

# Лекции: ЭНЗИМОЛОГИЯ

**Дисциплина: биохимия (С2.Б.4)**

**Специальность: педиатрия (060103)**

**НГМУ, кафедра медицинской химии**

**Д.б.н., доцент Суменкова Дина Валерьевна**

# ЛЕКЦИЯ № 1

---

**ФЕРМЕНТЫ:**

**ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ,**

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ**

# Актуальность темы

- ❑ Изучение ферментов способствует познанию феномена жизни
- Биохимические реакции – основа физиологических процессов
- Ферменты – «возбудители всех химических превращений у живых существ» (И.П. Павлов)
- ❑ Изучение ферментов необходимо для понимания связи между ферментами и наследственными болезнями обмена веществ
- ❑ Изучение ферментов позволяет расширять область их использования в медицине
- ❑ Успехи биохимии, молекулярной биологии и медицины связаны с развитием энзимологии

# История энзимологии



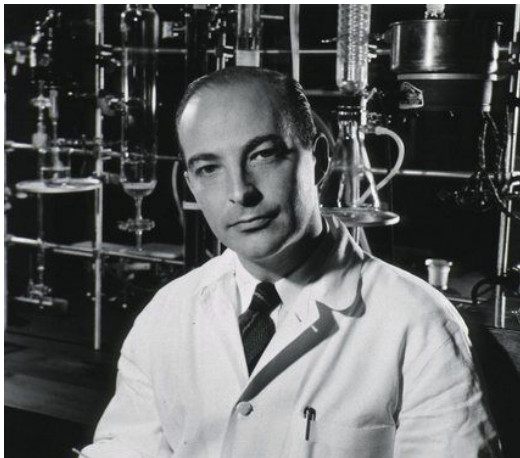
**Ян Баптист Ван Гельмонт (17 в):**

Пищеварение — это идущие внутри тела химические реакции, важнейшую роль в которых играет химический реагент — «фермент» (от лат. *fermentum* «брожение»)

Лат. *fermentum*, греч.  
*enzym*

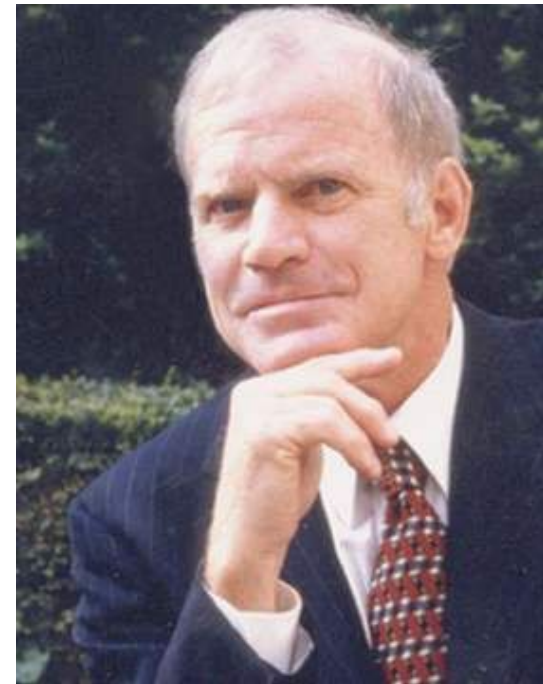
## Артур Корнберг (1918 – 2007)

- Открытие ДНК-полимеразы (1956)
- Открытие механизма биосинтеза НК (Нобелевская премия 1959 совместно с Северо Очоа)



## Кэри Мюллис (р. 1944)

- Создание высокоэффективного метода ПЦР-диагностики (1983)
- Нобелевская премия совместно с Майклом Смитом (1993)



# План лекции

- ❑ Понятие о ферментах и особенности ферментативного катализа (свойства ферментов)
- ❑ Структура и механизм действия ферментов
- ❑ Сложные ферменты и их кофакторы  
Мультиферментные комплексы
- ❑ Кинетика ферментативных реакций
- ❑ Регуляция активности ферментов

# Цель

## ● Знать:

- строение, свойства и роль ферментов в организме человека
- химико-биологическую сущность ферментативного катализа, условия протекания ферментативных реакций
- механизмы регуляции активности ферментов для понимания биохимических основ функционирования организма

## ● Уметь:

- использовать знания о ферментативном катализе для понимания принципов методов определения активности ферментов в клинической лабораторной диагностике с целью выявления патологических процессов в органах и системах детей и подростков

# Понятие о ферментах

- **Ферменты – белковые катализаторы химических реакций в живом организме**
  - состоят из L- $\alpha$ -аминокислот, соединенных пептидными связями
  - имеют 4 уровня организации молекул
  - характерна конформационная лабильность
  - при денатурации теряют активность
  - синтезируются как белковые молекулы
- ❖ **И.П. Павлов: переваривающая способность желудочного сока зависит от количества белка в нем (отсюда следует, что пепсин – белок)**



# Особенности ферментативного катализа: сравнение с неорганическими катализаторами

## Сходства

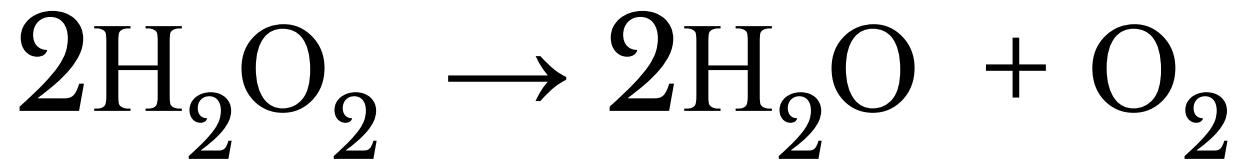
- Катализируют реакции возможные по термодинамическим условиям
- Снижают энергию активации реакции
- Не изменяют термодинамических характеристик реакции (не смещают равновесие)
- Многие ферменты катализируют прямую и обратную реакции
- Не расходуются в процессе реакции

