

# Классы ферментов

- ▶ **Классы** делятся на **подклассы** , а подклассы - на **подподклассы**.
- ▶ Название фермента : название субстрата (или субстратов) и название класса или подкласса.
- ▶ **1 класс. Оксидо-редуктазы** - катализируют окислительно-восстановительные реакции (ОВР).
- ▶ **Окисление** может идти путем **отнятия водорода** - ферменты (подклассы):
  - ▶ Дегидрогеназы
  - ▶ Оксидазы
  - ▶ Десатуразы
  - ▶ или путем **присоединения кислорода**
  - ▶ Оксигеназы - монооксигеназы или диоксигеназы
- ▶ **Восстановление** идет путем присоединения водорода -
- ▶ Ферменты **редуктазы**

▶ 2 класс. **Трансферазы**

▶ Катализируют реакции переноса группировок от одного вещества к другому:



▶ Подкласс - **киназы** - катализируют перенос Ф (фосфата) от АТФ на субстрат или от субстрата на АДФ:

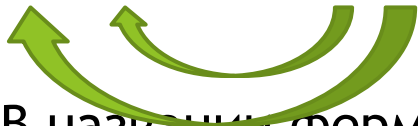
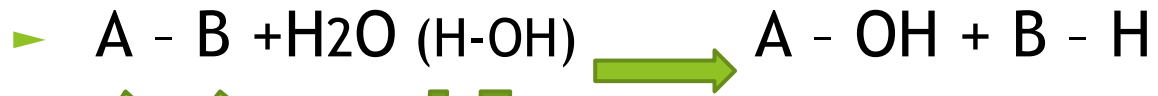


▶  $\left. \begin{array}{l} \text{Е - гексокиназа} \\ \text{глюкокиназа} \end{array} \right\} \text{изоферменты} - \text{проявляют активность при}$   
▶  $\text{разных концентрациях субстрата и}$   
▶  $\text{работают с разной скоростью - дополняют}$   
▶  $\text{друг друга}$

▶ Гексокиназа активна при низких концентрациях глюкозы, но работает с низкой скоростью. Глюкокиназа активируется при повышении концентрации глюкозы, имеет высокую скорость - таким образом поддерживается регулируется концентрация глюкозы и поддерживается на определенном уровне .

▶ 3 класс. **Гидролазы**

▶ Катализируют реакции распада более сложных веществ до более простых с присоединением воды к образовавшимся продуктам:



▶ В названии фермента не указывается полностью название класса - гидролаза, в названии субстрата **-оза** изменяется на **-аза**. Или добавляется **-аза**.

▶ Например, субстрат - сахар**оза**, фермент - сахар**аза**

▶ Сахароза + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  глюкоза + фруктоза

▶ E - сахараза

▶ Протеин + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  пептиды

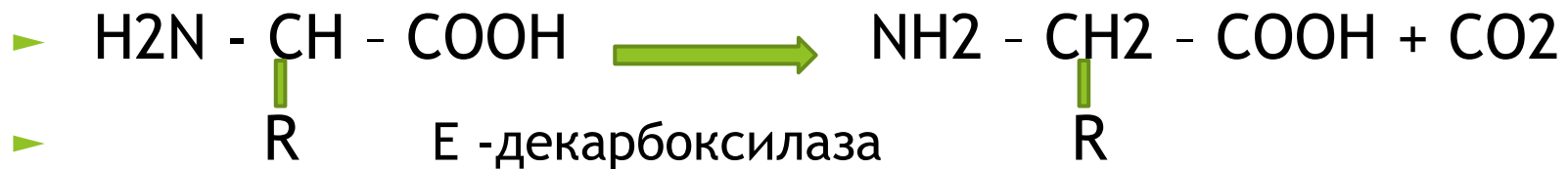
▶ E - протеиназа

▶

- ▶ 4 класс **Лиазы** - катализируют реакции негидролитического (без участия  $H_2O$ ) распада молекул:



- ▶ Подклассы: декарбоксилазы (отнимают  $CO_2$ ), енолазы (отнимают или присоединяют  $H_2O$ )



- ▶ E - декарбоксилаза

- ▶ аминокислота

- ▶ амин

- ▶ I

- ▶ - C - H



- ▶ - C -

- ▶ I



- ▶ II +  $H_2O$

- ▶ - C - OH

- ▶ - C -

- ▶ I E - енолаза

- ▶ 5 класс. **Изомеразы**

- ▶ Катализируют изомерные превращения

- ▶ Например:



