Курский государственный медицинский университет

# Лекция №1
# Структура, свойства и функции ферментов.

- **ФЕРМЕНТЫ (ЭНЗИМЫ) – ВЕЩЕСТВА БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ, СПОСОБНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИ УСКОРЯТЬ ПРОТЕКАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ**

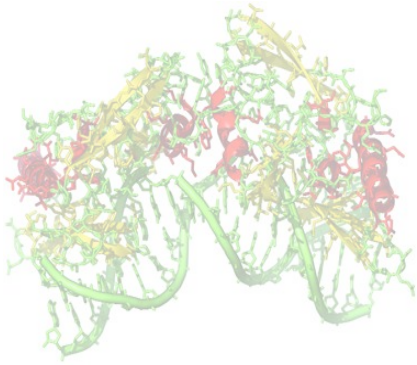
**Модель фермента нуклеозидфосфорилазы**

# Значение для изучения:

1. **Ферменты - биологические регуляторы химических процессов в клетке (основа жизнедеятельности)**
2. **Нарушения в их структуре и функции – возникновение энзимопатий**
3. **Энзимодиагностика**
4. **Энзимотерапия**
5. **Использование к качестве реактивов для определения метаболитов**

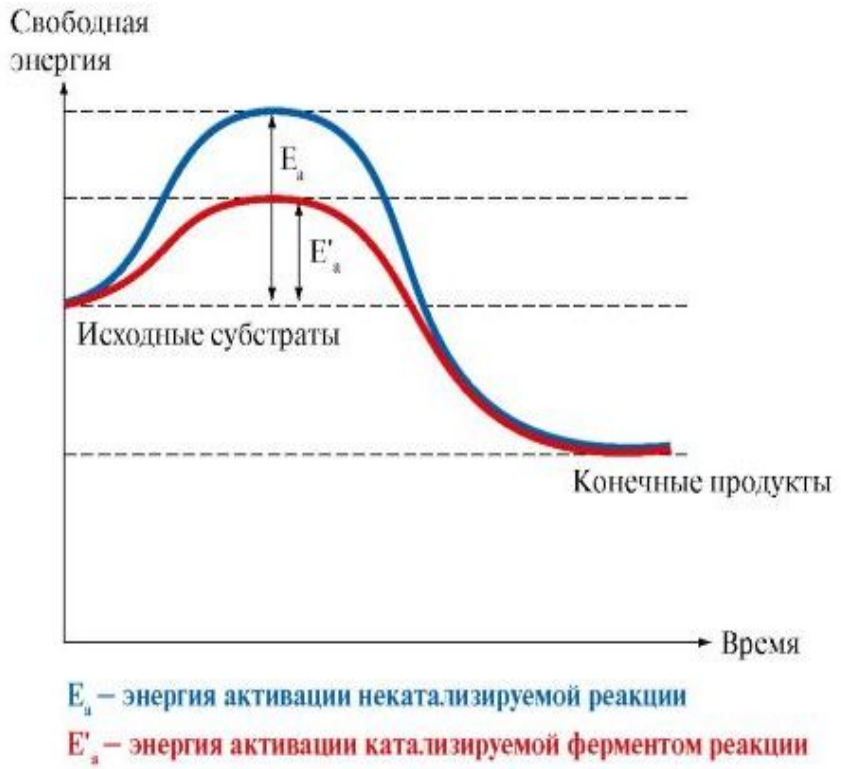
# Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что:

1. **Небиологические катализаторы и энзимы ускоряют энергетически возможные реакции;**
2. **Ведут реакции в обход энергетического барьера;**



# Изменение свободной энергии в ходе химической реакции, некатализируемой и катализируемой ферментами

- **Известно, для того чтобы прошла реакция, субстраты должны получить такое количество дополнительной энергии (называемой энергией активации Ea), которое необходимо для вступления молекул субстрата в реакцию. В случае ферментативной реакции происходит снижение энергии активации, что обеспечивает более эффективное протекание реакции. Фермент понижает энергию активации Ea, т. е. снижает высоту энергетического барьера; в результате возрастает доля реакционно-способных молекул и повышается скорость реакции.**



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

3. В ходе катализа **направление** реакции **не изменяется**;
4. **Не расходуются** во время реакции;
5. Требуется **небольшое** их количество.

# Отличие ферментов от небиологических катализаторов заключается в том, что:

1. **Скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами;**
2. **Ферменты обладают высокой специфичностью;**
3. **Энзимы действуют при определенных оптимальных условиях (температура, pH, микроэлементы, кооперативность);**
4. **Скорость ферментативной реакции может регулироваться.**

# Пять основных свойств ферментов как биологических катализаторов

1. Субстратная специфичность
2. Каталитическая эффективность
3. Конформационная лабильность
4. Способность ферментов к регуляции
5. Оптимальные условия протекания ферментативных реакций

# Структура ферментов

**Фермент (энзим)**

**Простой белок**
**(РНК-аза, пищевые ферменты)**

**Сложный белок**
**(холофермент)**

**Белковая часть**
**(апофермент – отвечает за активность и специфичность действия фермента)**

**Небелковая часть**
**(кофактор – отвечает за каталитическую функцию фермента)**

**Простетическая группа –**
**прочно связана с апоферментом**

**Кофермент –**
**легко отделяется от апофермента**

# Небелковая часть (кофактор)

**Простетическая группа**

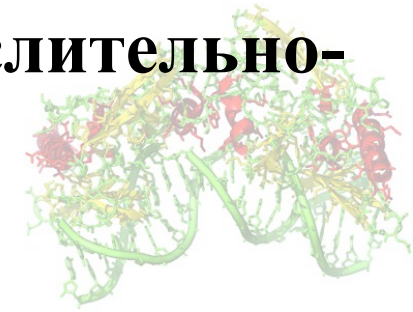
- ФАД
- ФМН
- ПФ (Вит. $B_6$)

**Кофермент**

- $НАД^+$
- $НАДФ^+$
- HS-KoA
- $H_4$-фолат

# Небелковая часть

1. **Производные витаминов**
2. **Гемы, входящие в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, гуанилатциклазы, NO-синтазы и являющиеся простетической группой ферментов**
3. **Нуклеотиды – доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты**
4. **Убихинон, или кофермент Q, участвующий в переносе электронов и протонов**
5. **Фосфоаденозилметионин, участвующий в переносе сульфата**
6. **S-аденозилметионин – донор метильной группы**
7. **Глутатион, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях**

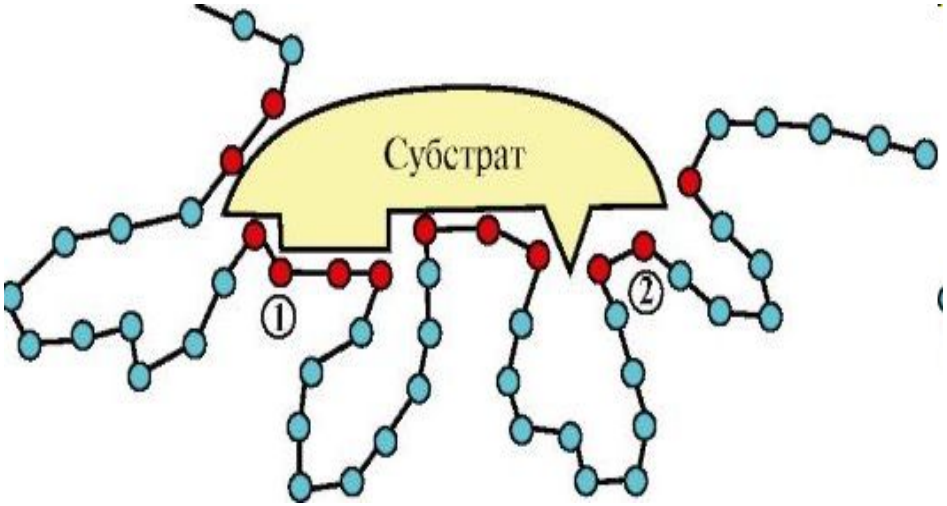


# Функции небелковой части фермента

1. **Перенос атомов водорода, электронов (окислительно-восстановительные реакции – НАД, ФАД и др.).**
2. **Перенос химических групп (фосфопиридоксаль, биотин и др.)**
3. **Реакции синтеза, изомеризации, расщепление связей (ТДФ и др.)**