## Различия

### (свойства ферментов)

- Уникальность структуры
- **Высокая эффективность катализа**
- **Высокая специфичность действия**
- Конформационная лабильность
- **Регулируемая активность**
- Проявляют активность в оптимальных для организма условиях

# Высокая эффективность ферментативного катализа



- самопроизвольно ( $E_a = 70$  кДж/моль)
- при участии железа ( $E_a = 42$  кДж/моль), скорость реакции увеличивается в  $10^3$  раз
- в присутствии каталазы ( $E_a = 7$  кДж/моль), скорость реакции увеличивается в  $10^{10}$  раз

**Что лежит в основе высокой эффективности ферментативного катализа?**

# Структура фермента: активный центр

- **Активный центр фермента (АЦ)** – это участок молекулы фермента, способный комплементарно (специфически) связываться с субстратом и обеспечивать его каталитическое превращение
  - Формируется на уровне III структуры белка
  - У сложных ферментов имеет кофактор (кофермент)
  - **Участок связывания активного центра** обеспечивает сродство к субстрату и формирование фермент-субстратного комплекса (ES)
  - **Каталитический участок активного центра** осуществляет химическую реакцию

# Схема строения активного центра

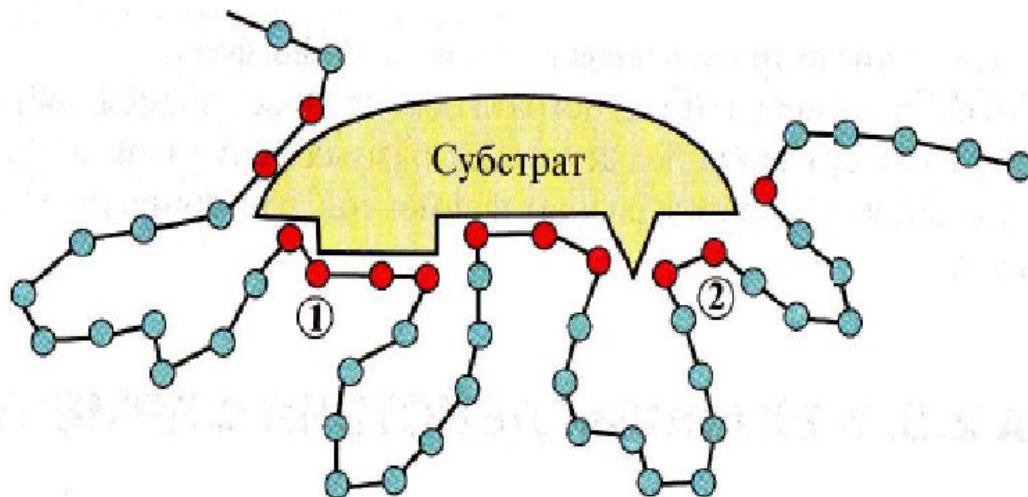


Схема строения активного центра фермента.

Красным цветом отмечены аминокислоты, образующие активный центр фермента: 1 — участок связывания; 2 — каталитический участок

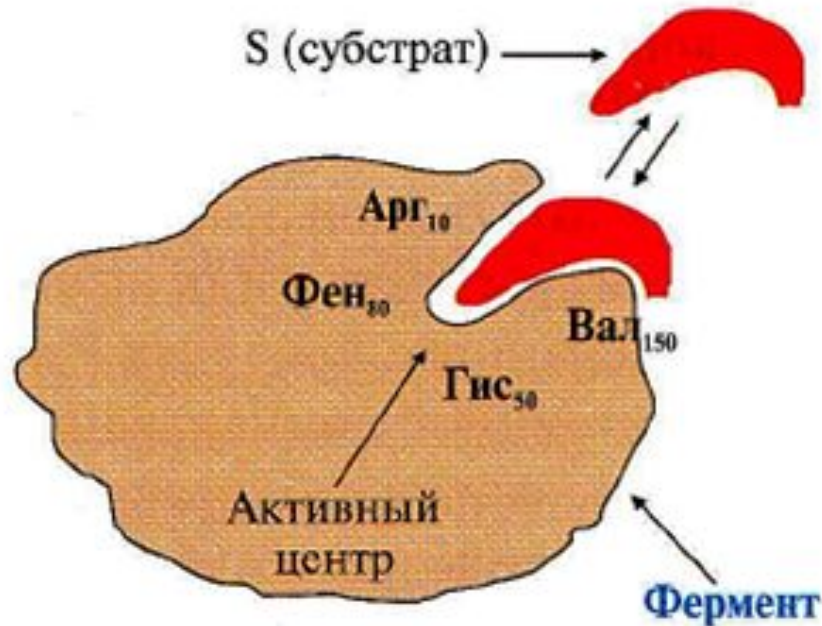
**Субстрат (S) — вещество, вступающее в ферментативную реакцию**