- ▶ **Е- гексозофосфатизомераза**

- ▶ 6 класс. **Лигаза (синтетаза)**

- ▶ Катализируют реакции синтеза более сложных веществ из более простых с затратой энергии

- ▶ Например:



- ▶ **Е - глутаминсинтетаза**

- ▶ В названии фермента - название **продукта** + название класса

# Кинетика и регуляция ферментативного катализа

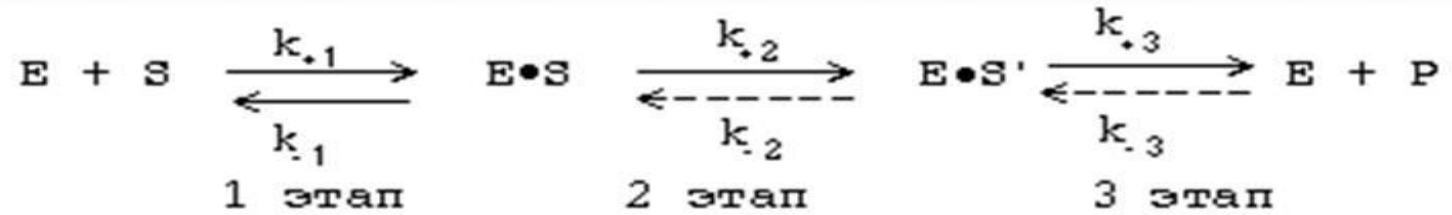
Скорость химической реакции пропорциональна концентрации реагирующих веществ (закон действующих масс), то есть зависит и от концентрации фермента и от концентрации субстрата

$$V = k [E] [S]$$

## КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

- Изучает зависимость скорости ( $v$ ) ферментативной реакции от
  - а) концентрации фермента,
  - б) концентрации субстрата,
  - в) физических и химических условий среды.
- $V = V_1$  (в присутствии E) –  $V_2$  (без E)

# Стадии ферментативного катализа





- ▶ **1 этап.** Происходит ориентированная **сорбция** субстрата на **адсорбционном центре** фермента. Образуется **фермент-субстратный комплекс**.
- ▶ Этап **самый быстрый и обратимый**.
- ▶ Связи между E и S нековалентные, химических превращений не происходит. Происходит изменение конформации фермента. Может происходить десорбция субстрата.
- ▶ Скорость этапа зависит от **сродства** между **E и S** ( чем больше сродство, тем быстрее идет процесс)
- ▶ Скорость 1 этапа характеризуется константой диссоциации фермент-субстратного -комплекса (**ES-комплекса**) -  **$K_S$**  (субстратная константа)

- ▶  **$K_S$**  - это константа равновесия между реакцией распада и реакцией образования ES - комплекса