# Активный центр ферментов

- **Активный центр ферментов - это определенный участок белковой молекулы, представленный уникальной комбинацией аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающую непосредственное взаимодействие ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа.**




**Красным цветом отмечены аминокислоты, образующие активный центр фермента:**

**1 - участок связывания;**

**2 - каталитический участок**

## Закономерности в построении активных центров

**1. В построении активных центров принимают участие небольшое количество радикалов аминокислот, обычно находящихся на значительном расстоянии друг от друга в полипептидной цепи.**

**2. Чаще всего в состав центра входят радикалы гис, сер, лиз, асп, цис.**

**3. В построении центров сложных ферментов участвуют химические группировки небелковой части.**

## Закономерности в построении активных центров

**4. Если фермент является олиго- или мультимером, то обычно на каждом протомере есть субстратный и каталитический участки.**

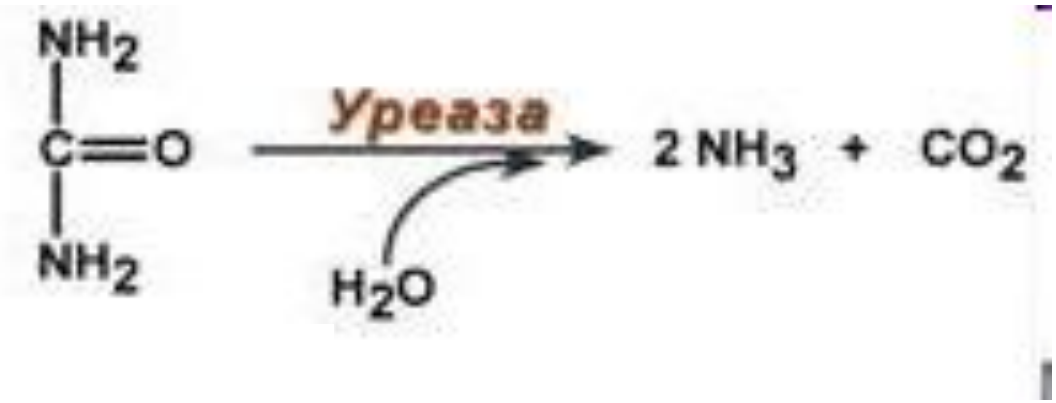
**5. Энергия взаимодействия субстрата с активным центром слабая с образование нековалентных связей**

**6. Активные центры формируются при образовании третичной и четвертичной структуры белковой части в процессе взаимодействия с субстратом (индуцированное соответствие).**

Активный центр фермента
Участок связывания
Каталитический участок
Обеспечивает субстратную специфичность (выбор субстрата)
Обеспечивает каталитическую специфичность выбора пути превращения данного субстрата
-Абсолютная субстратная специфичность
-Групповая субстратная специфичность
-Стереоспецифичность - абсолютная специфичность фермента только к одному из существующих стереоизомеров субстрата.
Специфичность пути превращения субстрата

# АБСОЛЮТНАЯ

# СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ - активный центр фермента комплементарен только одному субстрату

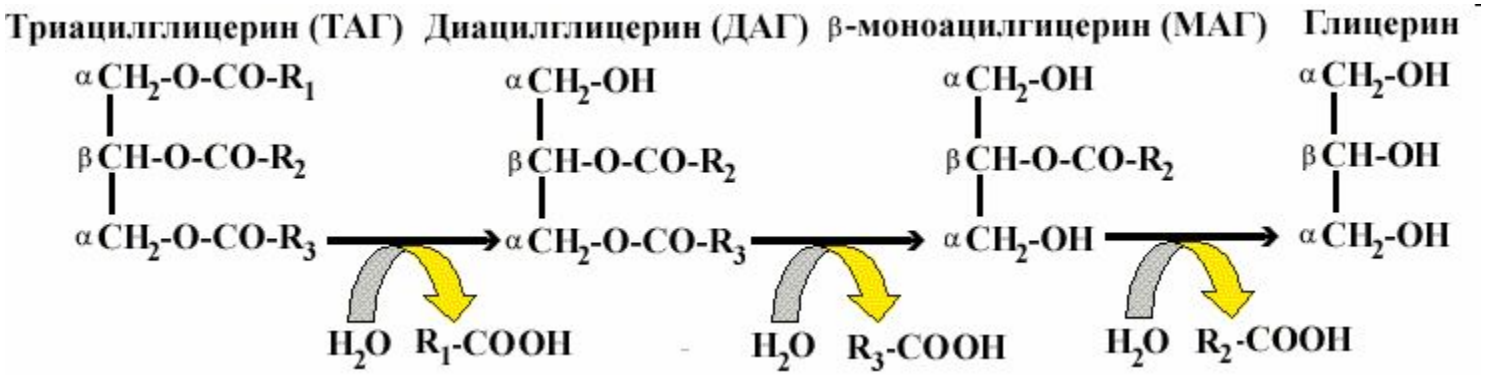



**Мочевина**

# ГРУППОВАЯ
# СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

**- фермент катализирует однотипную реакцию с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов.**

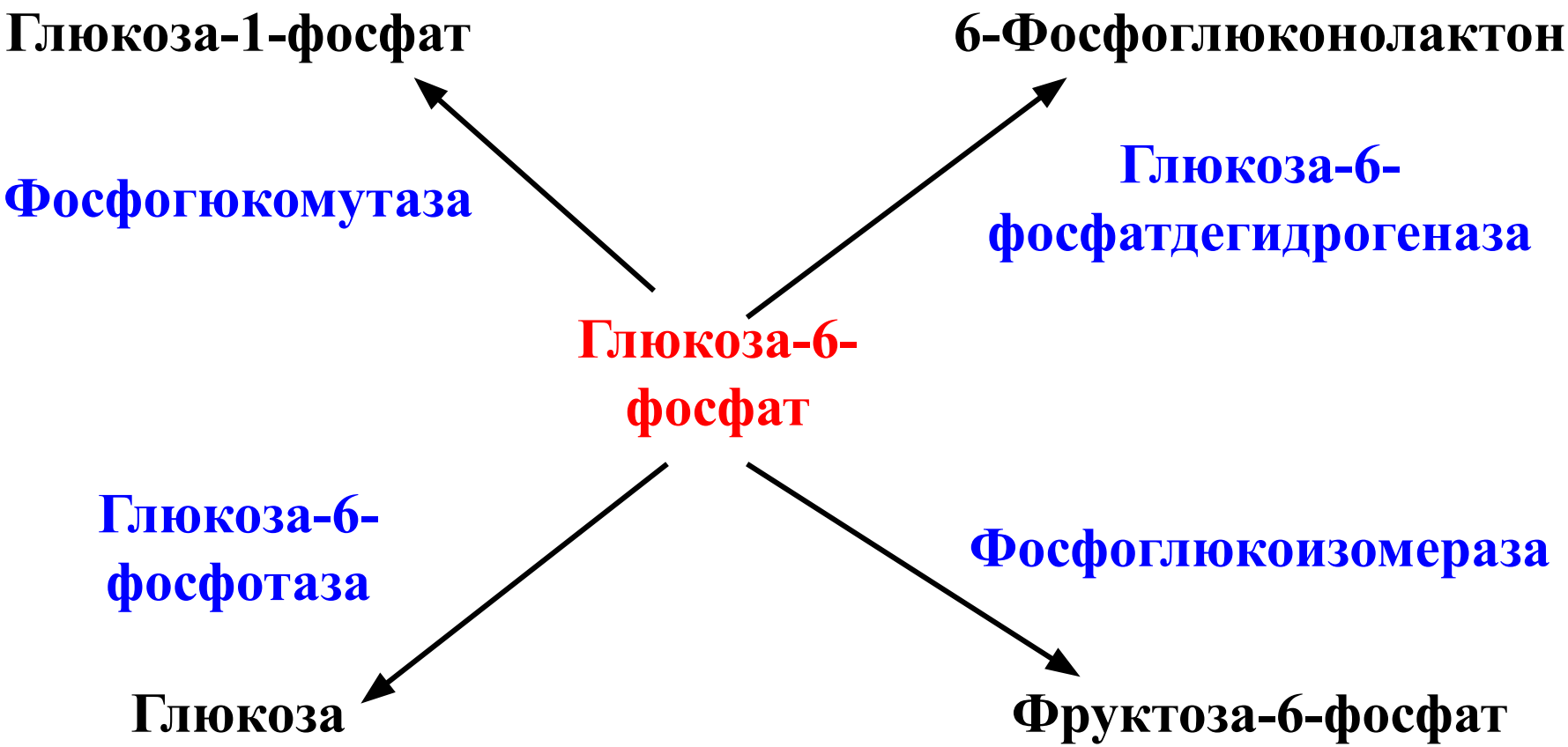
**Гидролиз жира осуществляется при участии панкреатической липазы**



**СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ** - **фермент проявляет абсолютную специфичность только к одному из существующих стереоизомеров субстрата**

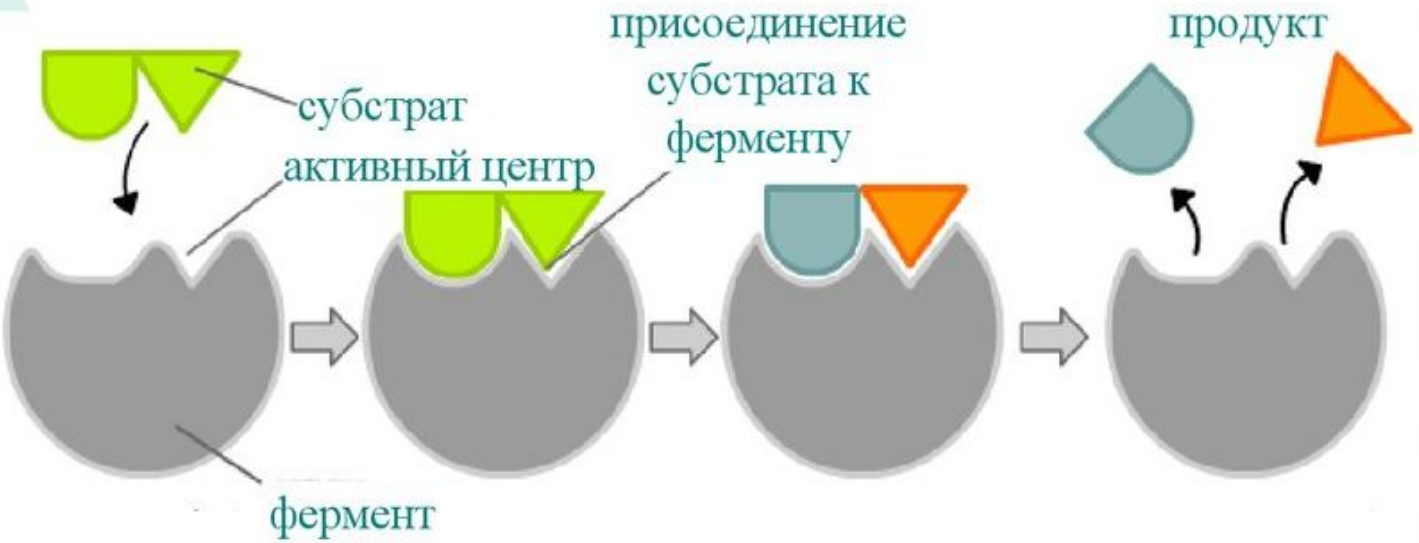
1. **Стереоспецифичность к D-сахарам**
2. **Стереоспецифичность к L-аминокислотам**
3. **Стереоспецифичносгь к α- и β-гликозидным связям**
4. **Стереоспецифичность к цистрансизомерам (Фермент фумараза оказывает действие только на фумарат. Малеинат (цис-изомер фумарата) не является субстратом фумаразы)**

# Каталитические пути превращения глюкозо-6-фосфата



# ТЕОРИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА С СУБСТРАТОМ

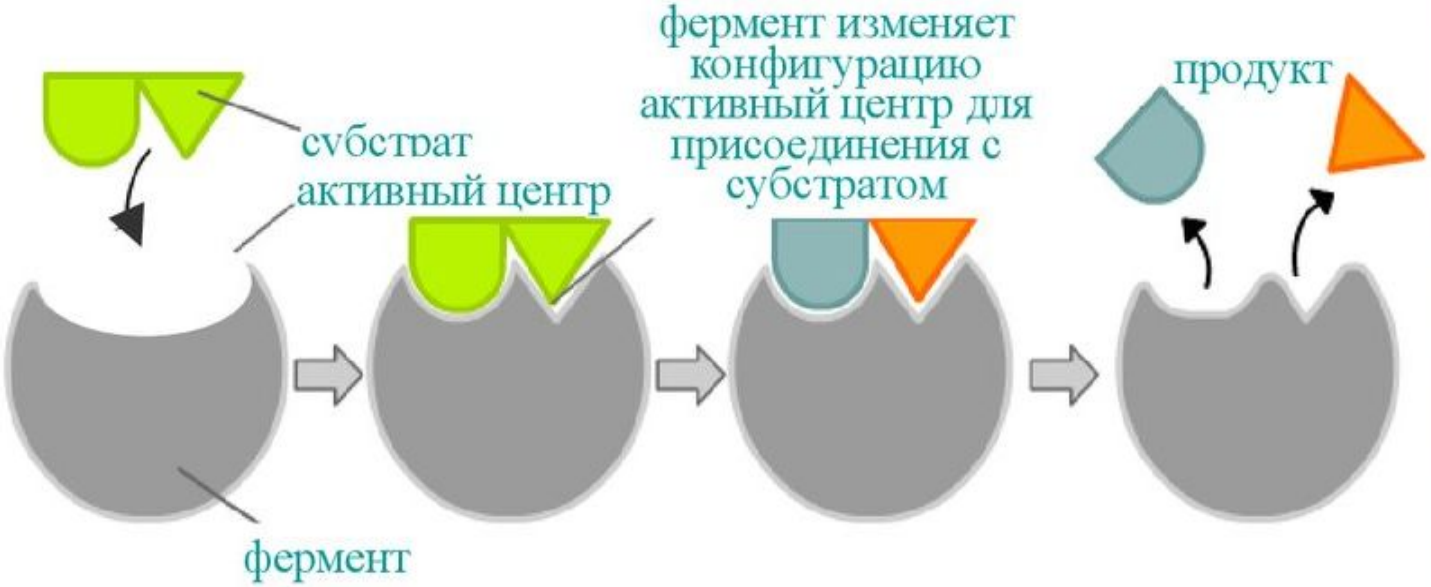
**Теория Э.Фишера, 1894 г. – «ключ-замок»**




Специфичность действия фермента определяется строгим соответствием геометрической структуры субстрата и активного центра фермента

# ТЕОРИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА С СУБСТРАТОМ

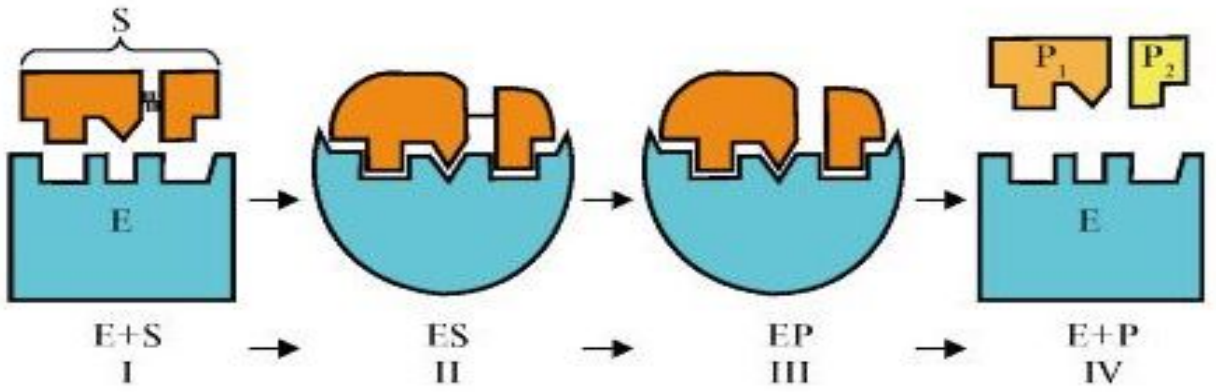
**Теория Д.Кошланда, 1950 г. – индуцированного соответствия субстрата и фермента, «рука-перчатка»**