**Субстрат комплементарен АЦ фермента («ключ-замок»)**

**Продукт (P) — вещество, которое образуется в процессе реакции**

**Продукт не имеет сродства к активному центру фермента**

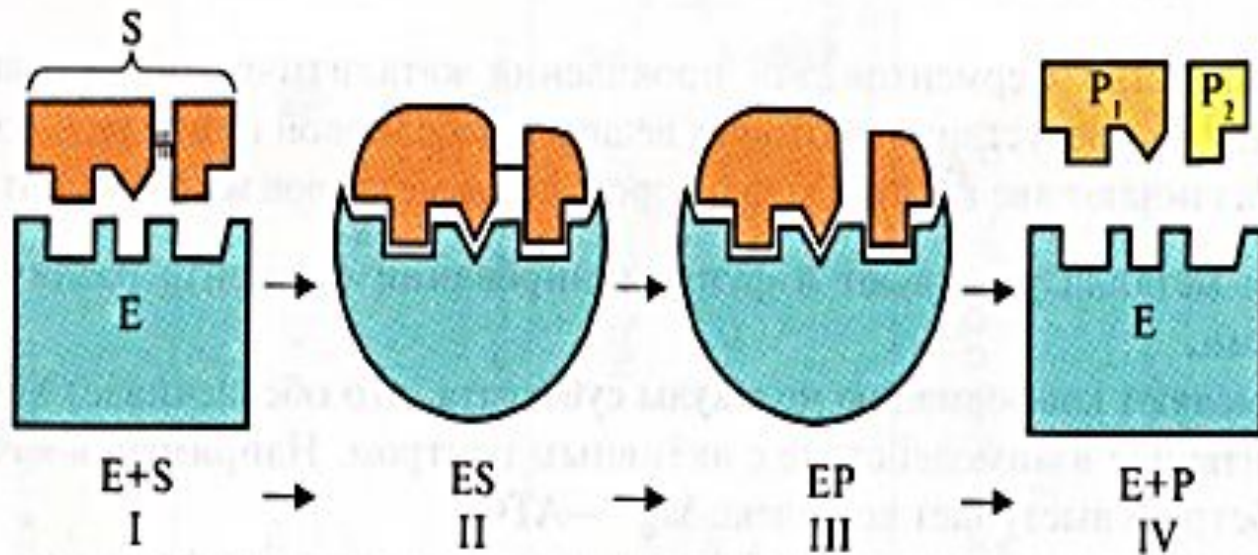
# Связывание субстрата в активном центре фермента



**Связывание субстрата в активном центре фермента**

Арг<sub>10</sub>, Фен<sub>80</sub>, Гис<sub>50</sub>, Вал<sub>150</sub> — аминокислотные остатки, радикалы которых принимают участие в формировании активного центра фермента

# Механизм действия ферментов: этапы ферментативного катализа



## Этапы ферментативного катализа:

I — этап сближения и ориентации субстрата в активном центре фермента; II — образование фермент-субстратного комплекса (ES); III — образование нестабильного комплекса фермент—продукт (EP); IV — высвобождение продуктов реакции из активного центра фермента



# Фермент-субстратный комплекс (ES)

- Образование ES – это ключевой момент ферментативной реакции, основа высокой эффективности катализа
- ES образуется в результате **индуцированного соответствия** фермента и субстрата

(теория Д. Кошленда, 1958) :

- **субстрат индуцирует конформационные изменения фермента и его активный центр принимает необходимую для связывания с субстратом пространственную ориентацию**

**(фермент активен только в присутствии субстрата)**

- субстрат также претерпевает конформационные перестройки

# Пример индуцированного соответствия

- Каталаза – гемопротейн  
(сложный фермент: белковая часть + гем)
- **неактивная каталаза:** железо в составе гема находится под плоскостью порфиринового кольца
- **активная каталаза:** при взаимодействии с  $\text{H}_2\text{O}_2$  железо перемещается в плоскость кольца, «настраивая» активный центр фермента



Итак, высокая каталитическая  
эффективность ферментов  
обусловлена

- **Высокой специфичностью связывания АЦ фермента и субстрата** и образованием ES-комплекса
- **Конформационной лабильностью ферментов**, которая является основой их высокой специфичности

# Специфичность ферментов

- **Каталитическая (реакционная) специфичность** – способность фермента катализировать одну химическую реакцию или один тип реакций
  - **Пример:** реакции гидролиза, окисления-восстановления
  - один и тот же субстрат может подвергаться разным превращениям под влиянием разных ферментов
- **Исключение:** лиазы, в одном направлении, катализируют негидролитическое расщепление субстрата с образованием двойной связи, а в другом – присоединение по кратной связи

## Специфичность ферментов

- **Субстратная специфичность** – способность фермента взаимодействовать с одним (**абсолютная**) или несколькими субстратами со сходным строением и типом связей (**относительная, групповая**)
  - абсолютная субстратная специфичность
    - уреаза: гидролиз мочевины
    - аргиназа: гидролиз аргинина
  - относительная субстратная специфичность
    - пищеварительные ферменты
  - стереоспецифичность
    - лактатдегидрогеназа: окисление только L-лактата

# Сложные ферменты

Белок (**апофермент**) + кофактор (кофермент) → активный фермент (**холофермент**)

- апофермент – не активен
- большинство природных ферментов – сложные белки-протеиды
- простые ферменты: пищеварительные
- **кофактор** – небелковая часть сложного фермента (лат. «вместе делающий»)

# Кофакторы

- **По химической природе:**

- неорганические вещества (ионы металлов)
- органические вещества (производные витаминов) - *коферменты*

- **По виду химической связи:**

- слабые взаимодействия (присутствуют в активном центре фермента только в момент реакции)
- ковалентная связь (*простетическая группа*)

- **Роль кофактора:**

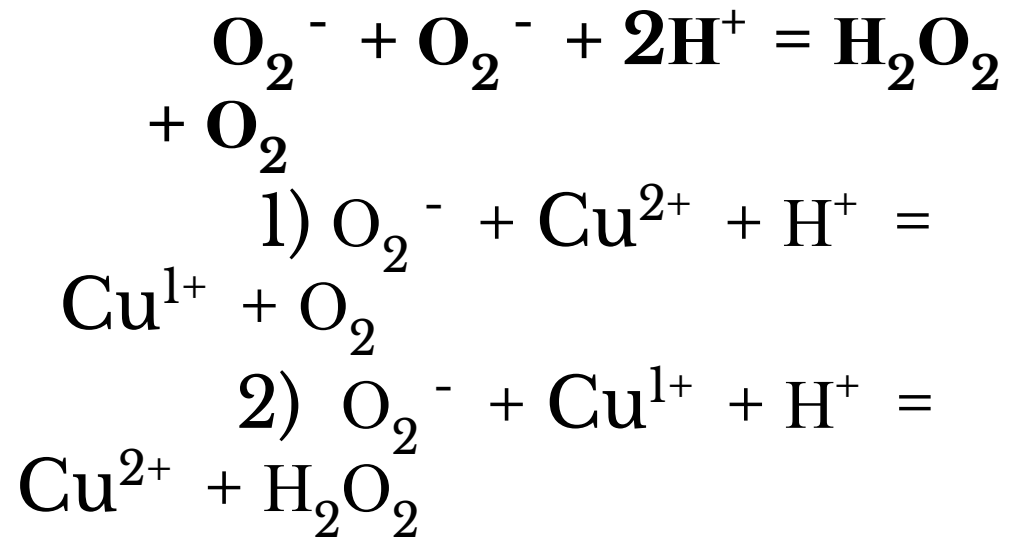
- изменение конформации фермента, субстрата
- непосредственное участие в реакции (косубстрат)