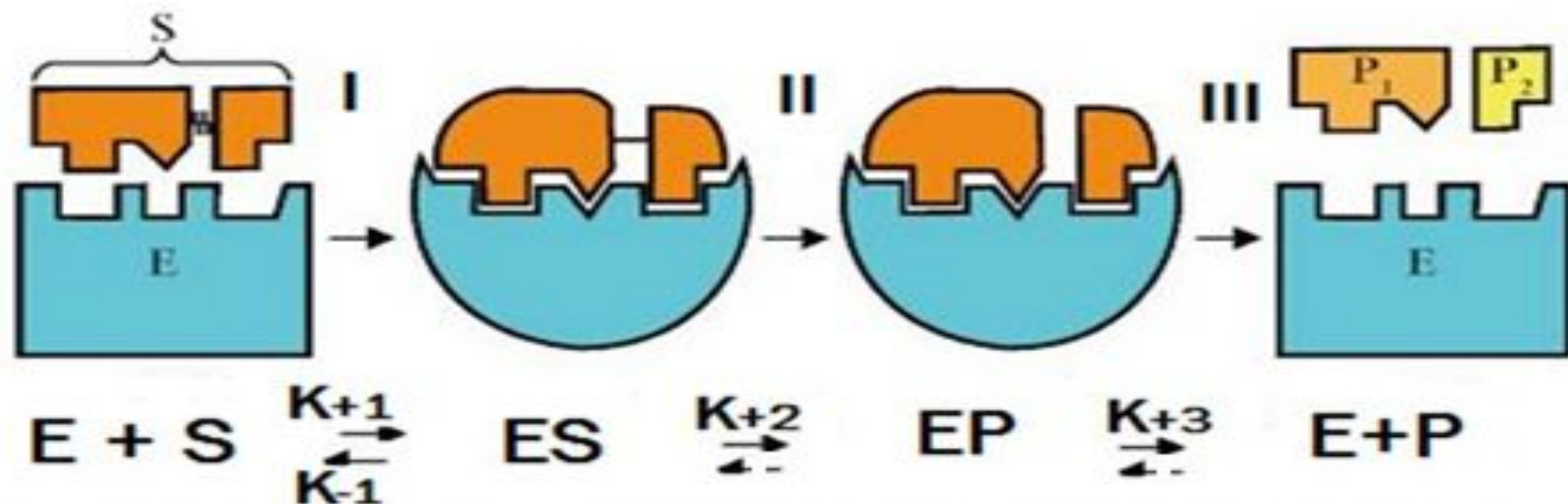
$$K_S = k_{-1} / k_{+1}$$

- ▶ (V пр.р-ции =  $k_{+1} [E] \times [S]$ )
- ▶ (Вобр.р-ции =  $k_{-1} [ES]$ )

- ▶ Чем быстрее идет сорбция ( чем больше V пр.р-ции и  $k_{+1}$  ) , тем меньше  **$K_S$** .
- ▶  **$K_S$**  характеризует сродство между E и S, чем меньше  **$K_S$** , тем больше сродство между E и S.

- ▶ 2 этап.
- ▶ Происходят химические превращения субстрата на каталитическом центре фермента. Образуется почти готовый продукт, но он еще связан с ферментом.
- ▶ Этап **самый длительный** и необратимый для необратимых реакций.
- ▶  $V = k_2 [ES]$
- ▶ 3 этап.
- ▶ Десорбция продукта, освобождение фермента

## Этапы ферментативного катализа



I этап - обратимая наведенная сорбция  $S$  на адс. центре  $E$ . (т. Кошланда "рука и перчатка")

II этап - ковалентное преобразование  $S$  на катал. центре  $E$ .  $K_{+2}$  имеет самое наименьшее значение, поэтому второй этап явл-ся лимитирующим

III этап - десорбция продукта с адс. центра  $E$

Для необратимых реакций II и III этапы всегда необратимы, для обратимых реакций всегда обратимы

# Механизм катализа

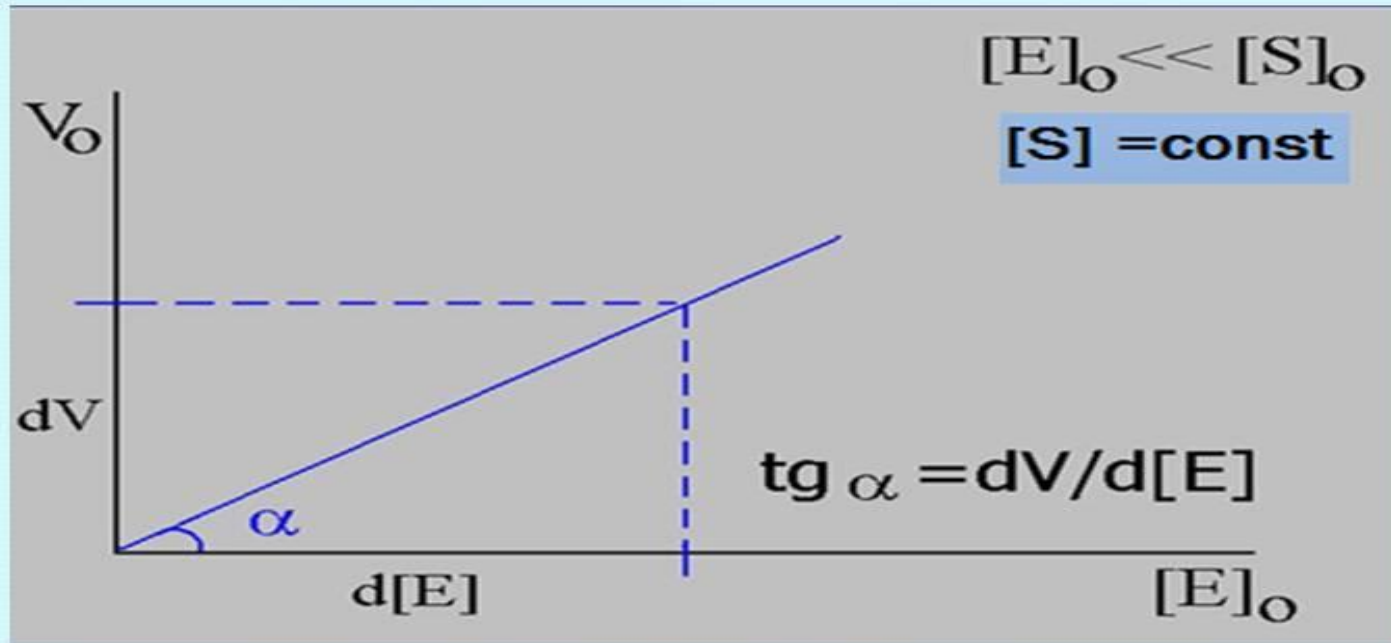
- Адсорбционный центр построен из гидрофобных аминокислот и остатка Асп.
- **ЕН** (трипсин) + **S** (белок) = **ЕН:::S** (фермент-субстратный комплекс)
- Каталитический центр содержит боковые цепи **Сер**, Гис, Глу.
- ОН-группа серина «атакует» пептидную связь.
- **ЕН** +  $\text{NH}_2\text{-----CO-NH-----COOH}$
- Выделяется С-концевой пептид, а фермент ковалентно присоединяется к группе  $\text{C=O}$
- $\text{NH}_2\text{-----CO- E} + \text{NH}_2\text{-----COOH}$
- Фермент гидролитически отщепляется от N-концевого пептида.





## Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

$$V_0 = k_{+2} [ES] = k_{+2} [E_0]$$



Скорость 2 этапа зависит от концентрации фермент-субстратного (ES) комплекса. Если концентрация S много больше концентрации E, то количество молекул ES будет зависеть только от количества молекул фермента. И зависимость V от E будет прямо пропорциональной.

# **Измерение скорости ферментативной реакции**

- **Берется источник фермента** (раствор фермента, плазма крови, моча, слюна, гомогенат ткани и др.) **Параллельно делается контрольная проба** (без фермента).
- **Добавляется субстрат**
- **Создаются оптимальные условия** (буферный раствор с  $pH = pH_{opt}$ , стандартная  $t$ )
- **Эта смесь инкубируется в термостате в течение определенного времени.**
- **Ферментативная реакция останавливается** (использование денатурирующих факторов)
- **Определяется концентрация субстрата или продукта в опытной и контрольной пробах** (титрование, фотометрия)

# Скорость реакции ( $v$ )

- Уменьшение количества  $S$  в единицу времени –  $dS/t$ .
- Увеличение количества  $P$  в единицу времени –  $dP/t$ .
- Единицы скорости: моль/сек (катал), мкмоль/мин (U – unit), ммоль/час и др.
- Условия измерения:  $pH_{\text{оптимум}}$ , стандартная температура (25, 30 или  $37^{\circ}\text{C}$ )



# АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА

- Активность фермента ( $A$ ) равна скорости ферментативной реакции ( $V$ ) в расчете на единицу массы фермента или единицу объема (массы) биологической пробы.
- Молекулярная активность – число молекул субстрата, которое превращается одной молекулой фермента за 1 минуту
- Удельная активность – количество субстрата, превращенное за единицу времени, в пересчете на единицу массы белка



## **Единицы измерения количества фермента или скорости реакции**

- **Катал** - это такое количество фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 секунду
- Чаще используется **Юнит** - это такое количество фермента, которое превращает 1 микромоль субстрата за 1 минуту

# Способы выражения активности ферментов

- В системе СИ единица измерения активности (количества) фермента:  $1 \text{ Катал} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1}$   
1 катал – это такое количество фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 секунду ( $=6 \cdot 10^7$  Юнит).
- На практике чаще применяют единицу, называемую Юнит:  $1 \text{ Юнит} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$   
1 Юнит – это такое количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту
- При биохимическом анализе в клинике результаты определения активности ферментов обычно выражают количеством юнит в единице объема исследованного материала (кровь, моча и т.п.)



▶ **Задача:** Определить удельную активность фермента, указать, сколько юнит содержится в 1 мкг белка - фермента, если при инкубации 5 мкг фермента с субстратом происходит превращение 120 мкмоль субстрата за 30 мин. Определить молекулярную активность фермента, если его молекулярная масса составляет 50 кД (50 000 Д).

▶ **Дано:**  $\Delta S = 120$  мкмоль,  $\Delta t = 30$  мин,  $m E = 5$  мкг,  $M E = 50$  кД

▶ Найти :  $A = ?$  (Активность E),  $A_m = ?$  (Молекулярную активность)

▶ **Решение:**  $V = \Delta S / \Delta t = 120 : 30 = 4$  мкмоль / мин

▶  $A = V / m E = 4 : 5 = 0,8$  мкмоль / мин x мкг

▶ Такая активность фермента означает, что 1 мкг фермента катализирует превращение 0,8 мкмоль субстрата за 1 минуту. Или - в 1 мкг фермента содержится 0,8 юнита

▶ Молекулярная активность: это количество молекул субстрата, превращенное 1 молекулой фермента за 1 минуту

▶ **Рассчитать  $A_m$  можно так:**  $A_m =$  количество молекул субстрата / количество молекул субстрата (или: количество мкмоль S / количество мкмоль E).