В субстрате деформируются некоторые валентные связи и он подготавливается к дальнейшему каталитическому видоизменению, а в молекуле фермента происходят конформационные перестройки. Гипотеза Кошланда, основанная на допущении гибкости активного центра фермента, удовлетворительно объясняла активирование и ингибирование действия ферментов и регуляцию их активности при воздействии различных факторов

# Этапы ферментативного катализа

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

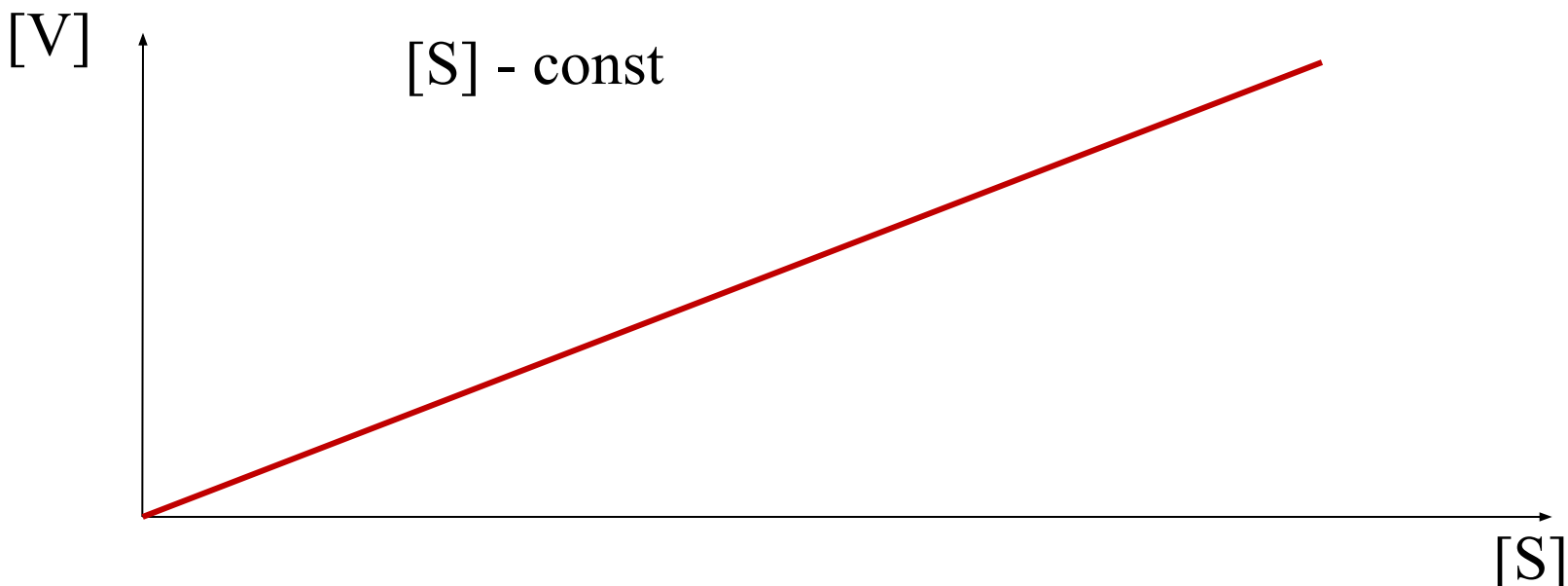


# Факторы, влияющие на активность ферментов

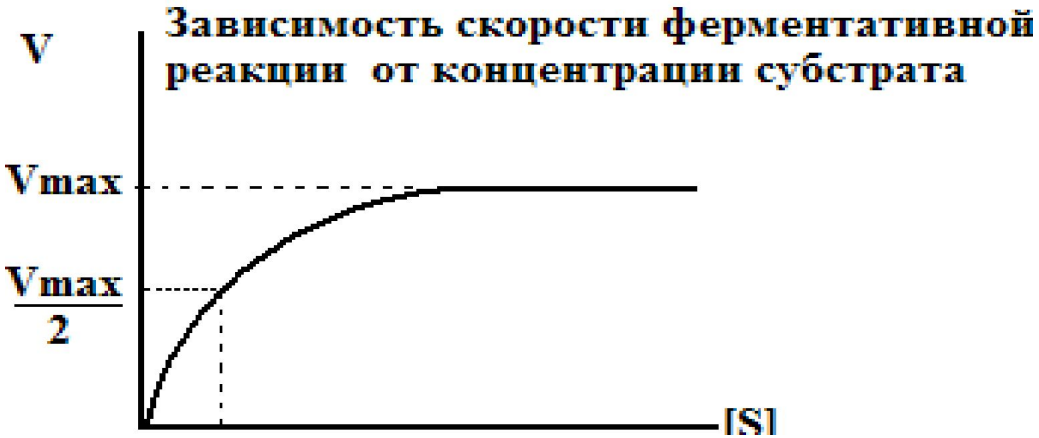
1. Концентрация фермента (энзима) [E]
2. Концентрация субстрата [S]
3. Температура
4. Концентрация ионов Н (pH)
5. Низкомолекулярные продукты

# Влияние [E]

**1. Рассмотрим зависимость скорости реакции от количества фермента. При условии избытка субстрата скорость реакции пропорциональна количеству фермента, но при избыточном количестве фермента прирост скорости реакции будет снижаться, поскольку уже не будет хватать субстрата.**



# График Михаэлиса - Ментен




**При высоких концентрациях субстрата наступает насыщение фермента субстратом, то есть наступает такой момент, когда уже все молекулы фермента задействованы в каталитическом процессе и прироста скорости реакции не будет. Скорость реакции выходит на максимальный уровень (Vmax) и дальше уже не зависит от концентрации субстрата. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата следует определять в той части кривой, которая ниже Vmax. Технически легче определить не максимальную скорость, а ½ Vmax. Этот параметр является главной характеристикой ферментативной реакции и дает возможность определить константу Михаелиса (Km).**

**Km (константа Михаэлиса) – это такая концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной.**
**Km выражется в молях.**
**Km = $10^{-1}$ – $10^{-6}$ – для клеток организма, величина const.**
**Отсюда выводится уравнение Михаэлиса–Ментен скорости ферментативной реакции.**

