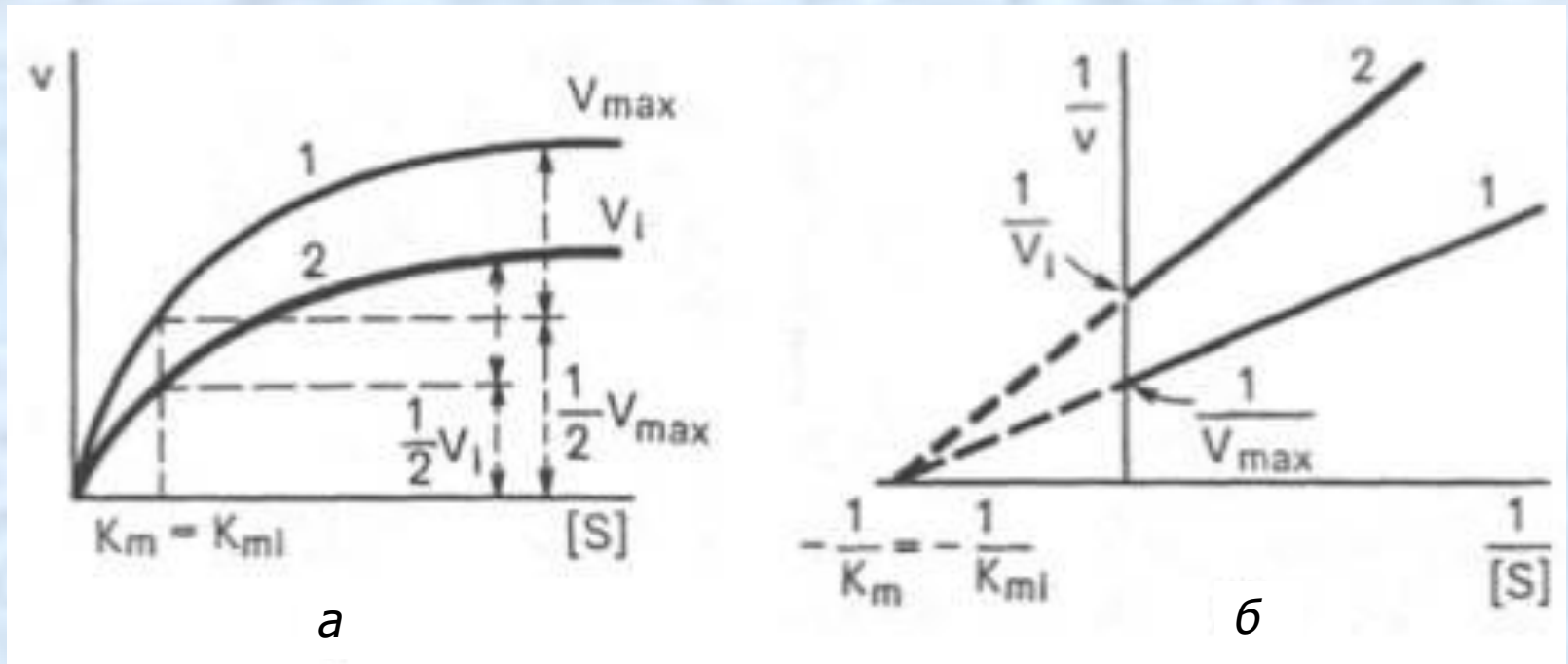
Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора



Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора.