▶ А количество молекул фермента =  $m E / M E$

▶ **В задаче :** В 1 мкг E содержится 1/50 000 мкмоль E и это количество мкмоль E превращает 0,8 мкмоль S за 1 мин. следовательно  $A_m = 0,8 : 1 / 50000 = 40000$ .

▶ Это означает, что 1 молекула фермента превращает в минуту 40 000 молекул субстрата.

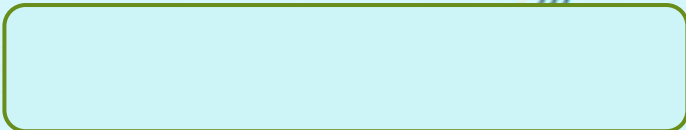
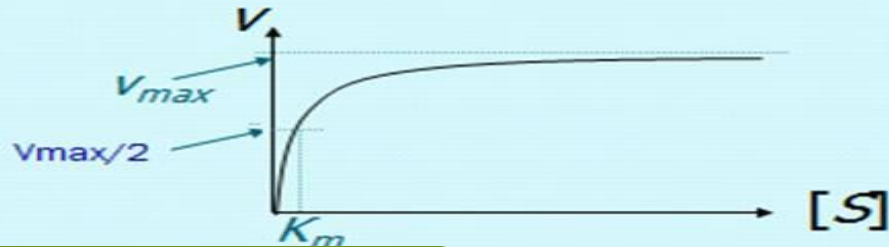
▶ Ответ: активность фермента 0,8 мкмоль/мин x мкг или 0,8 юнит, а молекулярная активность 40 000.

## Зависимость V от S (при E = const) - описывается уравнением Михаэлиса - Ментен

При низких концентрациях **S** - скорость **V** будет повышаться при увеличении концентрации субстрата, т.к. будет увеличиваться количество молекул **ES - комплекса**. При полном насыщении фермента субстратом (когда все молекулы фермента связаны с субстратом - т.е. находятся в составе **ES комплекса**) достигается максимально возможная скорость **V<sub>max</sub>**. Она будет сохраняться и при дальнейшей увеличении концентрации субстрата. **V<sub>max</sub>** является относительной константой, т.к. зависит от концентрации фермента

Графическое представление уравнения ММ

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \text{ можно изобразить так}$$



# Уравнение Михаэлиса-Ментен

- При избытке субстрата  $V=V_{\max}$ . Все активные центры фермента насыщены субстратом. Кинетическая константа  $V_{\max}$  характеризует «работоспособность» каталитического центра. Константа Михаэлиса ( $K_M$ ) – величина, характеризующая сродство фермента к субстрату. Маленькое значение  $K_M$  характеризует высокое сродство фермента к субстрату

$$K_M = k_{-1} + k_{+2} / k_{+1} = k_{-1} / k_{+1}$$

$K_M$  - константа равновесия между реакцией образования фермент-субстратного комплекса (она характеризуется  $k_{+1}$ ) и реакциями его распада ( $k_{-1}$  и  $k_{+2}$ ). Но  $k_{+2}$  много меньше  $k_{+1}$  и  $k_{-1}$ , поэтому  $K_M = K_S$  и характеризует сродство между ферментом и субстратом. Численно  $K_M$  равна той концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.

