

Лекция № 4

**Ферменты,
структура и механизм действия.
Классификация и номенклатура.**

1. Введение

- **Ферменты** – самый крупный и наиболее специализированный класс белковых молекул.
- **Ферменты** являются тем рабочим аппаратом, при помощи которого реализуется действие генов.
- Химические реакции в биологических системах редко протекают без биологических катализаторов – **ферментов**. (В клетке за 1 минуту происходит около *100 тыс.* хим. реакций)

ПРИМЕР:



2. Строение ферментов

- **Ферменты** – это специфические белки, выполняющие роль биокатализаторов.

История изучения:

- В 17 веке француз **Ван – Гельмонт** агенту, вызывающему превращения веществ в ходе брожения дал название “**fermentum**” – “бродило”.
- В 1835 г. шведский химик **Берцелиус** назвал явление ускорения реакции **КАТАЛИЗОМ**, а вещества, вызывающие это явление – **КАТАЛИЗАТОРАМИ**.
- В 1877 г. Кюне предложил термин «**ЭНЗИМ**». (“en zyme” – в дрожжах)
- В 1922 г. была установлена белковая природа ферментов.
- 1926 г. – получение Самнером фермента в кристаллическом виде (уреаза)
- 1930 – 1933 гг. – Нортон получил в кристаллическом виде ферменты ЖКТ – пепсин, трипсин, химотрипсин и была окончательно доказана белковая природа ферментов.

Общие свойства ферментов:

Ферменты, являясь белками, обладают теми же свойствами, что и белки.

1. Молекулярная масса. 12 000 – 1 млн. и более.

ФЕРМЕНТ	МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА
Рибонуклеаза	13 700 Да
Цитохром С	15 000
Трипсин	23 800
Пепсин	32 000
Гксокиназа	45 000
Щелочная фосфатаза	80 000
Лактатдегидрогеназа	140 000
Альдолаза	142 000
Каталаза	248 000
Глутаматдегидрогеназа	336 000
Уреаза	480 000
Пируватдегидрогеназный комплекс	4 500 000

2. Ферменты имеют первичную , 2 – , 3 - , 4 – ю структуры

- **РНКаза А** – 124 амк (расшифрована – 1955 г. [Мур и Стейн] , синтезирована в 1969 г.)
- **Аспаратаминотрасфераза** – 412 амк (расш.- 1971 [Овчинников], синт.- 1974.) После синтеза молекула самостоятельно приобрела конформацию нативного фермента.
- **Лизоцим** – 118 амк.

3. Высаливание, денатурация ферментов

4. pI , электрофоретическая подвижность

5. Не подвергаются диализу

Ферменты

Простые

Сложные
(Голоферменты)

Небелковая часть (Кофактор)

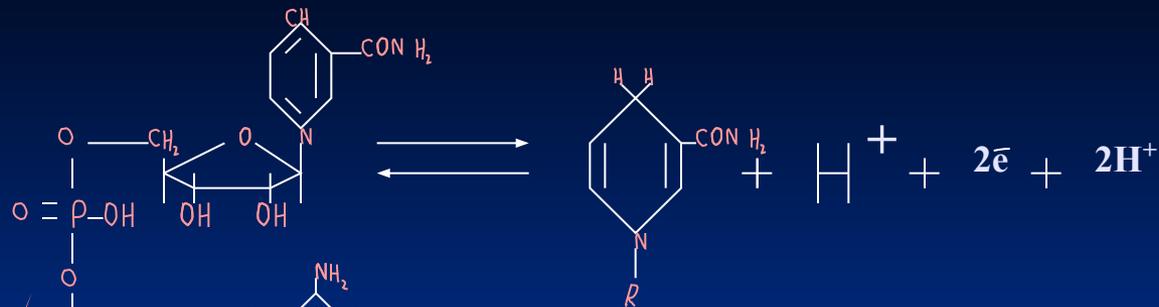
Белковая часть
(Апофермент)

Кофермент (диссоциир.)