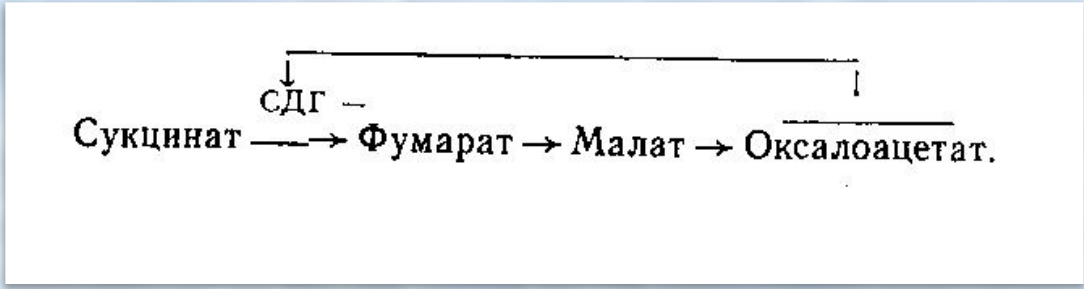
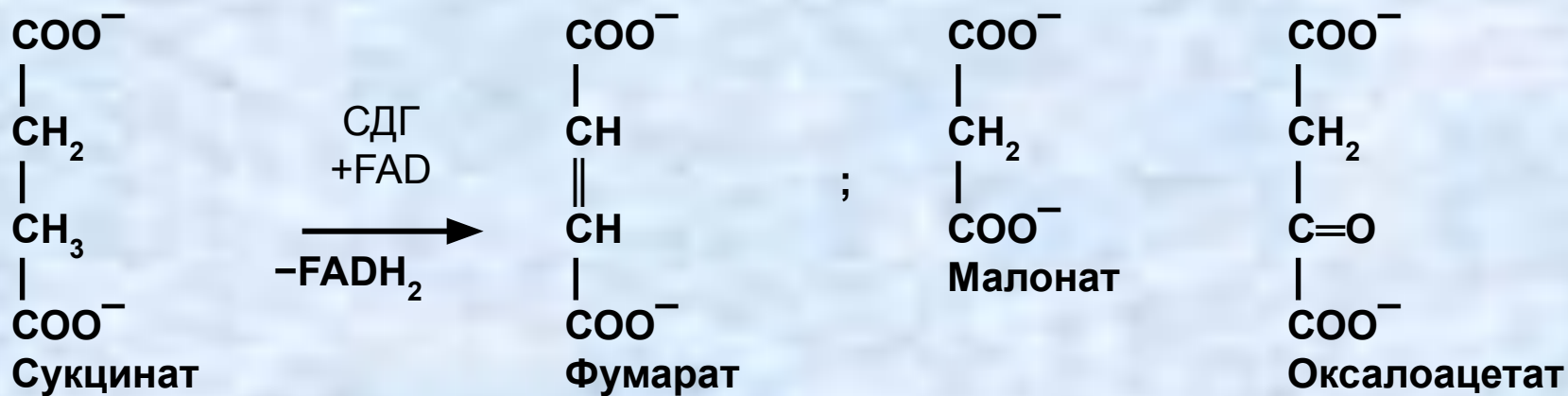
а – в координатах v от $[S]$; б – в координатах $1/v$ от $1/[S]$; V_{max} и V_i – максимальные скорости реакции; K_m и K_{mi} – константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора

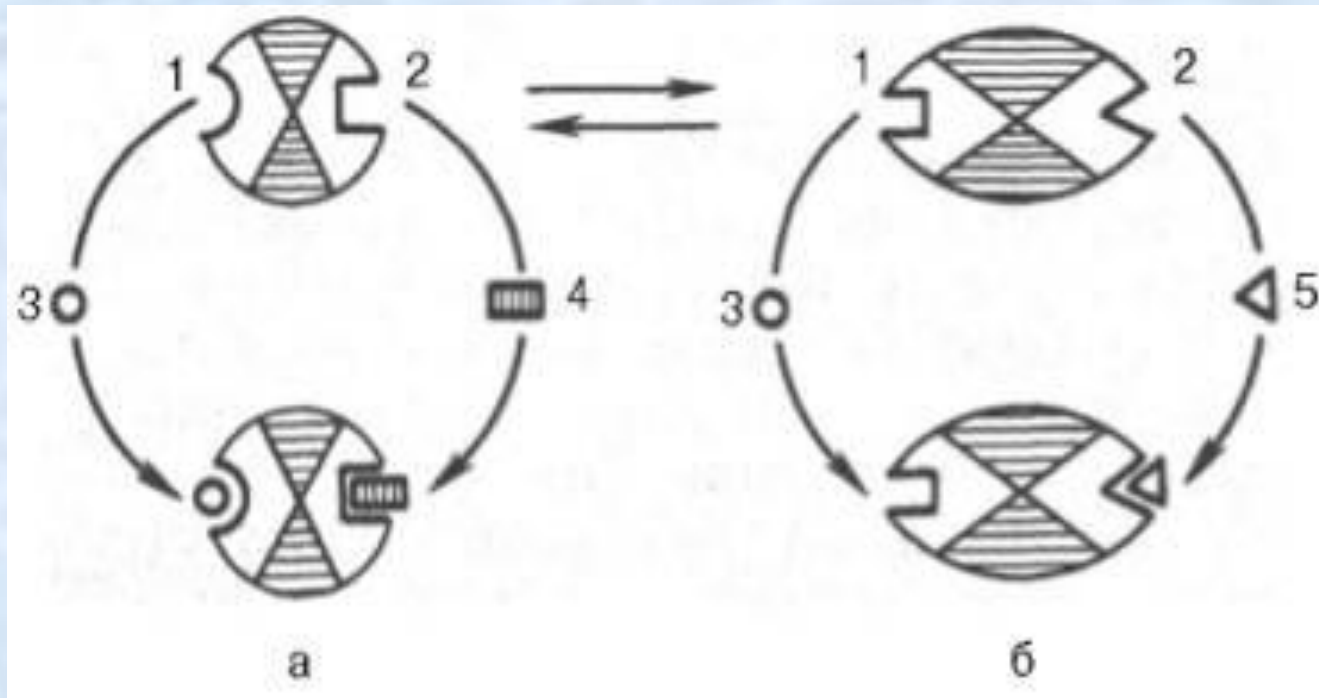


Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора. Обозначения те же.