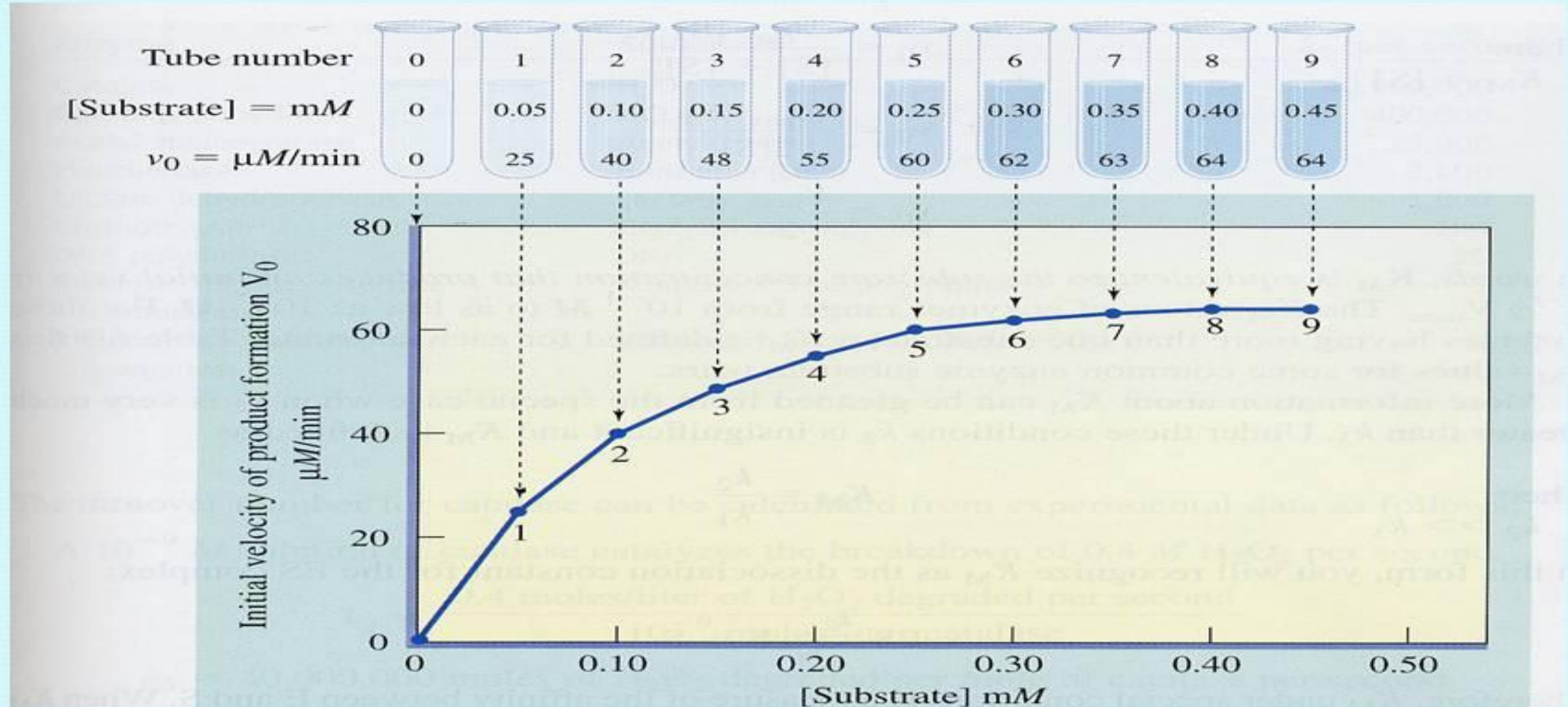


# Леонор Михаэлис Мауде Леонора Ментен



Берлин, 1912 г.

Исследование зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата,  $[E]=\text{const}$ ,  $[S]\gg[E]$





# Уравнение Михаэлиса-Ментен

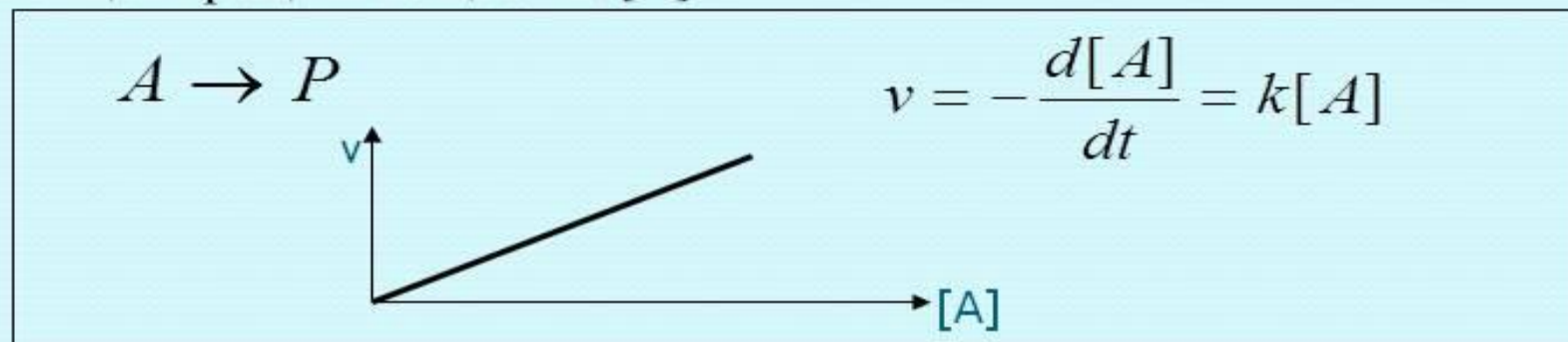
*В чем его смысл? — Позволяет получить формальные характеристики скорости ферментативной реакции*