# Уравнение Михаэлиса - Ментен

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

**где**

**$V_{max}$ — максимальная скорость реакции;**

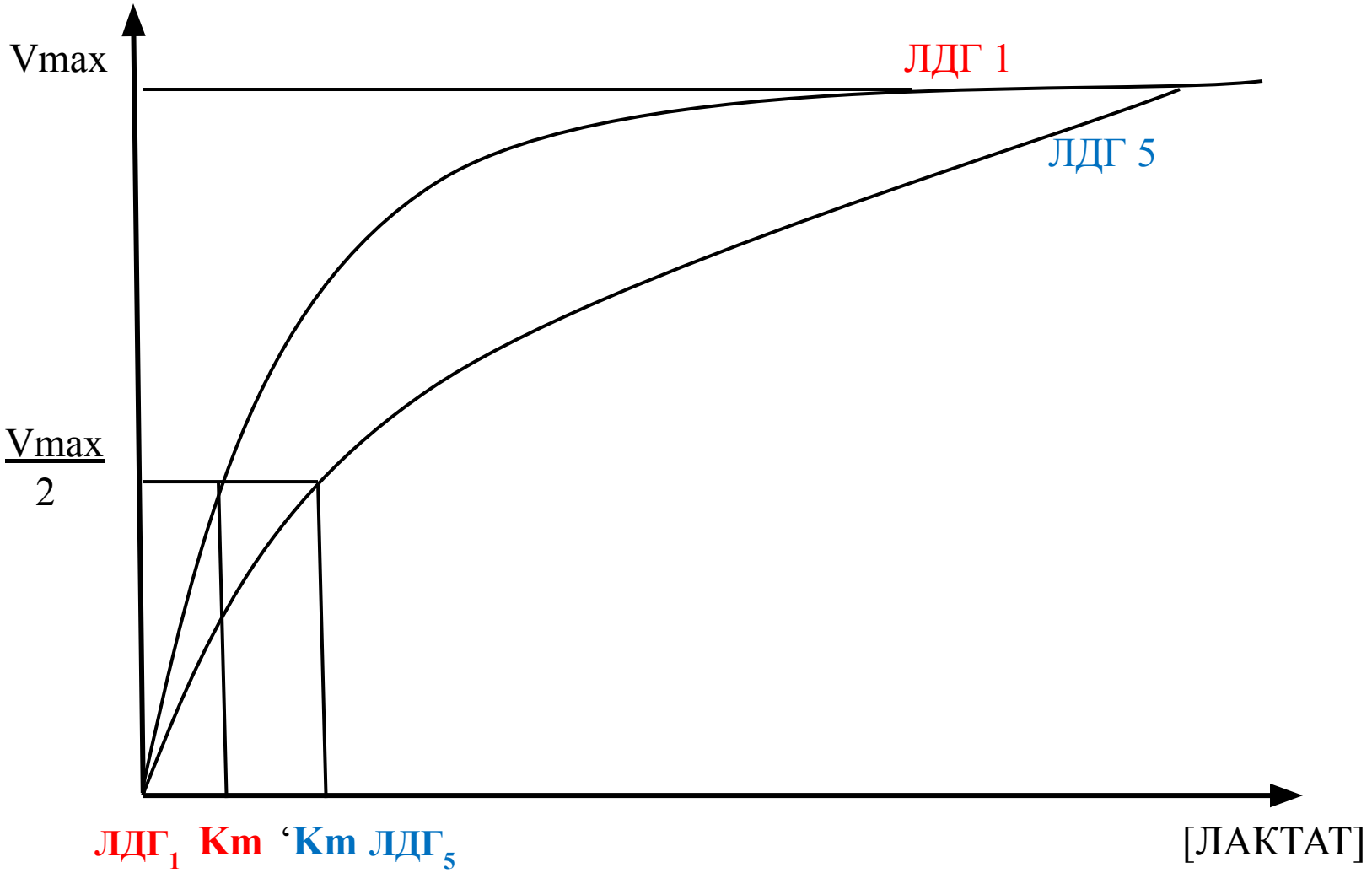
**$K_m$ — константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной;**

**[S] — концентрация субстрата.**

# Значение Km

**1. Показывает сродство [E] и [S]**

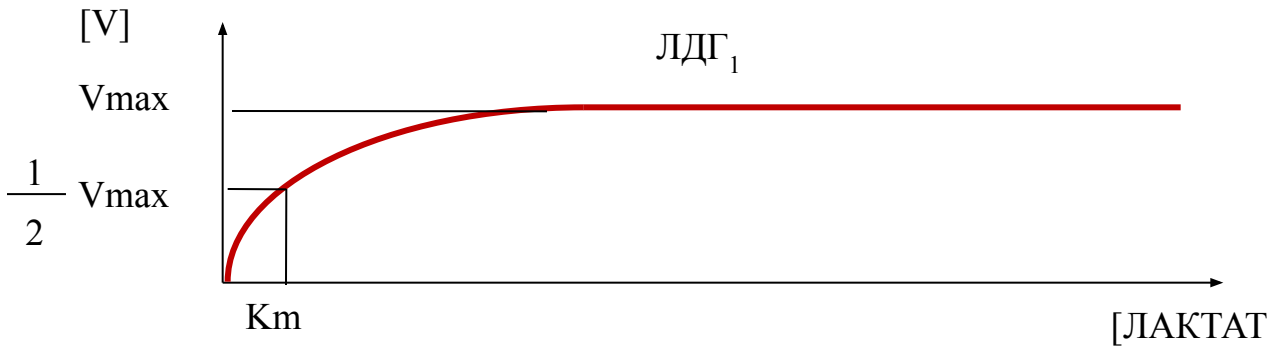
ЛАКТАТ $\xrightarrow[ЛДГ_5]{ЛДГ_1}$ Пируват

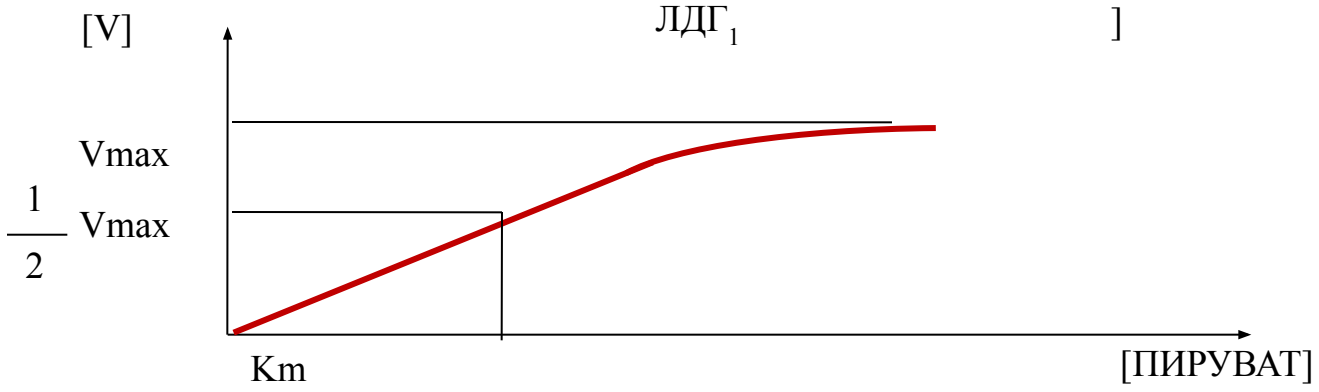


- **Например, этиленгликоль – составная часть антифриза и алкогольдегидрогеназа (АДГ) будет превращать его в щавелевую кислоту, которая является ядом для печени.**
- **Алкогольдегидрогеназа превращает этиловый спирт в уксусный альдегид и степень сродства АДГ к $C_2H_5OH$ выше, чем к этиленгликолю и на этом основан способ нейтрализации этиленгликоля.**

# Значение Km

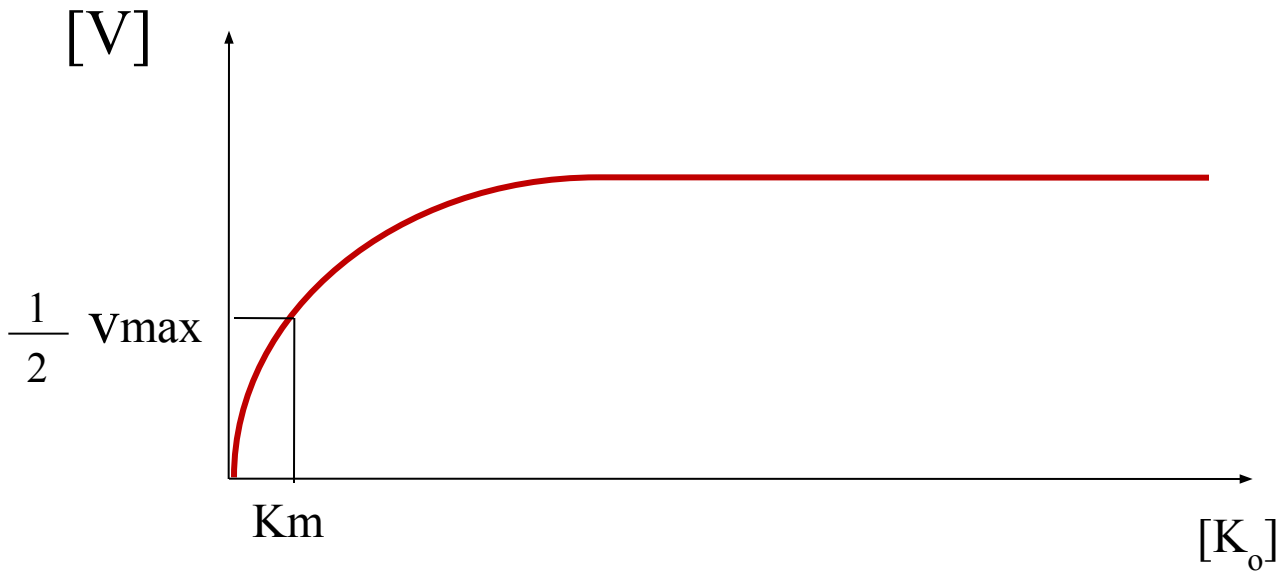
**2. Km – важная количественная характеристика фермента, определяет с каким [S] будет наиболее эффективно он связываться.**