## Кофакторы – ионы металлов: способы участия в ферментативном катализе

- Изменяют конформацию субстрата ( $Mg^{2+}$ -АТФ)
- Стабилизируют конформацию апофермента ( $Zn^{2+}$  стабилизирует IV структуру алкогольдегидрогеназы)
- Участвует в катализе (ионы железа, меди участвуют в переносе электронов)

## *Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД)*

- Zn необходим для стабилизации молекулы
- Cu – активный участник в реакции дисмутации супероксид-аниона:



# Коферменты, обратимо связанные с апоферментом

- $\text{NAD}^+$  ,  $\text{NADP}^+$  – кофермент оксидоредуктаз, источник синтеза – никотиновая кислота (vit PP)
- *HS-CoA (кофермент А)* - кофермент ацилтрансфераз, источник синтеза – пантотеновая кислота (vit B<sub>5</sub>)
- *тетрагидрофолат (H<sub>4</sub>-фолат)* - кофермент трансфераз - переносчиков C1-фрагментов, источник синтеза – фолиевая кислота (vit B<sub>9</sub>)



# Простетические группы

- **флавиновые нуклеотиды *FAD, FMN*** – коферменты оксидоредуктаз, источник синтеза - рибофлавин (vit B<sub>2</sub>)
- **пиридоксальфосфат** - кофермент аминотрансфераз, источник синтеза - пиридоксин (vit B<sub>6</sub>)
- **тиаминпирофосфат** - кофермент оксидоредуктаз в реакциях окислительного декарбоксилирования кетокислот и кетосахаров, источник синтеза – тиамин (vit B<sub>1</sub>)
- **биоцитин** - кофермент лигаз, образующих связи C – C, источник синтеза - биотин (vit H)

# Мультиферментные комплексы

## Комплексы ферментов, катализирующие последовательные этапы превращения какого-либо субстрата

### ● Отличительные особенности комплексов:

- прочность ассоциации ферментов
- молекулярные массы от  $2,3 \cdot 10^6$  до  $10 \cdot 10^6$
- определенный порядок расположения ферментов в соответствии с последовательностью прохождения этапов превращения исходного субстрата

### ● Биологическая значимость комплексов: повышение эффективности процесса превращения сокращение расстояния, на которые молекулы промежуточных продуктов должны перемещаться при действии изолированных ферментов

### ● Примеры комплексов:

- ✓ митохондриальная пируватдегидрогеназа и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа
- ✓ цитоплазматическая синтаза высших жирных кислот
- ✓ ферментные комплексы дыхательной цепи митохондрий

# Кинетика ферментативного катализа: условия протекания ферментативных реакций

- Активность фермента, или скорость ферментативной реакции определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени
  - ▣ активность фермента (IME) = мкмоль (S или P) / мин
  - ▣ уд. активность фермента = мкмоль (S или P) / (мин • мг белка)

# Факторы, определяющие активность фермента (скорость реакции)

- Количество фермента
- **Количество субстрата**
- Количество продукта (для аллостерических ферментов)
- Концентрация кофактора (для сложных ферментов)
- Присутствие **активаторов или ингибиторов**
- **Температура**
- **pH среды**