- Уравнение Михаэлиса-Ментен описывает зависимость скорости реакции от концентрации субстрата и, в частности, демонстрирует явление насыщения.
- Условия, при которых работает уравнение Михаэлиса-Ментен:
  - 1) Стационарная фаза реакции, т.е.  $[ES]=\text{const}$ ,  $d[ES]/dt=0$ ;
  - 2) Измеряется начальная скорость;  $[S] \approx [S_0]$

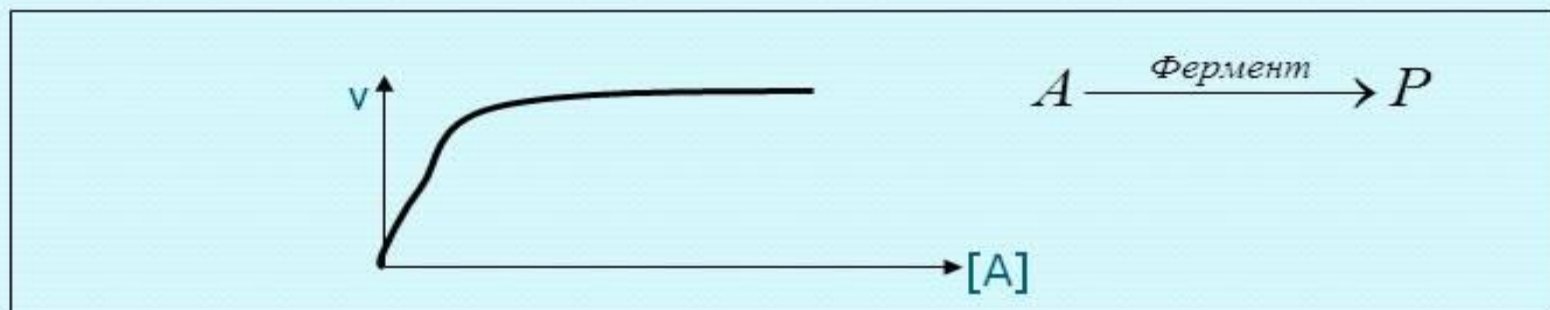


## Формальная ферментативная кинетика

- Скорость мономолекулярной реакции прямо пропорциональна концентрации вещества [A]



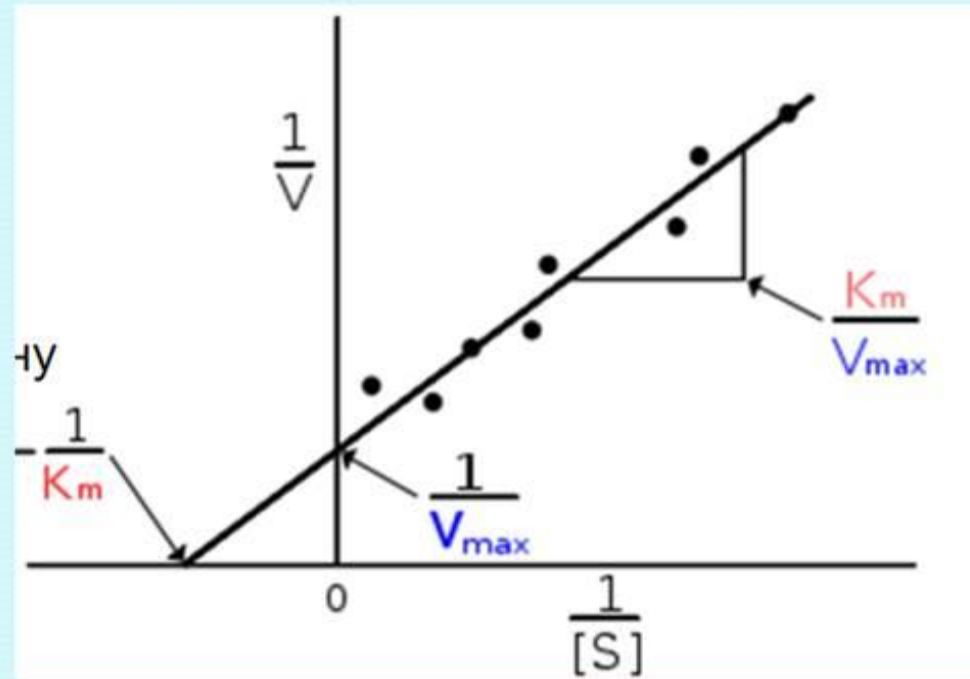
- Если ту же реакцию катализирует фермент, при определенной концентрации наблюдается **насыщение**.