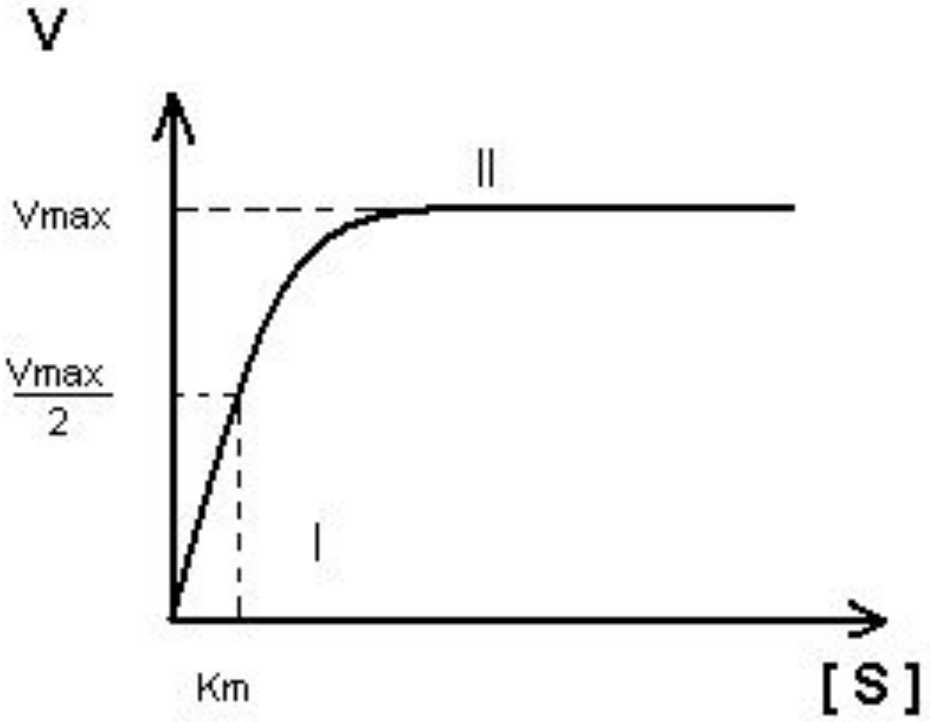



# Значение Km

3. **Позволяет определить вид ингибирования фермента.**
4. **Показывает сродство апофермента и кофактора.**



# Способ определения $K_m$




**Построение графика Михаэлиса-Ментен:**

**I участок – с увеличением концентрации субстрата увеличивается скорость ферментативной реакции**

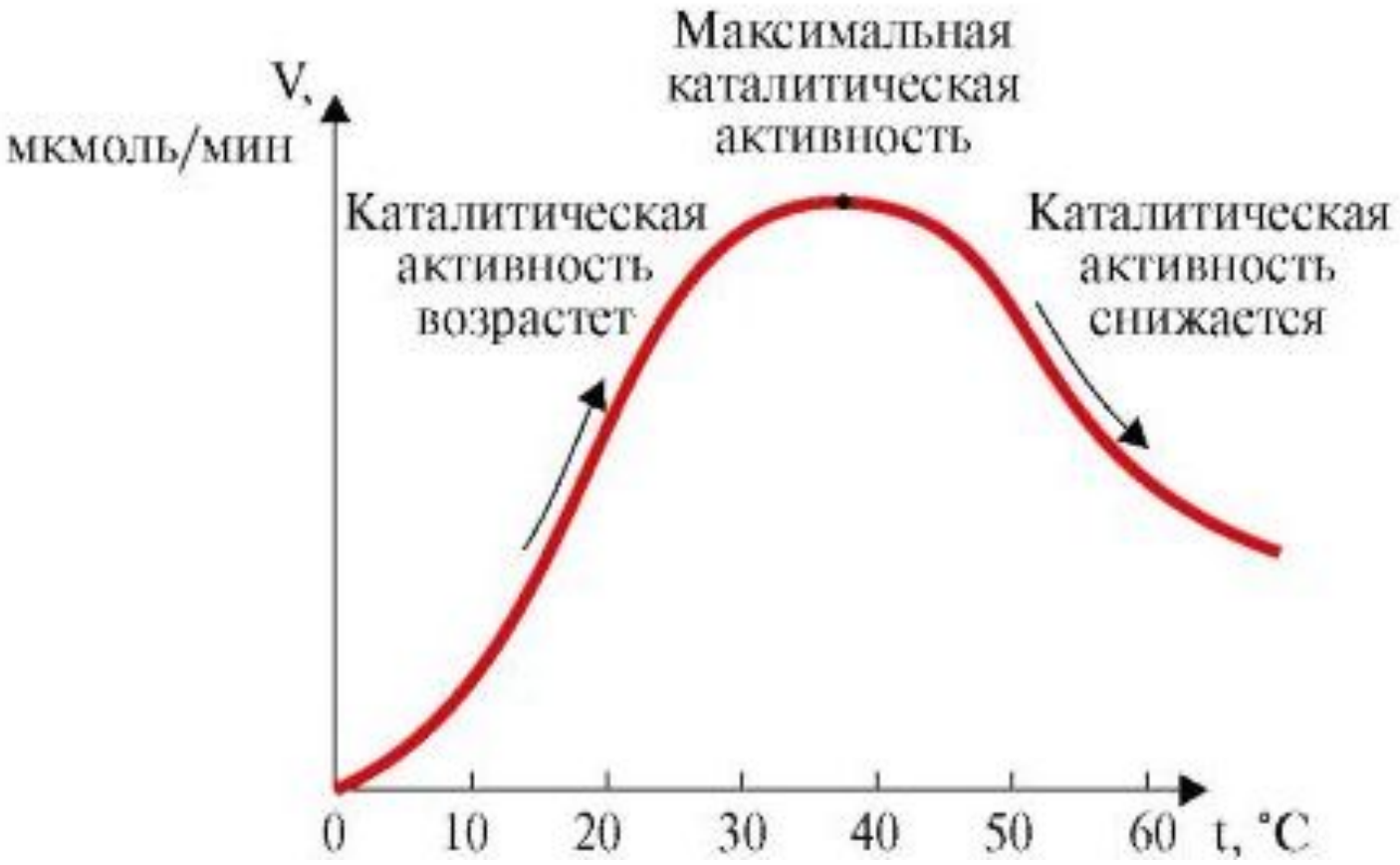
**II участок – с увеличением концентрации субстрата скорость реакции не изменяется, т.к. все активные центры заняты.**

**Недостаток графика Михаэлиса-Ментен при определении Km заключается в том, что Vmax достигается с трудом, реакции в клетке протекают с оптимальной скоростью, а не Vmax.**