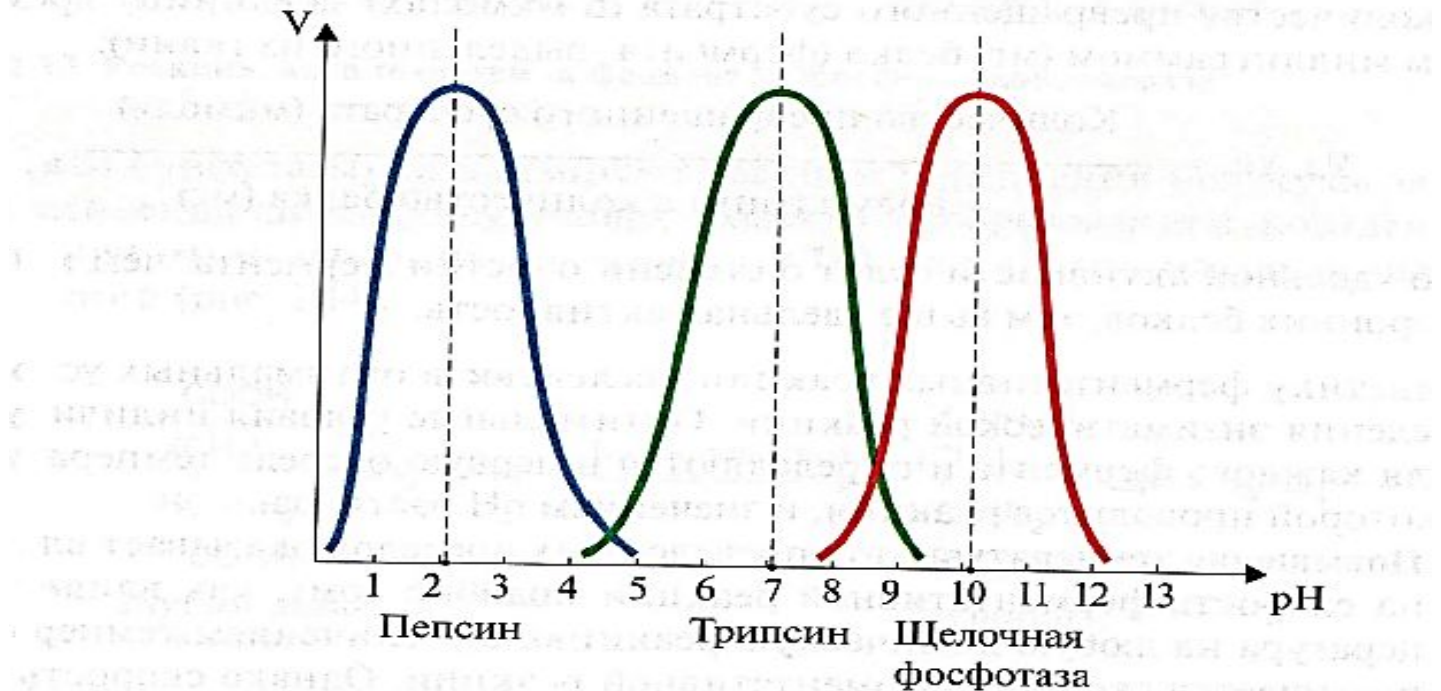
# Скорость реакции и температура



**Зависимость скорости ферментативной реакции ( $V$ ) от температуры**

Влияние температуры обусловлено броуновским движением молекул и денатурацией белка (при температуре выше 40° C)

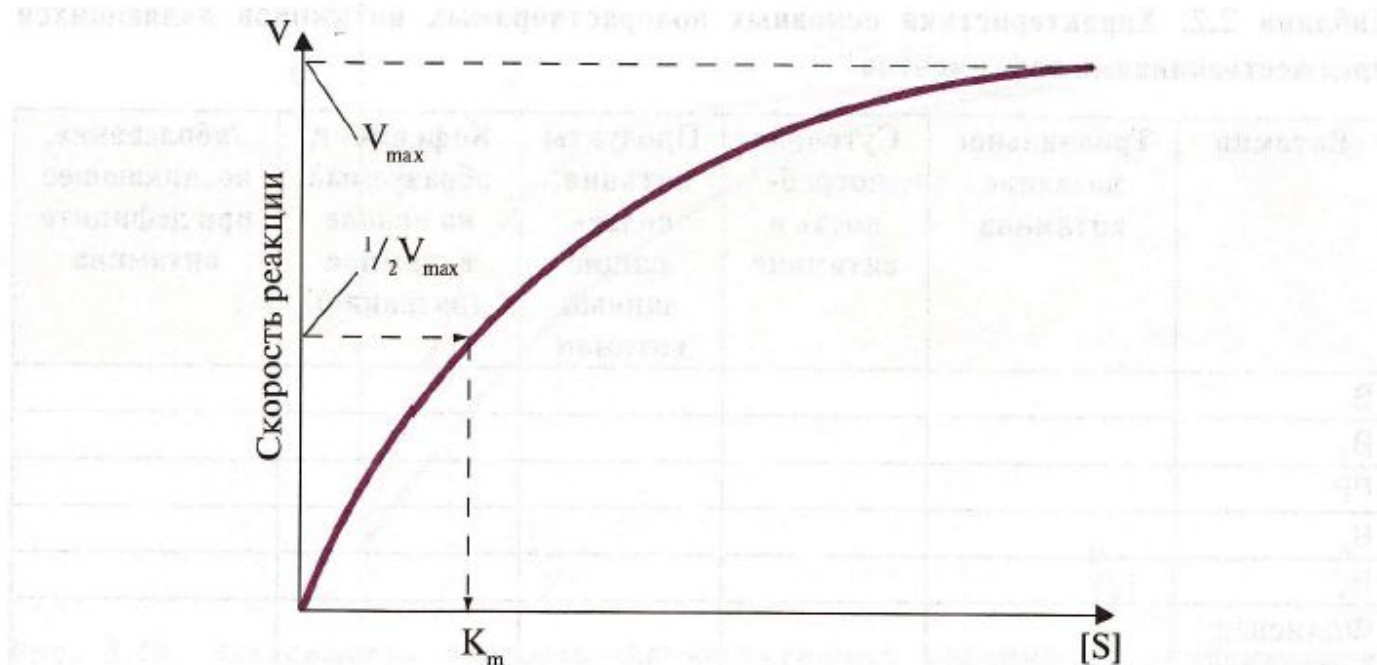
# Скорость реакции и рН



**Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от pH среды**

Влияние pH обусловлено изменением ионизации функциональных групп активного центра фермента и субстрата, а также денатурацией фермента при значительных изменениях pH

# Скорость реакции и концентрация субстрата



**Зависимость скорости реакции (V) от концентрации субстрата S:**

V<sub>max</sub> — максимальная скорость реакции при данной концентрации фермента в оптимальных условиях проведения реакции; K<sub>m</sub> — константа Михаэлиса

**Константа Михаэлиса** (концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна 1/2 от максимальной).

Характеризует сродство фермента к субстрату (чем меньше значение, тем выше сродство). Является величиной постоянной.

