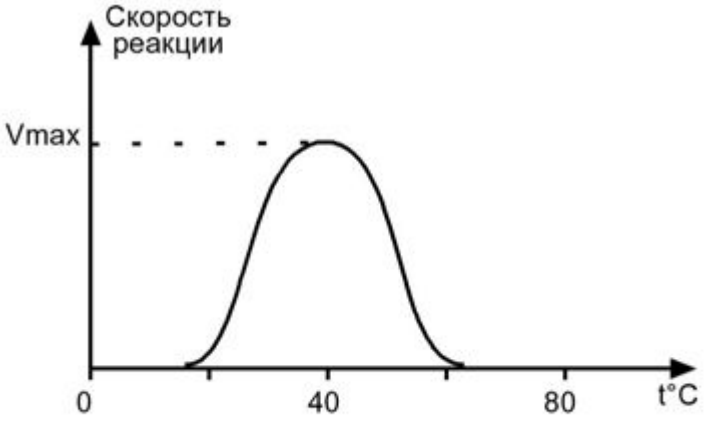
# Ферменты

# СВОЙСТВАФЕРМЕНТОВ

- 1. Зависимость скорости реакции от температуры – описывается колоколообразной кривой с максимумом скорости при значениях оптимальной температуры для данного фермента.
- Закон о повышении скорости реакции в 2-4 раза при повышении температуры на 10°С справедлив и для ферментативных реакций, но только в пределах до 55-60°С, т.е. в значениях до денатурации белков. Наряду с этим, как исключение, имеются ферменты некоторых микроорганизмов, существующих в воде горячих источников и гейзеров.

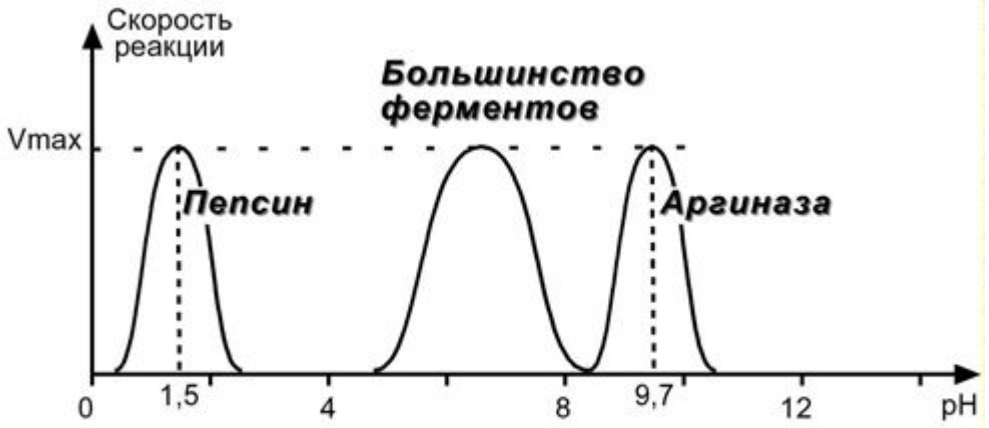



Зависимость скорости реакции от температуры

- У сиамских кошек мордочка, кончики ушей, хвоста, лапок черного цвета. В этих областях температура всего на 0,5°С ниже, чем в центральных областях тела. Но это позволяет работать ферменту, образующему пигмент в волосяных луковицах. При малейшем повышении температуры фермент инактивируется.
- У зайца-беляка при понижении температуры окружающего воздуха пигментообразующий фермент кожи инактивируется, и заяц получает белую шубку.
- Противовирусный белок интерферон начинает синтезироваться в клетках только при достижении температуры тела 38°С

- При понижении температуры активность ферментов понижается, но не исчезает совсем. Иллюстрацией может служить зимняя спячка некоторых животных (суслики, ежи), температура тела которых понижается до 3-5°С.
- Это свойство ферментов также используется в хирургической практике при проведении операций на грудной полости, когда больного подвергают охлаждению до 22°С.