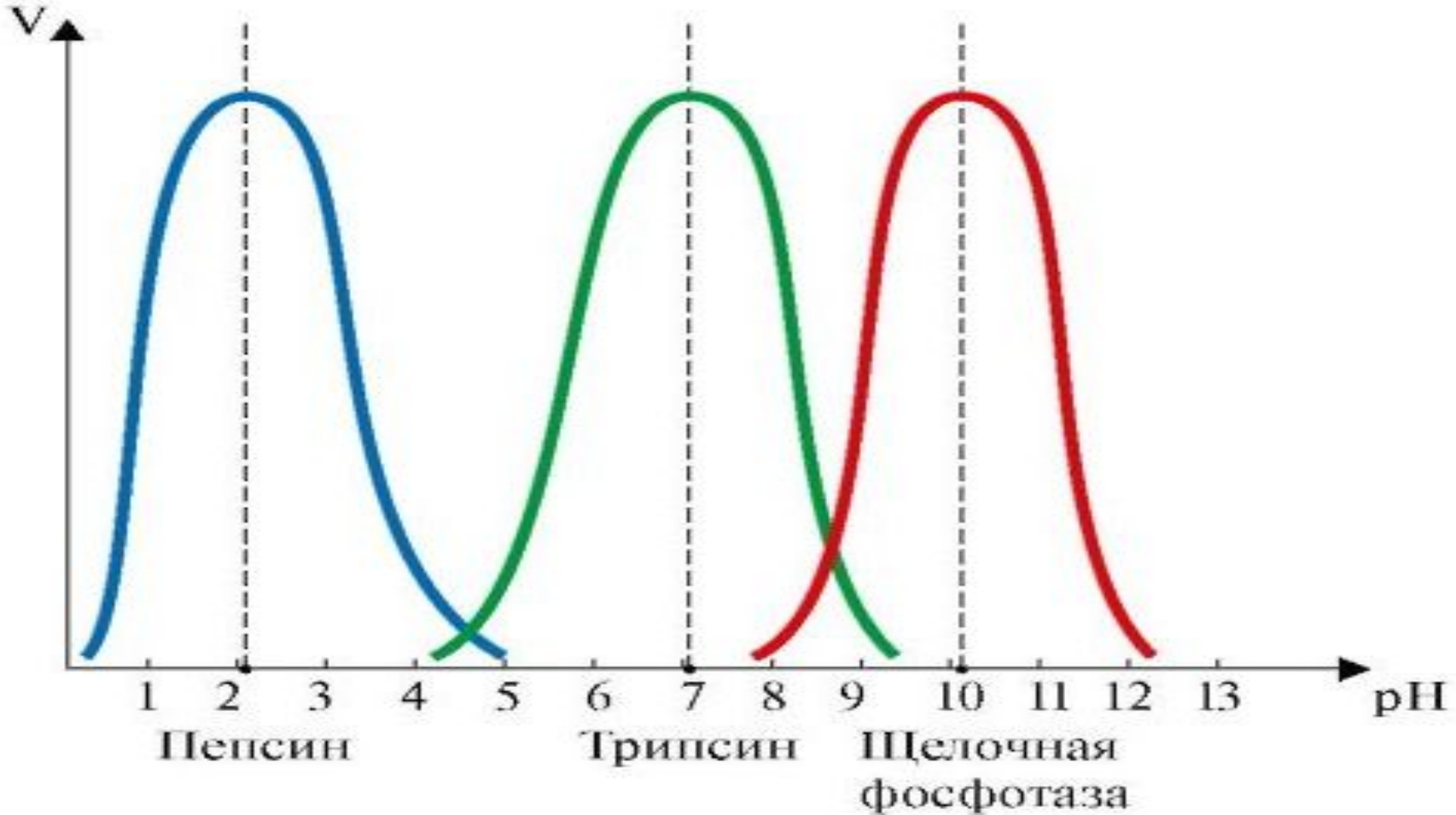
# Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

1. При t=36-38$^0$C ферменты обладают наибольшей активностью. Эта температура называется температурный оптимум:
2. С повышением t до оптимума активность ферментов повышается.
3. Высокие t вызывают денатурацию ферментов.
4. Низкие t снижают активность ферментов.
5. Изменение t0 приводит к нарушению связей, закрепляющих белковую структуру ферментов (третичную, четвертичную), т.е. вызывает денатурацию.

# Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от температуры



# Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от pH среды



| Фермент | Оптимальное значение pH |
|---|---|
| Пепсин | 1,5 – 2 |
| Пируваткарбоксилаза | 4,8 |
| Каталаза | 6,8 – 7 |
| Фумараза | 6,5 |
| Уреаза | 6,8 – 7,2 |
| Карбоксипептидаза | 7,5 |
| Трипсин | 6,5 – 7,5 |
| Аргиназа | 9,5 – 9,9 |

# Классификация и номенклатура ферментов

# НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Исторически многим ферментам присваивались тривиальные названия, часто не связанные с типом катализируемой реакции (пепсин - греч. pepsis - пищеварение).

Для преодоления возникших трудностей в 1961 г. на Международном конгрессе биохимиков были разработаны принципы классификации и номенклатуры ферментов:

- все ферменты в зависимости от типа катализируемой реакции делят на 6 классов;
- каждый класс делится на подклассы, в соответствии с природой функциональных групп субстратов, подвергающихся химический превращению;
- подклассы, в свою очередь, делятся на подподклассы в зависимости от типа участвующего в превращении фермента;
- каждому ферменту присваивается классификационный номер из 4 цифр, обозначающих класс, подкласс, подподкласс и номер самого фермента.

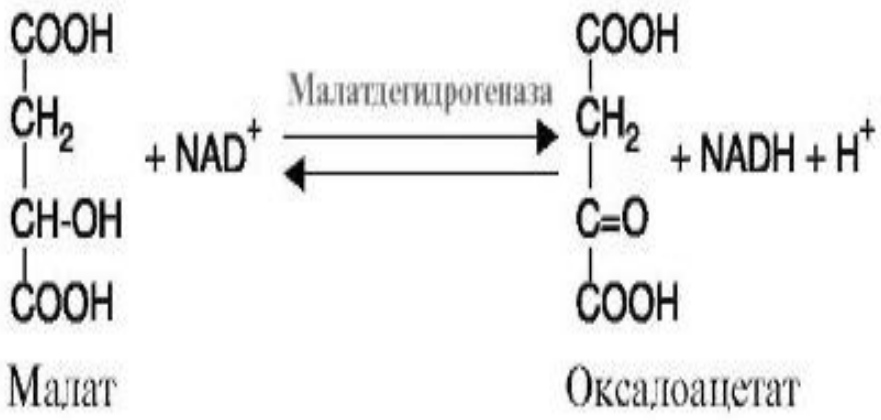
Например, α-химотрипсин имеет номер 3.4.21.1.

# Классификация ферментов

| Классы ферментов | Катализируемая реакция | Примеры ферментов или их групп |
|---|---|---|
| Оксидоредуктазы | Перенос атомов водорода или электронов от одного вещества к другому. | Дегидрогеназа, оксидаза |
| Трансферазы | Перенос определенной группы атомов -метильной, ацильной, фосфатной или аминогруппы-одного вещества к другому | Трансаминаза, киназа |
| Гидролазы | Реакции гидролиза | Липаза, амилаза, пептидаза |
| Лиазы | Негидролитическое присоединение к субстрату или отщепление от него группы атомов. При этом могут разрываться связи C-C, C-N, C-O или C-S | Декарбоксилаза, фумараза, альдолаза |
| Изомеразы | Внутримолекулярная перестройка | Изомераза, мутаза |
| Лигазы | Соединение двух молекул в результате образования новых связей, сопряженное с распадом АТФ | Синтетаза |

# 1. Оксидоредуктазы катализируют различные окислительно-восстановительные реакции. Класс делится на подклассы:

- **а) дегидрогеназы** **катализируют реакции дегидрирования (отщепления водорода с переносом электронов от дегидрируемого субстрата на другой акцептор). В качестве акцепторов электронов используются коферменты NAD+, NADP+, FAD, FMN. К этому подклассу относятся ферменты малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, α-кетобутиратдегидрогеназа и др.**

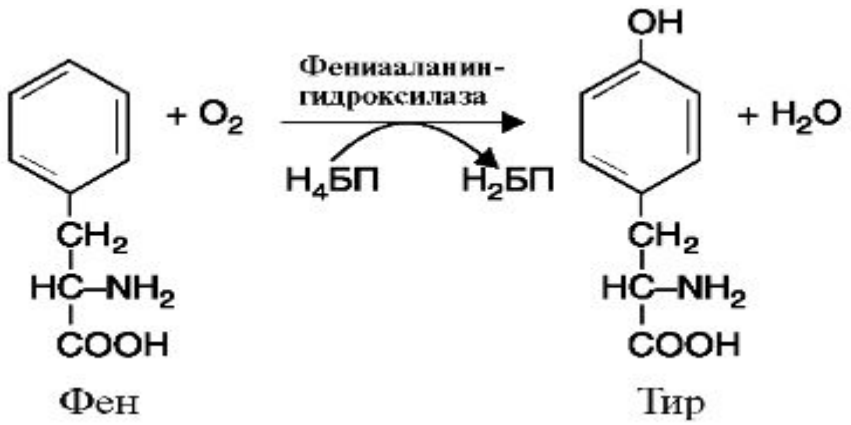


# 1. Оксидоредуктазы

- **б) оксидазы - катализируют реакции окисления с участием молекулярного кислорода**