# Регуляция активности ферментов – основа регуляции метаболических путей

## Способы регуляции активности ферментов:

- Изменение количества фермента
- Доступность субстрата и кофермента
- Изменение каталитической активности фермента

**Регуляторные ферменты** (ключевые) регулируют скорость метаболического пути



# Изменение количества фермента

**Регуляция на уровне транскрипции: индукция синтеза**



# Доступность молекул субстрата и кофермента

Конститутивные ферменты – синтезируются постоянно, независимо от наличия субстрата

- **Индукцибельные (адаптивные) ферменты** – синтезируются только при наличии субстрата

**ПРИМЕР:** алкогольдегидрогеназа

# Регуляция каталитической активности ферментов

## **□ Белок-белковые взаимодействия**

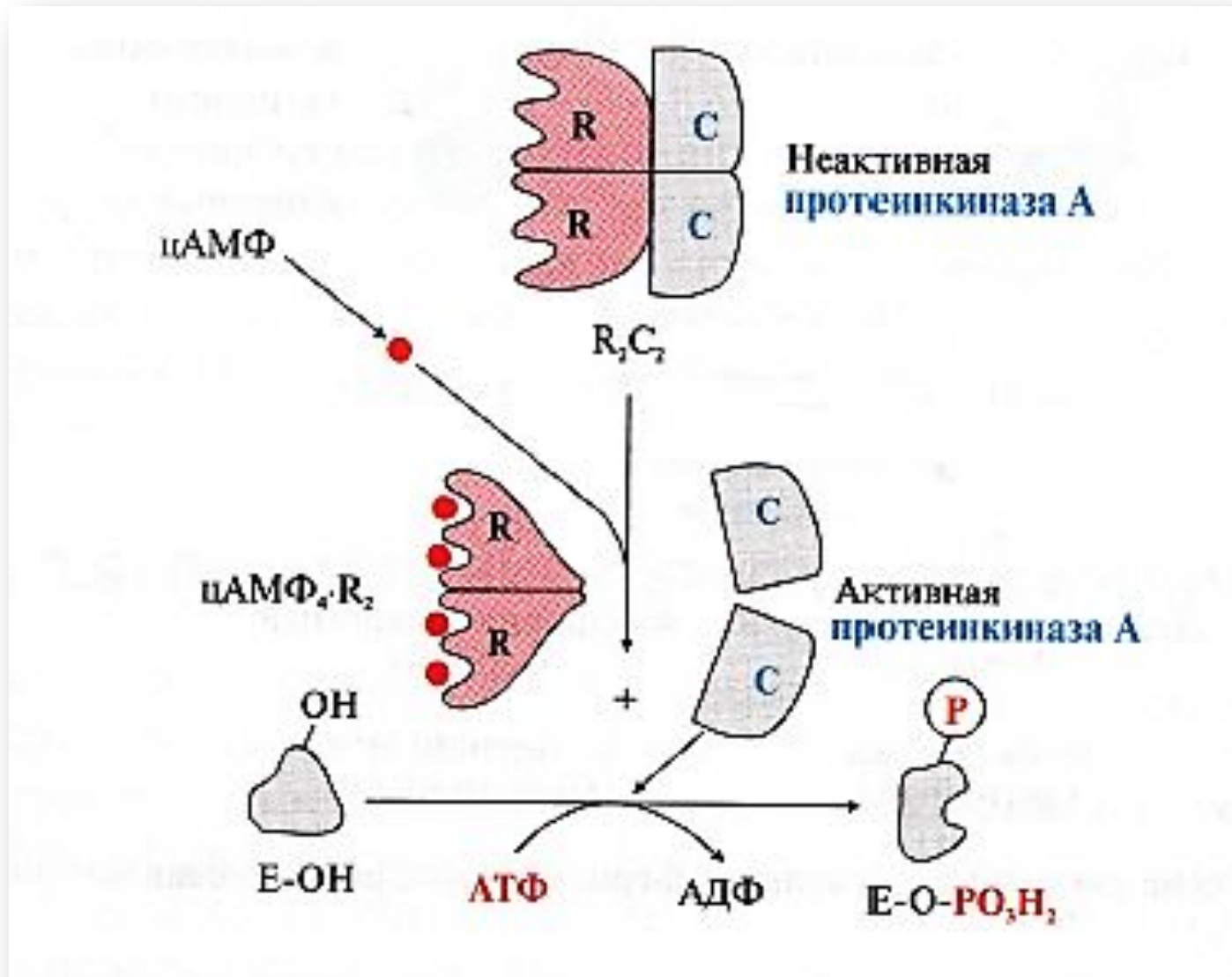
- присоединение белков-активаторов
- ассоциация и диссоциация протомеров