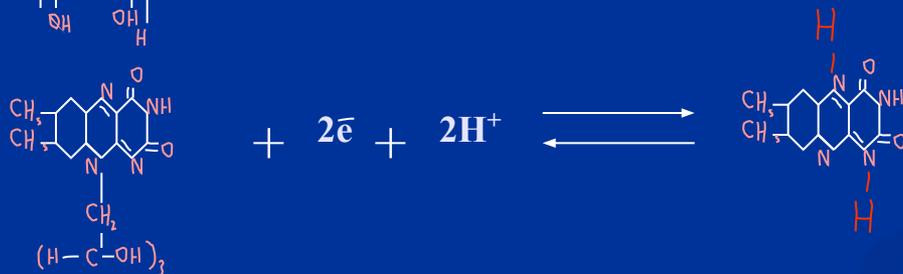
НАД, НАДФ, Me^{++}

Простетическая группа (прочно связ.)

Гем, ФМН



Никотинамиддинуклеотид (НАД⁺)



Флавинадениндинуклеотид (ФАДН₂)

Коферменты и витамины

Коферменты	Функция	Витамин
1. НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, коэнзим Q, ДГ	Перенос H ⁺	Вит. PP Вит. B ₂ (рибофлавин)
2. Липоевая кислота, Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование	Вит B ₂
3. Коэнзим А	Перенос ацильных групп	Пантотеновая к-та
4. ТГФК	- - одноуглеродных групп	фолиевая к-та
5. Пиридоксальфосфат, трансаминазы	- - аминогрупп	Вит. B ₆
6. Биотин, карбоксилазы	- - CO ₂	Биотин
7. Гем	- - электронов	-
8. Кобаламин	- - алкильных групп	Вит. B ₁₂

Ферменты, активируемые металлами

Фермент	Металл
Цитохромоксидаза	Fe
Каталаза, пероксидаза	Fe
Аскорбатоксидаза	Cu
Тирозиназа	Cu
Ксантиноксидаза	Mo
Некоторые пептидазы	Co
Амилаза, липаза	Ca
Карбоангидраза	Zn
Лактатдегидрогеназа	Zn
Карбоксипептидаза	Zn
Пируваткарбоксилаза	Mg
Фосфатазы	Mg
Фосфоглюкокиназа	Mg
Аргиназа	Mn
Холинэстераза	Mn

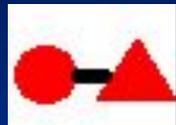


Механизм действия ферментов [по А. Кантарову, Б. Шепартцу]

Субстрат (S)

Апофермент

Кофермент



+



+



P 2

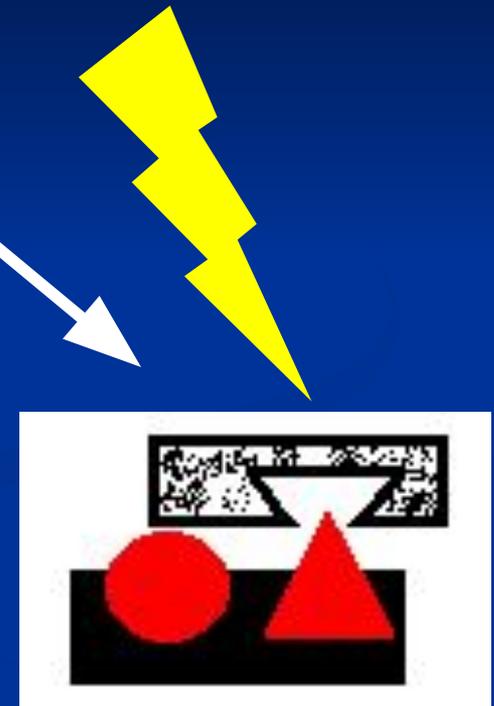


+



P 1

+



Активный комплекс

3. Функциональные участки молекулы фермента

Mr уреазы = 480 000, а мочевины – 60.

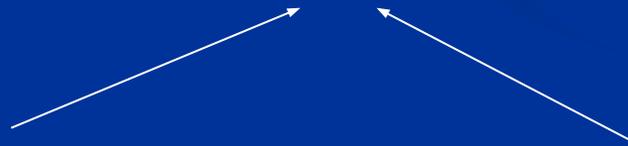


Фермент взаимодействует с субстратом лишь частью молекулы – **АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ**.