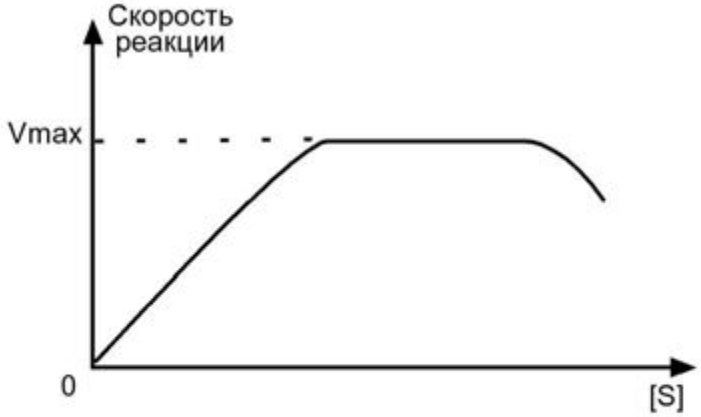
- 2. **Зависимость скорости реакции от pH – описывается колоколообразной кривой с макси**мумом скорости при оптимальном для данного фермента значении pH.
- Для каждого фермента существует определенный узкий интервал pH среды, который является оптимальным для проявления его высшей активности.
- Например, оптимальные значения pH для пепсина 1,5-2,5, трипсина 8,0-8,5, амилазы слюны 7,2, аргиназы 9,7, кислой фосфатазы 4,5-5,0, сукцинатдегидрогеназы 9,0.



Зависимость скорости реакции от pH

3. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

- При увеличении концентрации субстрата скорость реакции сначала возрастает соответственно подключению к реакции новых молекул фермента, затем наблюдается эффект насыщения, когда все молекулы фермента взаимодействуют с молекулами субстрата.
- При дальнейшем увеличении концентрации субстрата между его молекулами возникает конкуренция за активный центр фермент и скорость реакции снижается.




Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

## 4. **Зависимость от концентрации фермента**

- При увеличении количества молекул фермента скорость реакции возрастает непрерывно и прямо пропорционально количеству фермента, т.к. большее количество молекул фермента производит больше число молекул продукта.

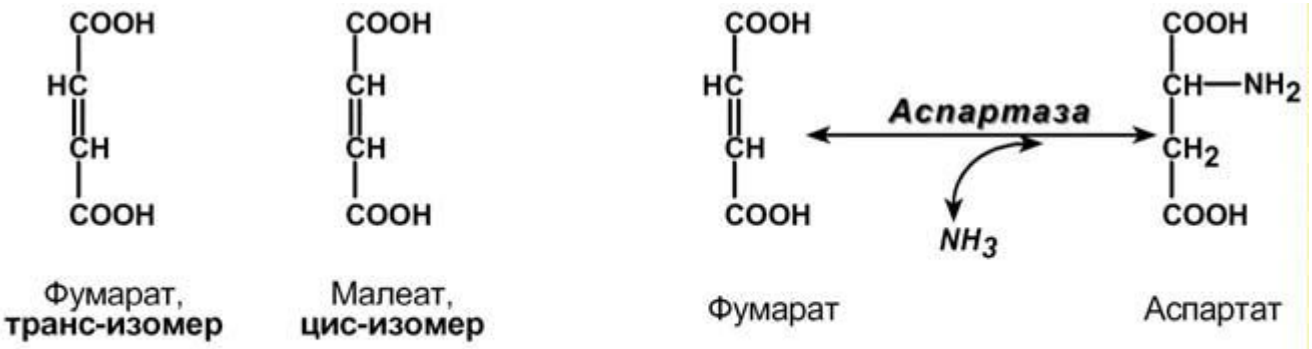
Зависимость скорости реакции от количества фермента

# СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Специфичность основана на комплементарности структуры субстрата и активного центра фермента.