## **□ Фосфорилирование и дефосфорилирование**

### **□ Частичный протеолиз**

### **□ Аллостерическая регуляция**

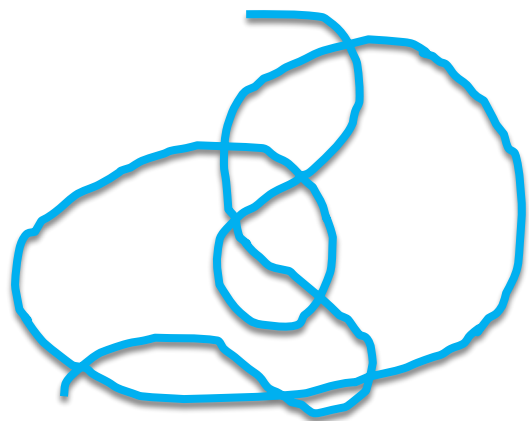
# Ассоциация-диссоциация протомеров



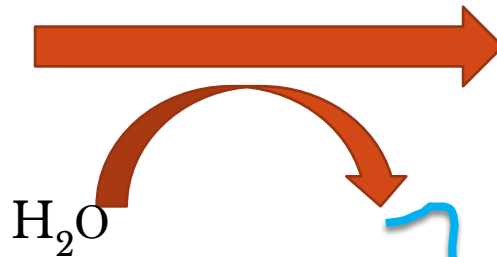
# Фосфорилирование - дефосфорилирование



# Частичный протеолиз



Пепсиноген (неактивный)  
М. в. 42000



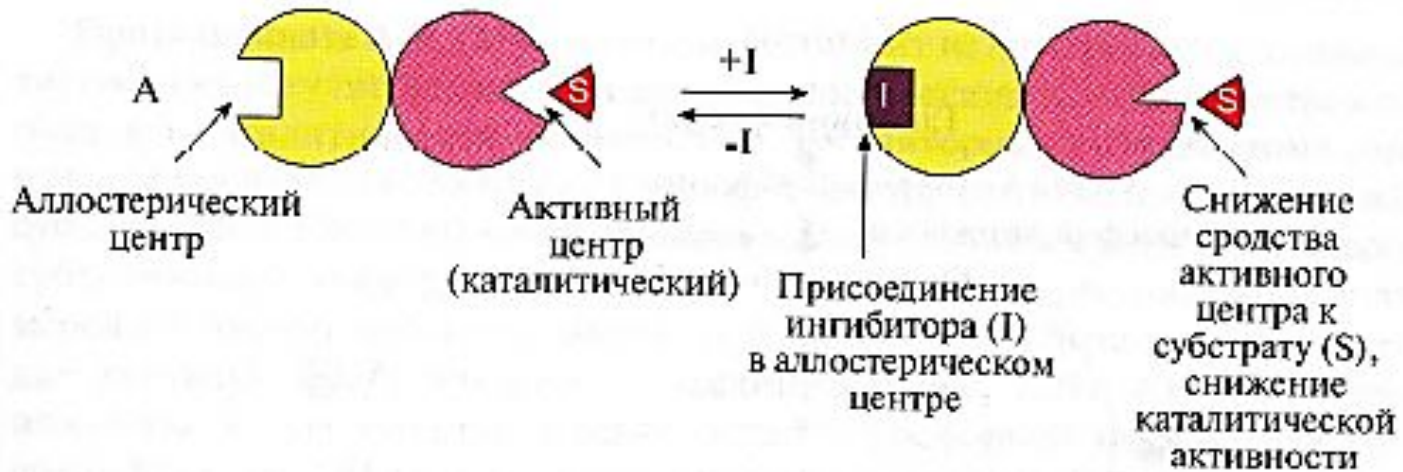
Пептид



Пепсин (активный)  
М. в. 35000

- Изменение первичной структуры белка
- Изменение конформации молекулы, формирование активного центра
- Необратимая регуляция

# Аллостерическая регуляция



# Аллостерические ферменты

- Олигомерные белки (2 и более субъединиц)
- Имеют аллостерический центр (один или несколько)
- Активный и аллостерический центры находятся в разных протомерах
- Регуляторы активности - эффекторы (активаторы, ингибиторы)
- Изменение конформации регуляторного протомера приводит к изменению конформации молекулы в целом
- Катализируют ключевые реакции
- Аллостерическая регуляция обратима
- **ПРИМЕРЫ** эффекторов:  
продукты реакции, а также АТФ/АДФ,  $\text{NAD}^+$ /  $\text{NADH}$



# Ингибиторы ферментов

- **Ингибиторы – вещества, снижающие каталитическую активность фермента**

- **По типу химической связи:**

- обратимые (слабые связи)
- необратимые (ковалентная связь)

- **По механизму действия:**

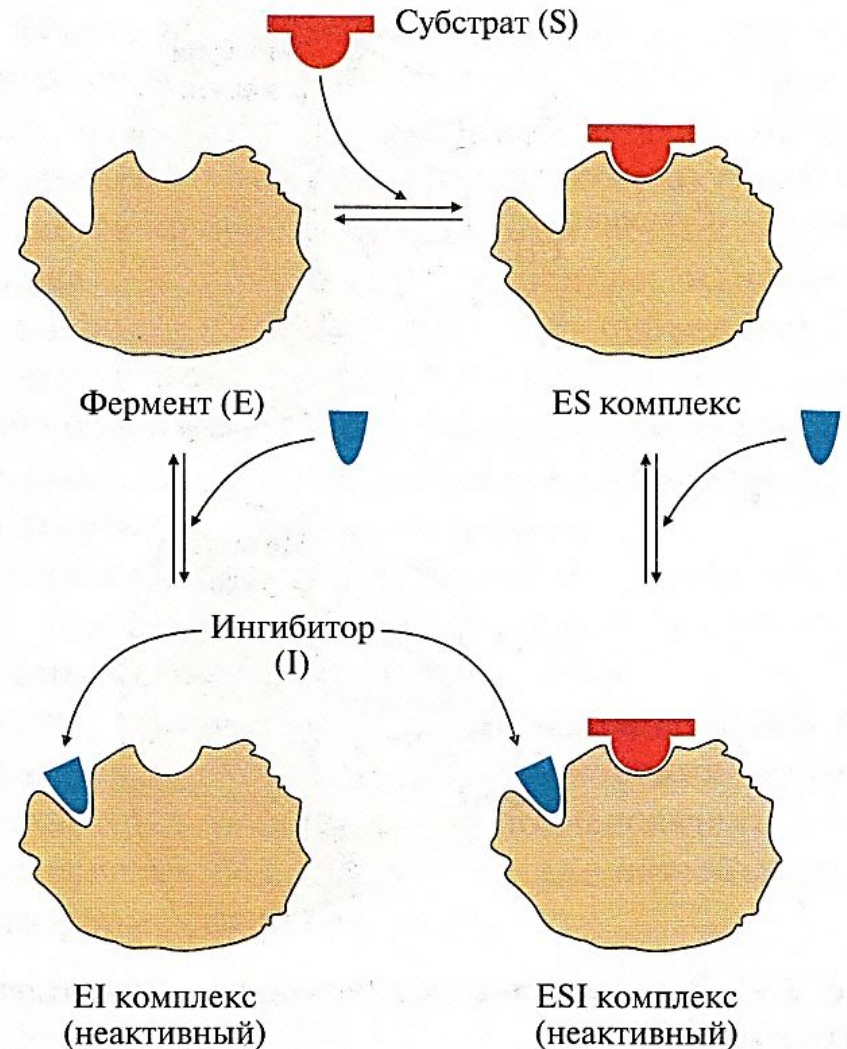
- конкурентные
- неконкурентные

# Конкурентные ингибиторы

- Структурные аналоги субстратов
- Связываются в активном центре фермента
- Формируется комплекс EI
- Не изменяют структуры фермента
- Продукт реакции не образуется
- Ингибитор вытесняется из активного центра фермента при увеличении концентрации субстрата
- Снижают скорость реакции, но не изменяют  $V_{max}$ .  
Почему?
- «Изменяют» (повышают)  $K_m$ . В чем состоит условность «изменения»  $K_m$ ?