Активный центр – уникальная **комбинация** аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающая непосредственное взаимодействие его с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа.

Активный центр

Контактный участок
(якорная площадка,
связывающий центр)



**Каталитический
участок**

Активный центр формируется на 3 – й и 4 – й структуре молекулы фермента.

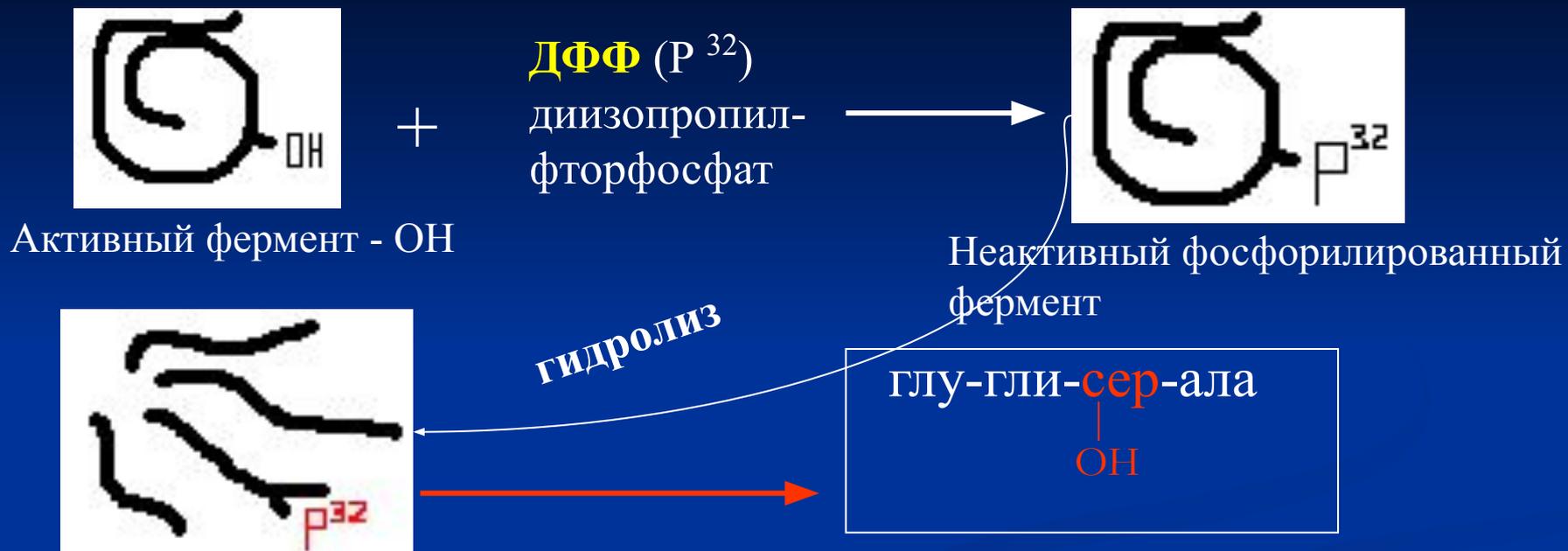
- У *простых* ферментов в образовании активного центра принимают участие следующие **R** аминокислот:
 - NH₂ – лиз, арг.
 - COOH - дикарбоновые к-ты.
 - NH - гист.
 - SH – цис.
 - OH – сер, тир.
- У *сложных*:
- + кофакторы**
- Активный центр фермента [схема по Малеру и Кордесу]:



Связывающий центр

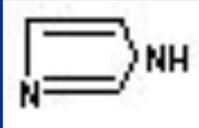
Каталитический центр

Установление активного центра фермента:



Аминокислоты активного центра фермента:

- Серин (- OH)