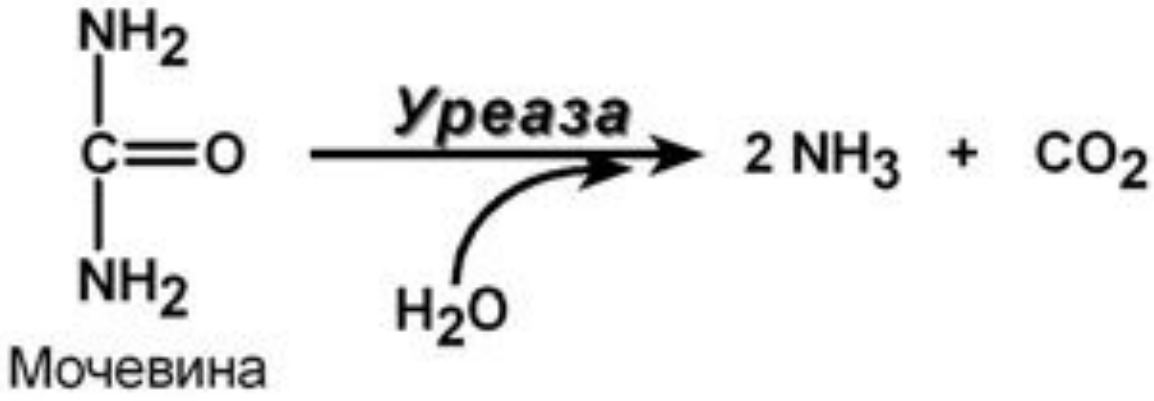
1. Стереоспецифичность – катализ только одного из стереоизомеров, например:

- специфичность к L- или D-аминокислотам – например, почти все ферменты млекопитающих взаимодействуют с L-аминокислотами,
- специфичность к цис- и транс-изомерам. Например, аспартаза реагирует только с транс-изомером – фумаровой кислотой, но не с малеатом (цис-изомер)




Стереоспецифичность аспартазы к транс-изомеру

2. **Абсолютная специфичность – фермент производит** катализ только одного вещества. Например, расщепление мочевины уреазой.




Реакция расщепления мочевины уреазой

3. **Групповая специфичность – катализ субстратов с** общими структурными особенностями, т.е. при наличии определенной **связи или химической группы:**

- наличие пептидной связи, например, бактериальный фермент **субтилизин специфичен к пептидной связи независимо от** строения образующих ее аминокислот,

**пепсин катализирует разрыв пептидной свя**зи, образованной карбоксильными группами ароматических аминокислот,

- **тромбин расщепляет пептидную связь только между аргини**ном и глицином.

- наличие ОН-группы, например, **алкогольдегидрогеназа окисляет до альдегидов од**ноатомные спирты (этанол, метанол, пропанол).

4. **Относительная групповая специфичность – превращение субстратов с некоторыми об**щими признаками. Например, цитохром Р450 окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

# МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ

- В общем виде все сводится к комплементарному взаимодействию фермента и субстрата. При этом функциональные группы субстрата взаимодействуют с соответствующими им функциональными группами фермента. Наличие субстратной специфичности объясняют две гипотезы:

- 1. **Гипотеза Фишера (модель "жесткой матрицы", "ключ-замок") – активный центр** фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.

Теория Фишера – модель специфичности “ключ-замок“

- 2. **Гипотеза Кошланда (модель "индуцированного соответствия", "рука-перчатка") –** подразумевает гибкость активного центра. Присоединение субстрата к якорному участку фермента вызывает изменение конфигурации каталитического центра таким образом, чтобы его форма соответствовала форме субстрата.

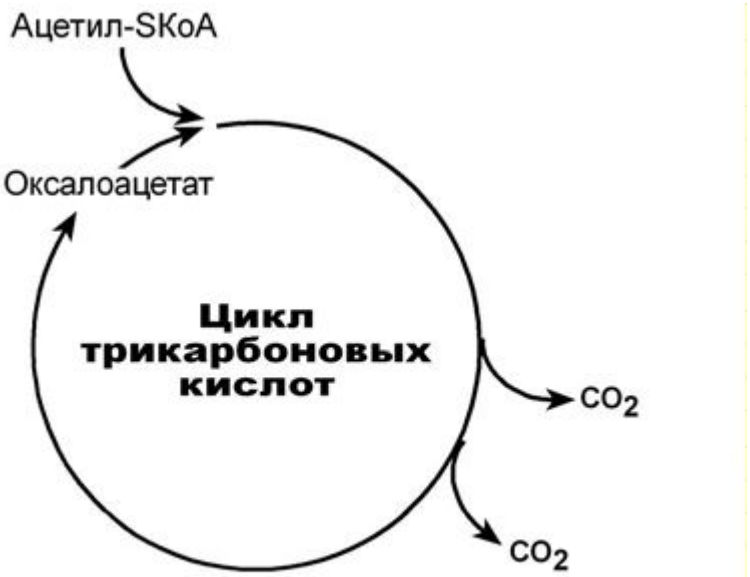
Теория Кошланда – модель специфичности “рука-перчатка“

# РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ *IN VIVO*

- Активность ферментов в клетке непостоянна во времени. Она чутко реагирует на ситуацию, в которой оказывается клетка, на факторы, воздействующие на клетку как снаружи, так и изнутри.
- Главная цель этой реакции – отреагировать на изменение окружающей среды, приспособить клетку к новым условиям, дать должный ответ на гормональные и иные стимулы, а в некоторых ситуациях – получить шанс выжить.

- **1. Компартментализация.**
- Компартментализация – это сосредоточение ферментов и их субстратов в одном компартменте (одной органелле) – в эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, лизосомах.
- Например, β-окисление жирных кислот протекает в митохондриях, синтез белка – в рибосомах.

- **2. Доступность субстрата или кофермента.**
- Здесь работает **закон действия масс –** фундаментальный закон химической кинетики: при постоянной температуре скорость химической реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ. Или упрощенно – скорость, с которой вещества реагируют друг с другом, зависит от их концентрации.
- Таким образом, изменение количества хотя бы одного из субстратов прекращает или начинает реакцию. Для цикла трикарбоновых кислот таким субстратом является **оксалоацетат (щаве**левоуксусная кислота).




Роль оксалоацетата в регуляции скорости ЦТК

- **3. Изменение количества фермента.**
- Изменение количества фермента может происходить в результате увеличения или снижения его синтеза. Изменение скорости синтеза фермента обычно зависит от количества определенных гормонов или субстратов реакции.
- Например, гормон кортизол стимулирует синтез ферментов **глюконеогенеза, что обес**печивает стабильность концентрации глюкозы в крови и устойчивость ЦНС к стрессу. При беременности и после родов под воздействием лактотропного гормона в молочной железе активно идет синтез фермента **лактозосинтазы.**

- Исчезновение **пищеварительных ферментов при длительном голодании и их** появление в восстановительный период (в результате изменения секреции кишечных гормонов).
- Этанол стимулирует в печени синтез "своего" (обезвреживающего спирт) изофермента **цитохрома Р450.**

- **4. Ограниченный (частичный) протеолиз проферментов.**
- Т.к. синтез некоторых ферментов осуществляется в виде более крупного предшественника (**трипсиноген, пепсиноген, прокарбоксипептидазы, факторы свертывания крови),** то при поступлении в нужное место этот фермент активируется через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов.
- Секреция ряда ферментов за пределы клетки в неактивном состоянии позволяет предохранить клетки от повреждения (пищеварительные ферменты) или сохранить белок до наступления определенного момента (протромбин, фибриноген, белки комплемента).