Изостерическая регуляция

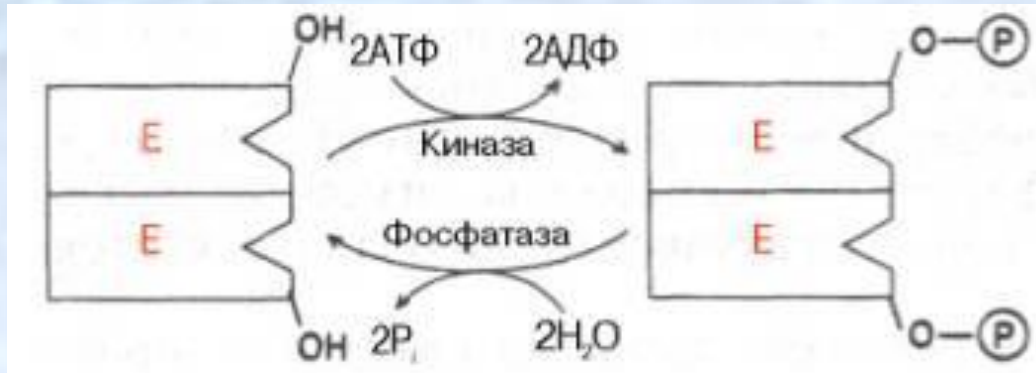


Аллостерический контроль активности ферментов

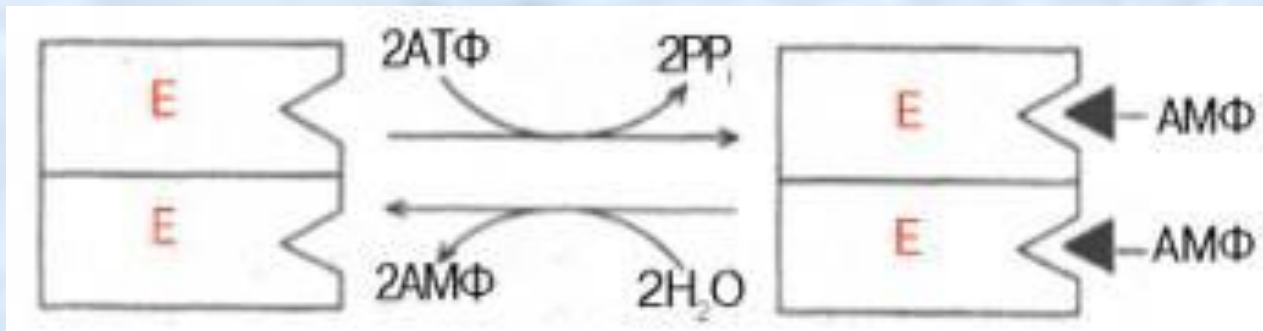


Взаимодействие аллостерического фермента с субстратом и эффекторами: *а* – активный комплекс; *б* – неактивный комплекс; 1 – активный центр; 2 – аллостерический центр; 3 – субстрат; 4 – положительный эффектор; 5 – отрицательный эффектор

Регуляция ферментов ковалентной модификацией



Ковалентная модификация фермента путем фосфорилирования-дефосфо-рилирования остатков серина



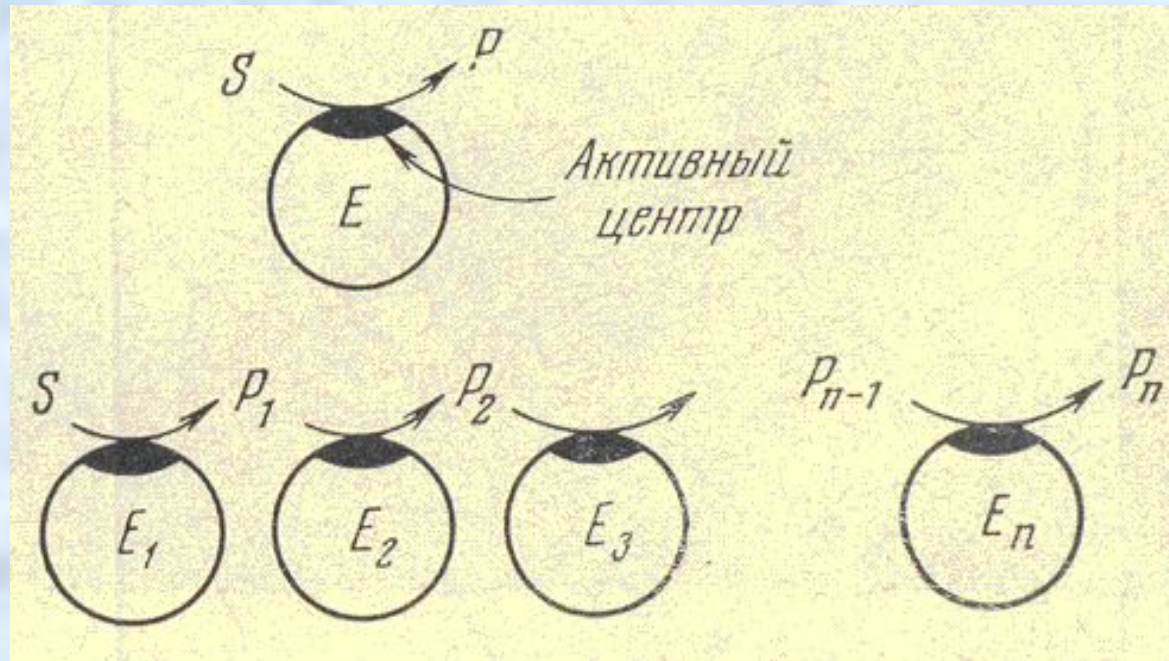
Нековалентная модификация фермента путем аденилирования-деаденилирования

Регуляция ферментов ограниченным протеолизом (активация зимогенов)

Примером подобного активирования белков является активирование:

- некоторых гормонов (проинсулин → инсулин),
- белка соединительной ткани (растворимый проколлаген превращается в нерастворимый коллаген),
- белков свертывающей системы крови,
- неактивного пепсиногена в активный пепсин.

Регуляция активности мультиэнзимных комплексов



Взаимодействие отдельных ферментов
в «растворимой» ферментной системе;
 E – ферменты;
 S – субстрат;
 P – продукты реакций