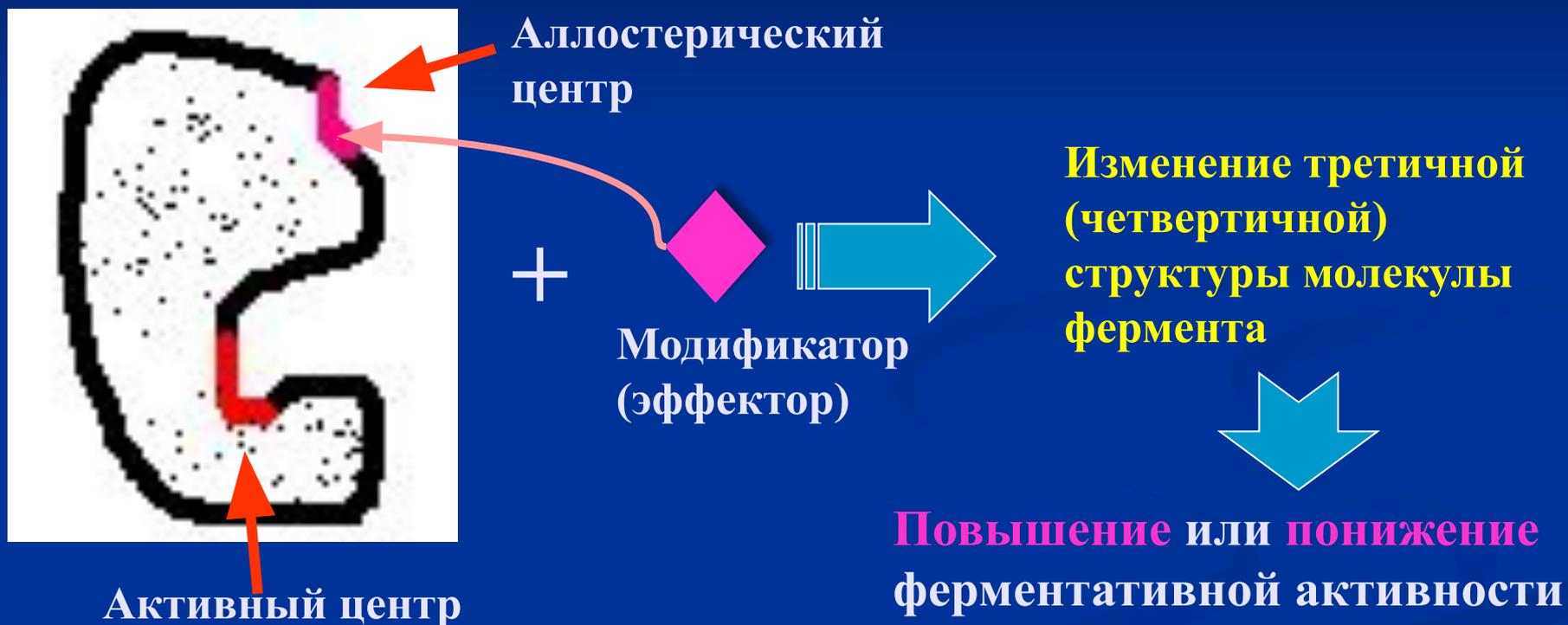
- Гистидин (- )

- Цистеин (- SH)

Аминокислотная последовательность в активном центре сериновых ферментов

Фермент	Последовательность
Химотрипсин	гли-асп-сер-гли-гли
Трипсин	гли-асп-сер-гли-про
Тромбин	асп-сер-гли
Эластаза	асп-сер-гли
Бутирилхолинэстераза	гли-глю-сер-ала
Ацетилхолинэстераза	глю-сер-ала
Щелочная фосфатаза (E .coli)	тре-асп-сер-ала-сер
Субтилизин (B. subtilis)	гли-тре-сер-мет-ала
Протеаза (Asp. orizae)	тре-сер-мет-ала
Фосфоглюкомутаза	тре-ала-сер-гис-асп
Алиэстераза печени	глю-сер-ала-гли
Фосфорилаза	гли-иле-сер-вал-арг

Аллостерический центр фермента (allos – другой, steros – пространственный) – участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные соединения - **эфффекторы (модификаторы)** , молекулы которых отличаются по строению от субстратов. (ввел понятие – Моно в 1963 г.)