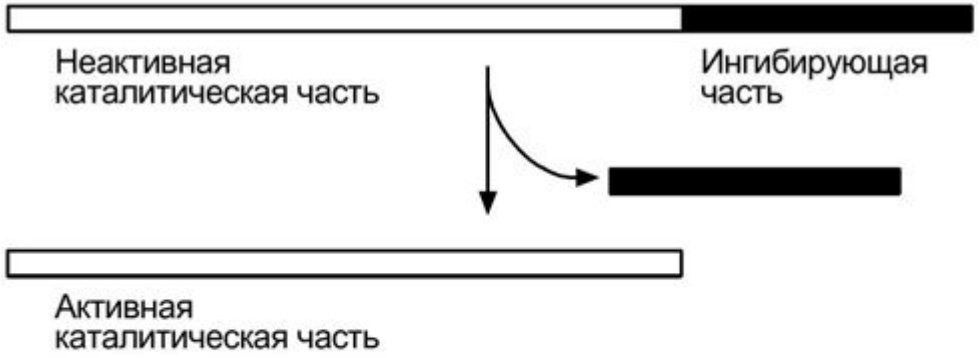



Схема активации фермента способом
“ограниченного протеолиза“

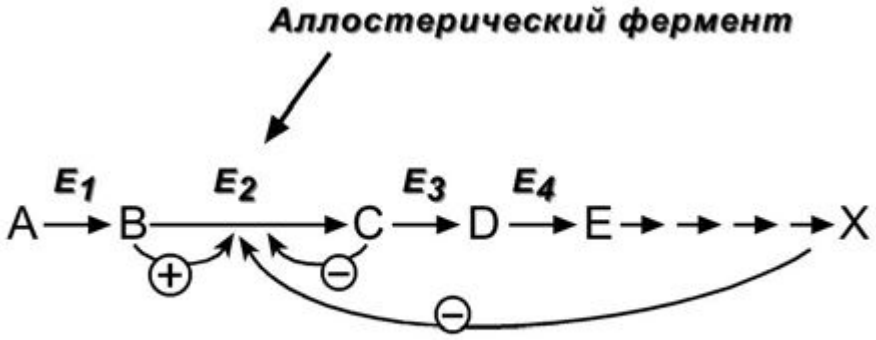
- **5. Аллостерическая регуляция.**

Аллостерические ферменты построены из **двух и более субъединиц: одни субъ**единицы содержат каталитический центр, другие являются регуляторными. Присоединение эффектора к **аллостерической (ре**гуляторной) субъединице изменяет конформацию белка и активность **каталитической субъединицы.**

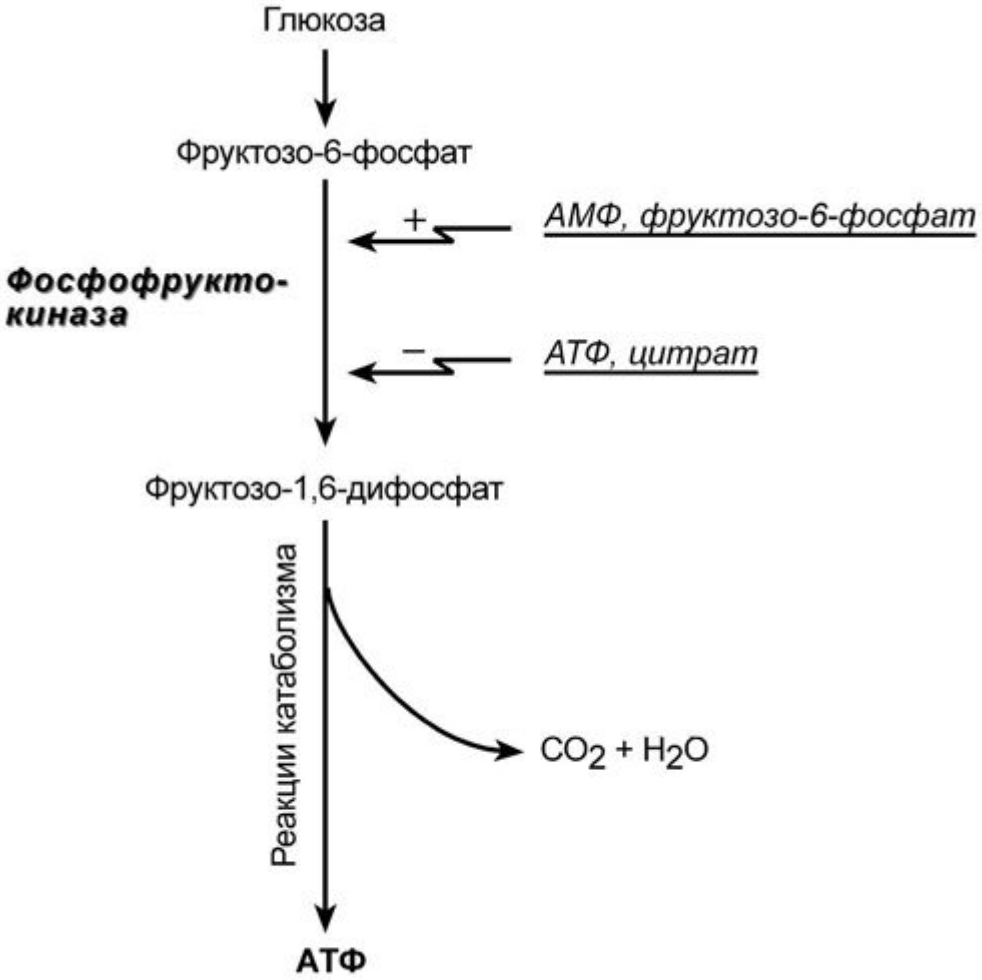
Аллостерические ферменты обычно стоят в начале метаболических путей, и от их активности зависит течение многих последующих реакций. Поэтому они часто называются **ключевыми ферментами.**