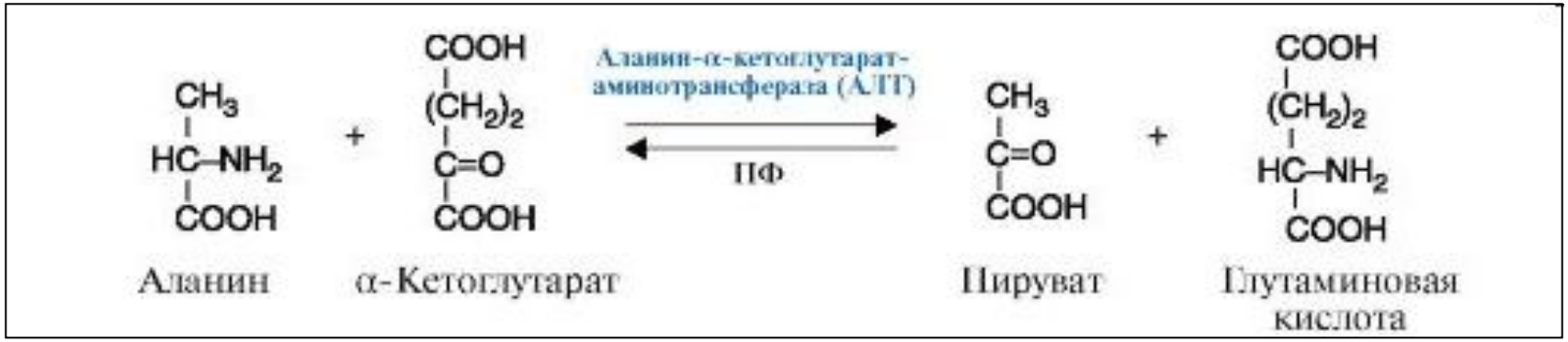
# 1. Оксидоредуктазы

- **в) оксигеназы (гидроксилазы)**
  **катализируют реакции окисления путем включения атома кислорода в гидроксильную группу молекулы субстрата. Реакция протекает с участием молекулярного кислорода, один атом которого присоединяется к субстрату, а второй участвует в образовании молекулы воды.**



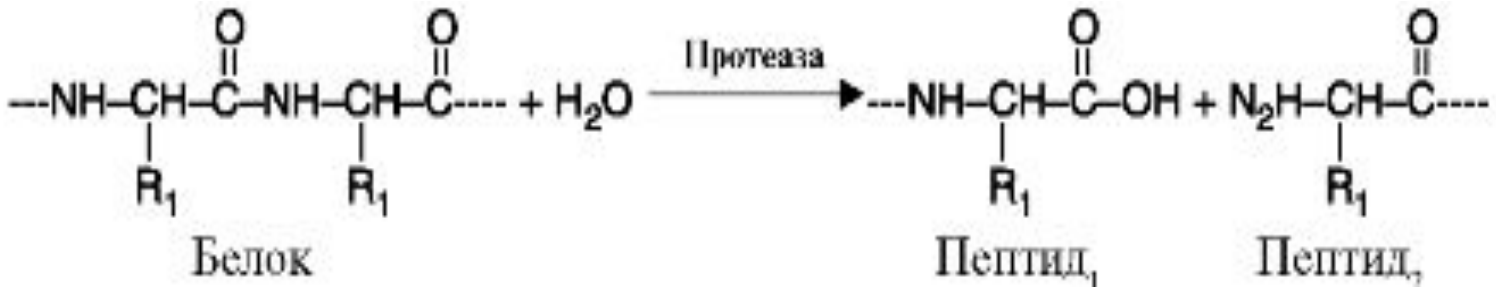
# 2. Трансферазы - катализируют реакции переноса функциональных групп.

- **В зависимости от переносимой группы подразделяются на подклассы: аминотрансферазы, ацилтрансферазы, метилтрансферазы, гликозилтрансферазы, киназы (фосфотрансферазы).**



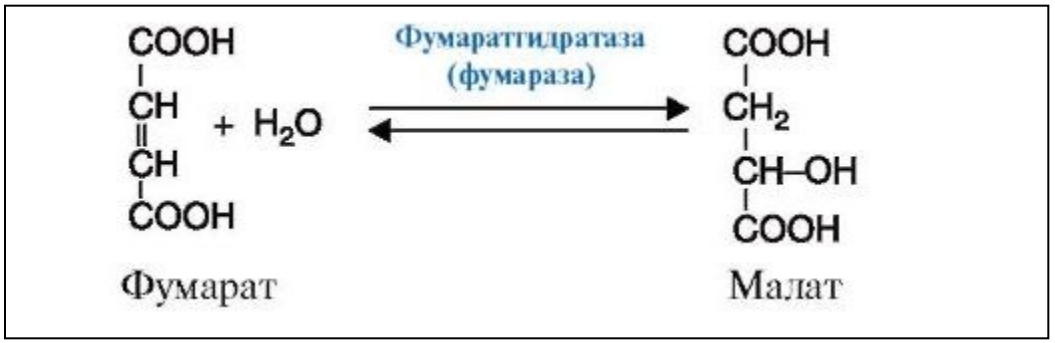
**3. Гидролазы катализируют реакции гидролиза (расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва).**

- **Разделяются на подклассы в зависимости от субстрата. Названия образуются в зависимости от молекулы субстрата или конкретной гидролизуемой химической связи: протеазы, амилазы, гликозидазы, нуклеазы, эстеразы, фосфатазы и др.**

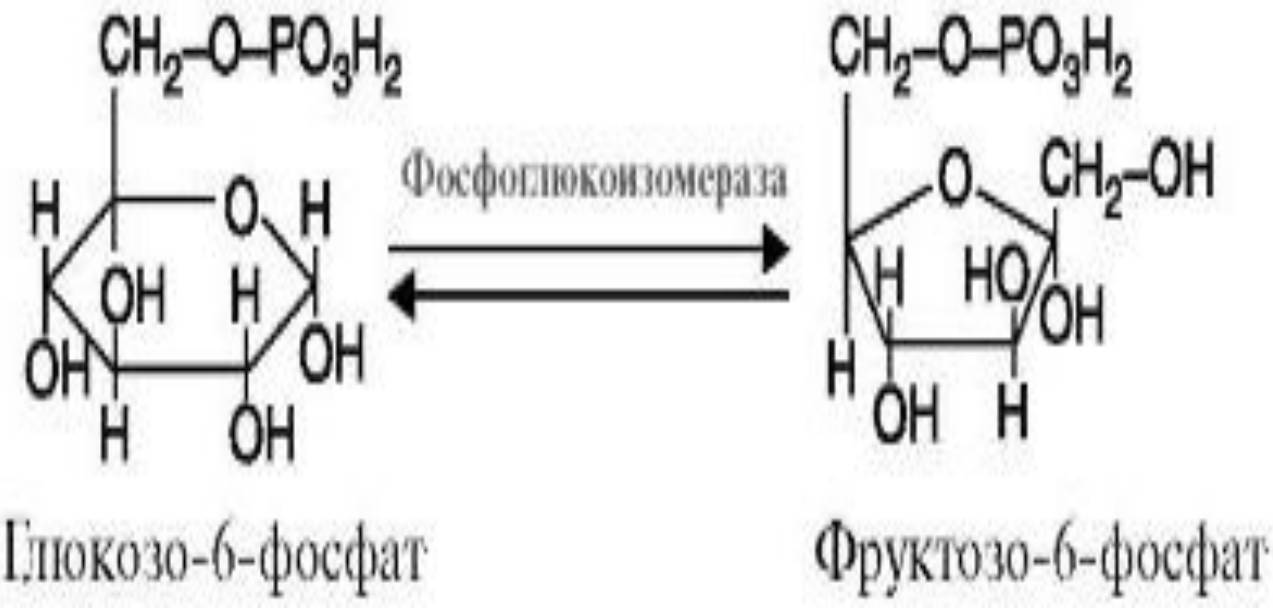


# 4. Лиазы

- **К лиазам относятся ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенные группы, такие, как $CO_2$, $H_2O$, $NH_2$ $SH_2$ и др., или присоединяющие (например, молекулу воды) по двойной связи. Реакция декарбоксилирования (отщепления молекулы $CO_2$) и реакция присоединения молекулы воды (гидратазная реакция).**



# 5. Изомеразы катализируют различные внутримолекулярные превращения



**6. Лигазы (синтетазы) катализируют реакции усложнения молекулы за счет присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи; при этом используется энергия АТФ или других макроэргических соединений**