Участки в молекуле фермента:

- 1) Активный центр и аллостерический центр.**
- 2) Участок химической модификации фермента**
- 3) Участок, обеспечивающий ориентацию фермента относительно субстрата**
- 4) Участки межмолекулярного взаимодействия**

Общие представления о катализе

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАРЬЕР РЕАКЦИИ – кол-во энергии, которое необходимо молекуле, чтобы вступить в химическую реакцию.

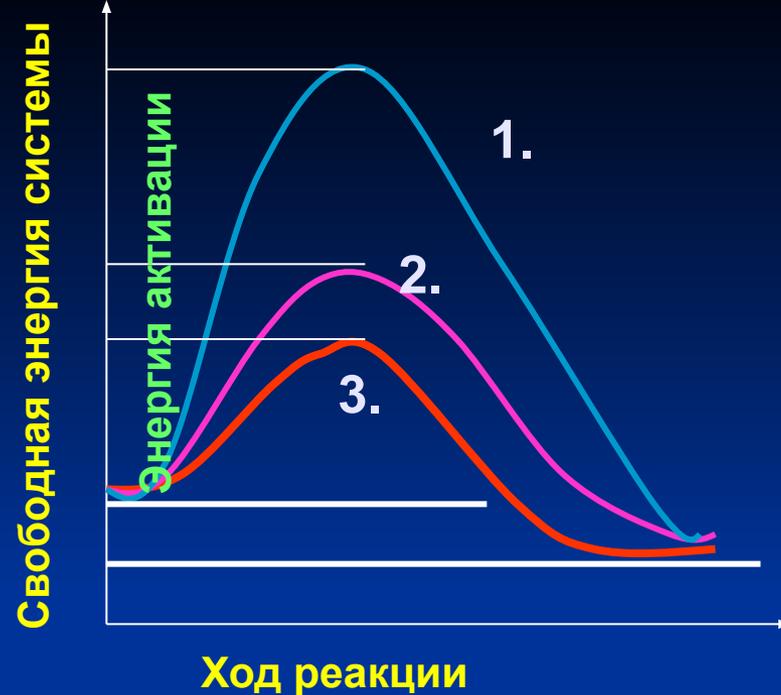
ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ – кол-во энергии, которое необходимо сообщить молекуле для преодоления ЭБР.



Примеры:



Каталаза



Энергия активации:

1. В спонтанной реакции – 18 ккал/моль
 2. При использовании химического катализатора – 12 ккал/моль
 3. В присутствии фермента – 5 ккал/моль
- 2) Гидролиз белков в желудке – 20 ккал/ моль, а в присутствии пепсина – 12 ккал/моль

Таким образом, роль ферментов заключается в снижении энергии активации.