# Неконкурентное ингибирование

- Ингибитор связывается не с активным центром
- Образуется комплекс ESI
- Ингибитор изменяет конформацию фермента и активного центра
- Снижают  $V_{max}$
- Не изменяют  $K_m$

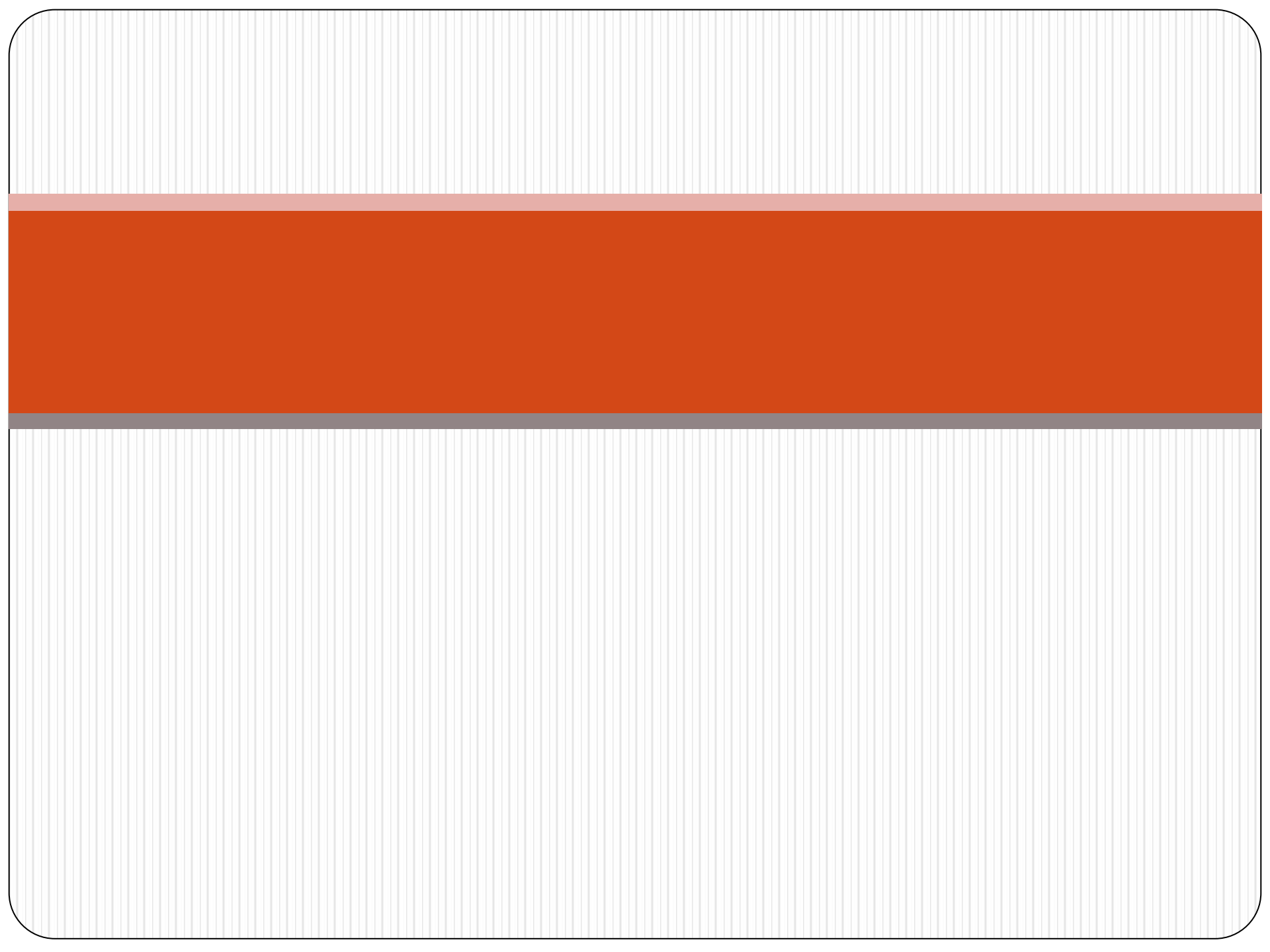


# Задание для самостоятельной работы

1. Используя материал слайдов лекции, закончите таблицу:

Кофермент	Витамин
NAD, NADP	PP, никотиновая кислота
HS-CoA	
	B9, фолиевая кислота
FAD, FMN	
	B6, пиридоксин
	B1, тиамин
Биоцитин	

2. Используя интернет сайты, найдите информацию о лекарственных препаратах, механизм действия которых связан с ингибированием активности ферментов. Приведите примеры лекарственных препаратов.



# Заключение

- Основа физиологических процессов – биохимические реакции
- Скорость биохимических реакций в организме катализируют белки-ферменты, многие из которых нуждаются в кофакторах- микроэлементах и производных витаминов
- Ферментам свойственна высокая каталитическая эффективность, специфичность действия, конформационная лабильность, способностью осуществлять катализ в «мягких» условиях внутренней среды организма
- Активность ферментов регулируется. Это свойство ферментов является основой регуляции метаболических процессов в организме

# Литература

1. Березов Т.Т. Биологическая химия: учебник для студ. мед. ВУЗов [Рекомендовано УМО] / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. -3-е изд., перераб. и доп. -М.: Медицина, 2004. -704 с. (С. 114-126; 129-145; 157)
2. Биохимия: учебник для студентов медицинских вузов ВУЗов [Рекомендовано отраслевым министерством] / Е. С. Северин - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. -784 с. (С. 76-79; 83-101)
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник для студентов ВУЗов / ред. С. Е. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 624 с. (С. 65-72; 76-86)