В качестве отрицательного регулятора может выступать конечный метаболит биохимического процесса, продукт данной реакции, т.е работать механизм **обратной отрицательной связи. Если регуляторами яв**ляются начальный метаболит или субстрат реакции, то говорят о прямой положительной регуляции. Также регулятором могут быть метаболиты взаимосвязанного пути.

Фермент энергетического распада глюкозы, **фосфофруктокиназа, регулиру**ется промежуточными и конечными продуктами этого распада.



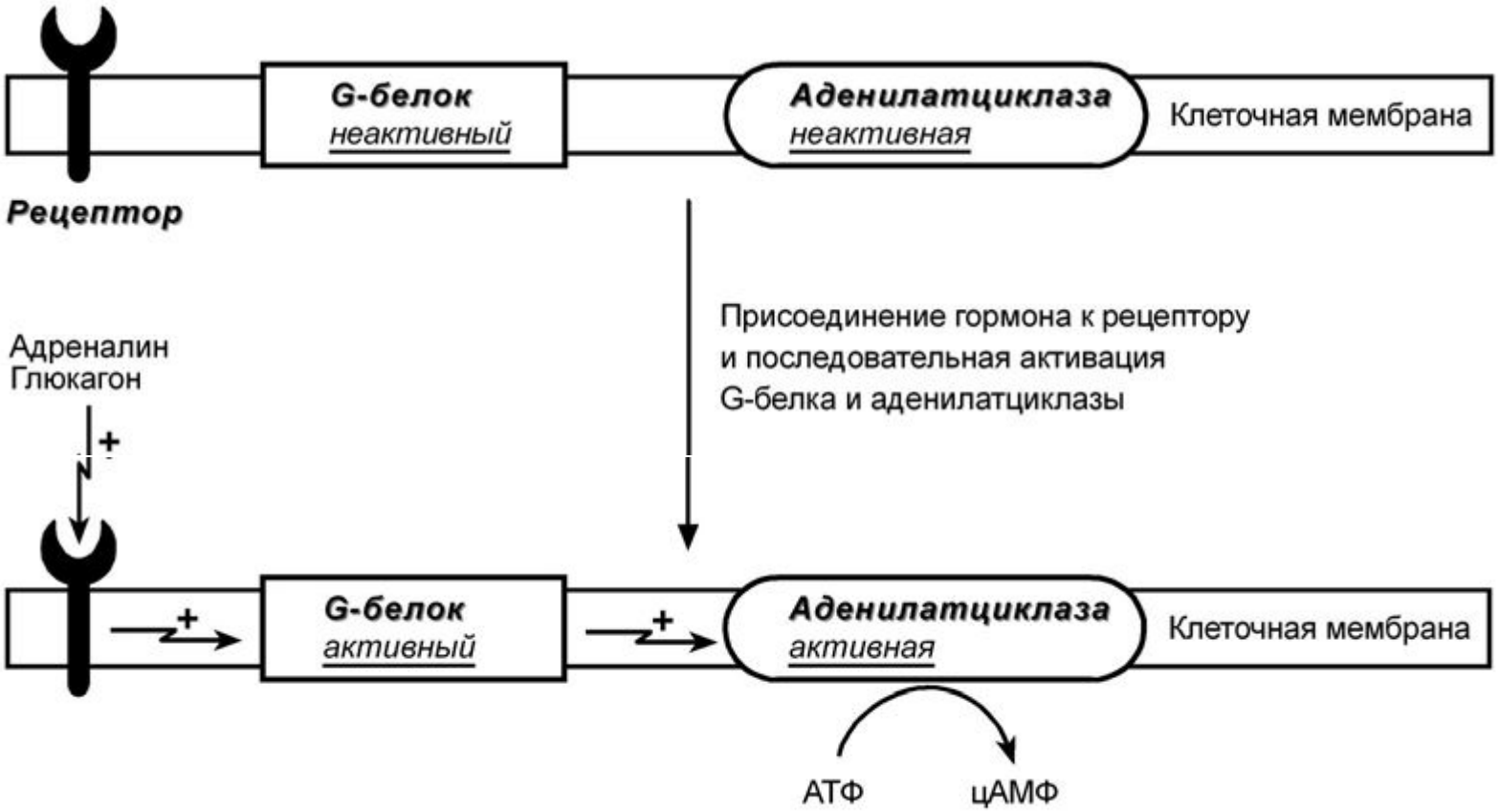

Общий принцип аллостерической регуляции




Аллостерическая регуляция фосфофруктокиназы

- **6. Белок-белковое взаимодействие.**

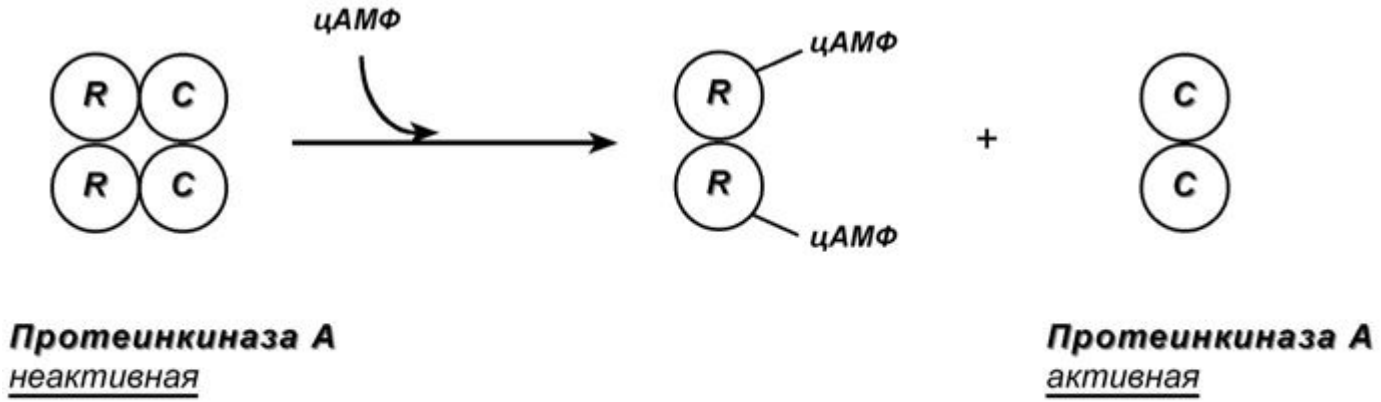
Термин белок-белковое взаимодействие обозначает ситуацию, когда в качестве регулятора выступают не метаболиты биохимических процессов, а специфичные белки. Влияние каких-либо факторов на эти белки изменяет их активность, и они, в свою очередь, воздействуют на нужный фермент.




Упрощенная схема активации аденилатциклазы

К примеру, мембранный фермент аденилатциклаза является чувствительным к воздействию мембранного G-белка, который сам активируется при действии на клетку некоторых гормонов (например, адреналина и глюкагона).

Другим примером белок-белкового взаимодействия может быть регуляция активности протеинкиназы А. Протеинкиназа А является тетрамерным ферментом, состоящим из 2 каталитических (С) и 2 регуляторных (R) субъединиц. Активатором для протеинкиназы А является цАМФ. Присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам фермента вызывает их отхождение от каталитических субъединиц. Каталитические субъединицы при этом активируются.