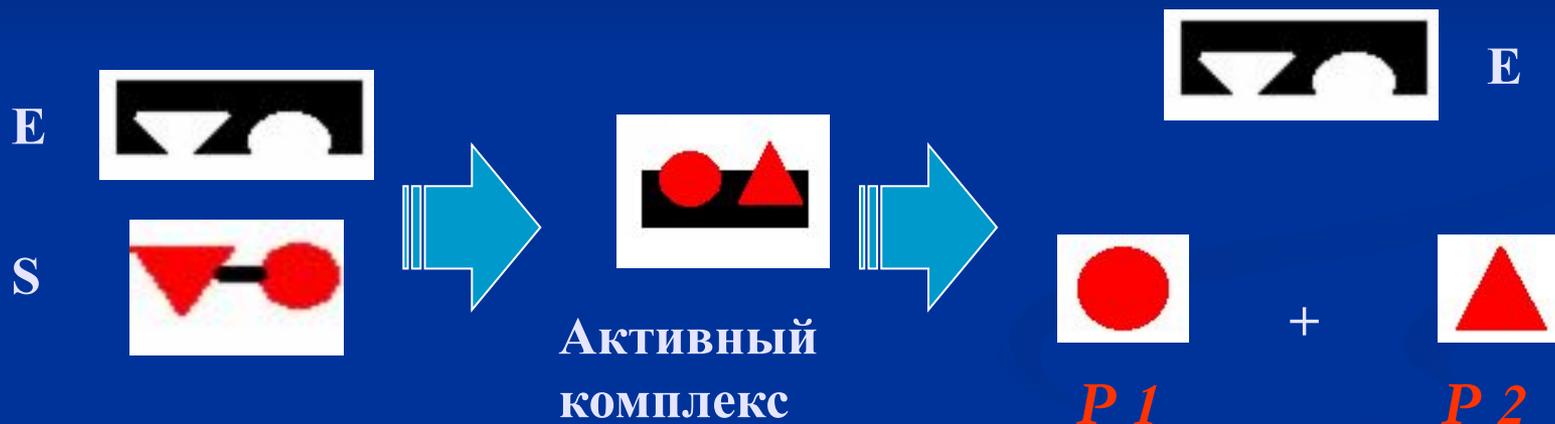
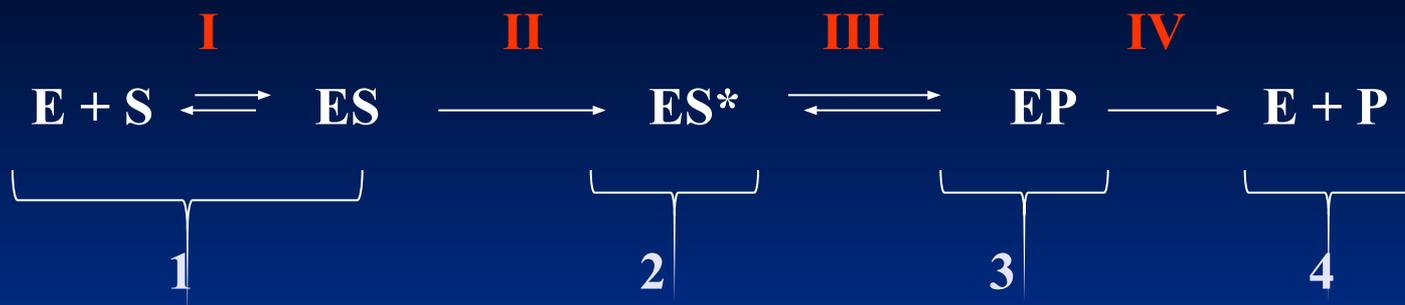
Общие черты ферментов и неорганических катализаторов

- Ферменты не изменяются во время химической реакции
- Ферменты катализируют как прямую, так и обратную реакцию
- Действуют в ничтожно малых концентрациях
- Активность зависит от температуры
- Не влияют на величину K равновесия
- Не изменяют свободную энергию (ΔG)

Различия ферментов и неорганических катализаторов

- Значительно большая активность ($<$ в $10^{10} - 10^{23}$ раз)
- Строгая специфичность
- 100 % выход конечных продуктов
- Работа в «мягких» условиях ($T=37^0$, $pH = 7,4$)
- Активность регулируема
- Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента
- Кооперативность действия
- Термолабильность , т.к. являются белками

Механизм действия ферментов

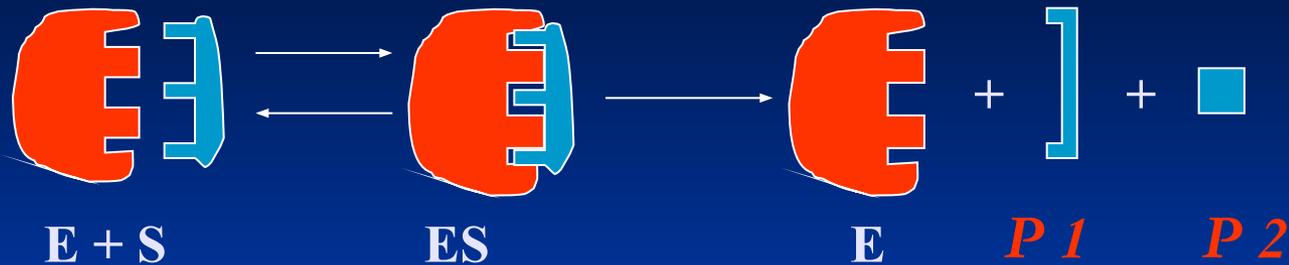


Четыре стадии ферментативного катализа:

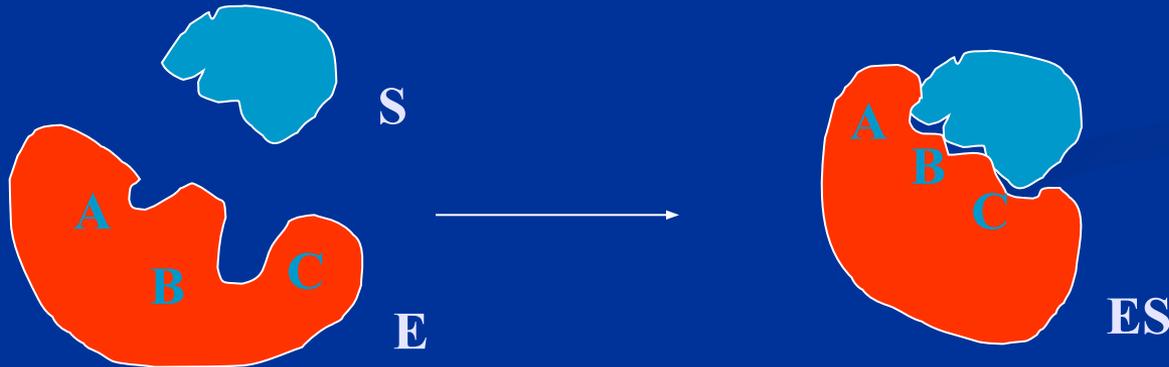
- 1 – Связывание субстрата с ферментом – образование **фермент – субстратного** комплекса.
- 2 – Активация **фермент – субстратного** комплекса
- 3 – Образование продуктов реакции
- 4 – Отделение продуктов реакции от **фермент – субстратного** комплекса

Взаимодействие субстрата с ферментом.

1. Модель «ключ – замок»