Аллостерическая активация протеинкиназы А при помощи цАМФ

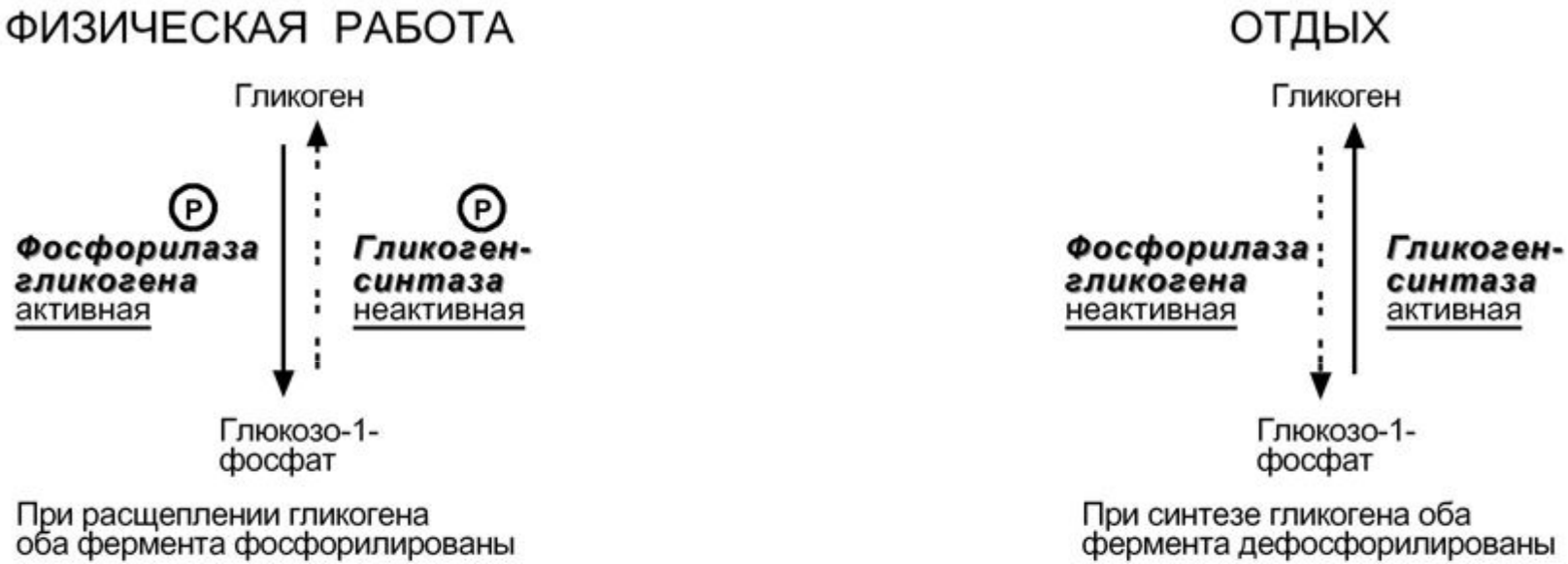
7. Ковалентная (химическая) модификация.

Ковалентная модификация заключается в обратимом присоединении или отщеплении определенной группы, благодаря чему изменяется активность фермента. Чаще всего такой группой является фосфорная кислота, реже метильные и ацетильные группы. Фосфорилирование фермента происходит по остаткам серина, треонина, тирозина. Присоединение фосфорной кислоты к белку осуществляют ферменты протеинкиназы, *отщепление – протеинфосфатазы*

Изменение активности фермента
путем фосфорилирования-дефосфорилирования

Ферменты могут быть активны как в фосфорилированном, так и в дефосфорилированном состоянии.

- Например, ферменты **гликогенфосфорилаза и гликогенсинтаза при потребности ор**ганизма в глюкозе **фосфорилируются, при этом фосфорилаза гликогена становится актив**ной и начинает расщепление гликогена, а гликогенсинтаза неактивна. При необходимости синтеза гликогена **оба фермента дефосфорилируются, синтаза при этом становится актив**ной, фосфорилаза – неактивной.




Зависимость активности ферментов обмена гликогена
от наличия в структуре фосфорной кислоты