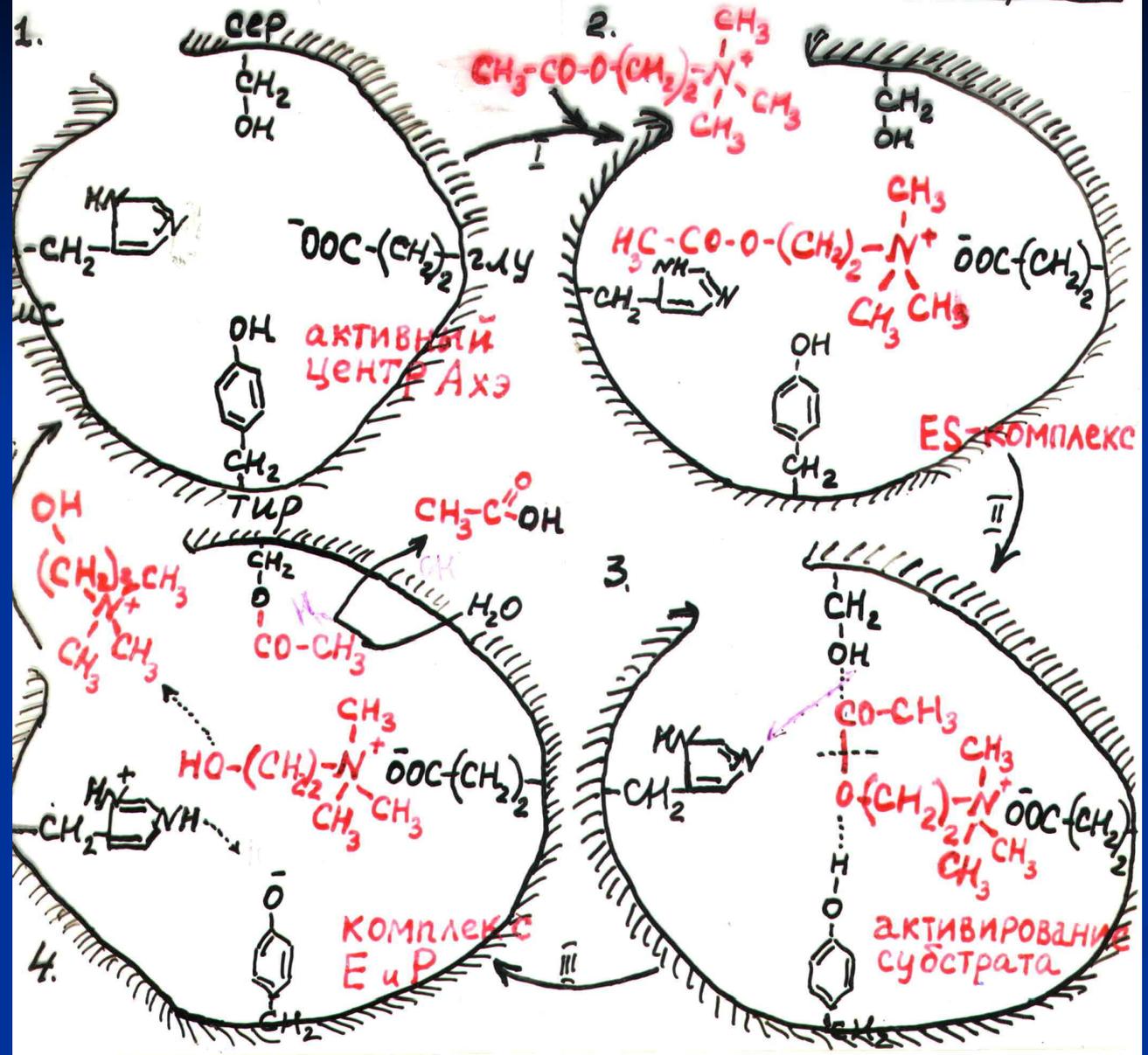


2. Модель индуцированного соответствия



Активный центр фермента только после присоединения субстрата становится комплиментарным ему по форме.

Механизм действия ацетилхолинэстеразы



Молекулярный механизм действия ферментов

1. **СБЛИЖЕНИЕ И ОРИЕНТАЦИЯ** – активный центр фермента связывается с субстратом
2. **НАПРЯЖЕНИЕ И ДЕФОРМАЦИЯ СУБСТРАТА** - «эффект дыбы», растягивание субстрата, индукция соответствия S и E.
3. **КИСЛОТНО – ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ** – присутствие в активном центре фермента COOH – групп и NH – гр., способных присоединять и отдавать протоны.
4. **КОВАЛЕНТНЫЙ КАТАЛИЗ** – образование ковалентной связи между ферментом и субстратом.

Таким образом, в механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные фермент – субстратные комплексы.

Классификация ферментов

(V Международный Биохимический конгресс в Москве)

1. **ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ:**

А) дегидрогеназы

-аэробные

-анаэробные

Б) цитохромы

2. **ТРАНСФЕРАЗЫ:** метил-, формил-, ацетил-, амино-, фосфо-.

3. **ГИДРОЛАЗЫ:** эстеразы, гликозидазы, фосфатазы, пептидгидролазы, амилазы.

4. **ЛИАЗЫ:**

-карбокси – лиазы

- амидин – лиазы

5. **ИЗОМЕРАЗЫ:**

А) рацемазы

Б) эпимеразы

В) внутримолекулярные оксидоредуктазы и трансферазы

6. **ЛИГАЗЫ** (синтетазы)

Номенклатура ферментов

Шифр	Рекомендуемое (рабочее) название	Реакция	Систематическое
КФ 1.1.1.27.	Лактатдегидрогеназа	$L - \text{лактат} + \text{НАД}^+ =$ $= \text{пируват} + \text{НАДН}_2$	L-лактат: НАД ⁺ - оксидоредуктаза
КФ 2.6.1.5	Тирозинаминотрансфераза	L-тирозин + 2 – оксо- глутарат = 4 – оксифе- нилпируват + L - глутамат	L – тирозин: 2 – оксо- глутарат аминотрансфераза

Спасибо за внимание