## Метод двойных обратных величин

**Лайнуивера-Берка** - если две величины равны между собой, то равны и обратные им величины.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ**

- Поиск оптимального субстрата (самая низкая  $K_M$ ).
- Обнаружение типа ингибирования фермента (конкурентный или неконкурентный).
- Идентификация изофермента.
- Поиск лимитирующего фермента в цепи ферментных реакций (минимальная  $V_{\text{макс.}}$ )



# Ингибирование ферментов

- Ингибиторы — связываются с ферментами и уменьшают их активность.
  - Ингибиторы делятся на **неспецифические** (вызывают денатурацию фермента)
  - И **специфические** (связываются с определенными ферментами)
  - Специфические :**
- Бывают обратимыми и необратимыми;
- Обратимые ингибиторы связываются с ферментами посредством невалентных взаимодействий. Различают два вида обратимых ингибиторов
  - Конкурентные ингибиторы;
  - Неконкурентные ингибиторы;
- Необратимые ингибиторы ковалентно связываются с ферментами, уменьшая концентрацию активных ферментов.

# Необратимое ингибирование

Очень медленная диссоциация ЭИ  
комплекса

Связываются ковалентными связями с  
ферментом

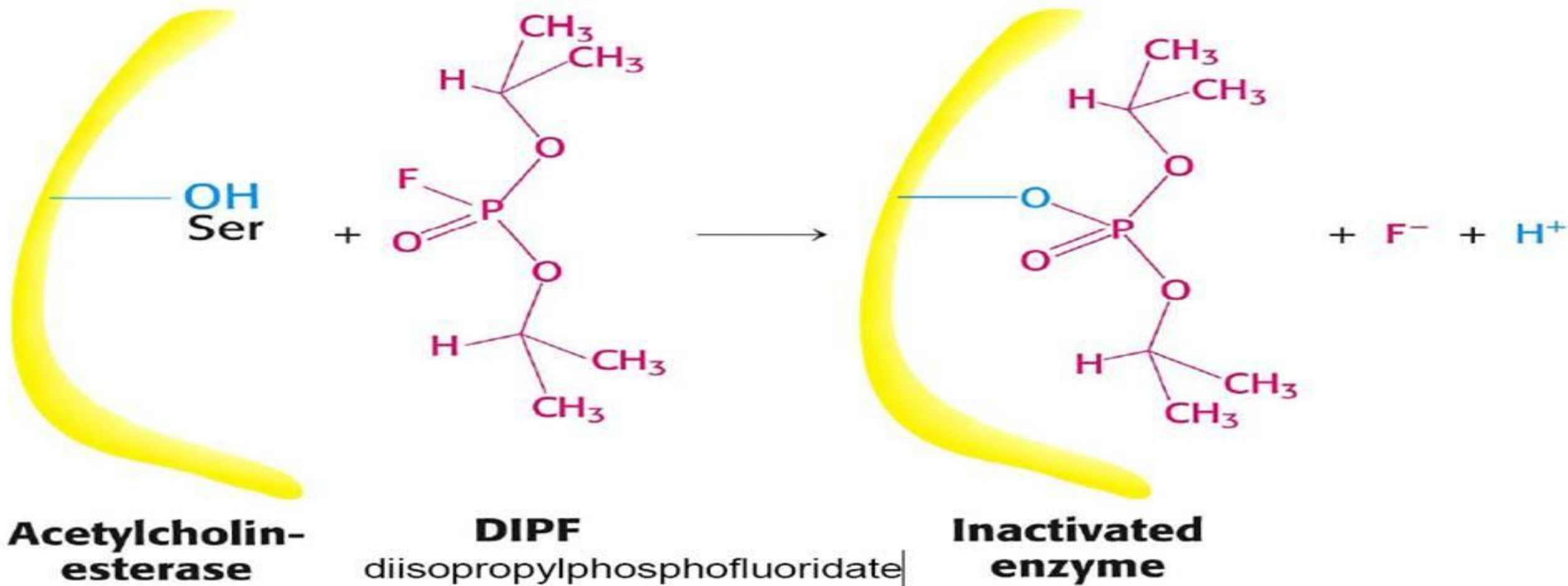
## Необратимые ингибиторы

- *ингибиторы специфические к группам аминокислотных остатков*
- *аналоги субстратов*
- *суицидные ингибиторы*



# Ингибиторы специфические к группам аминокислотных остатков

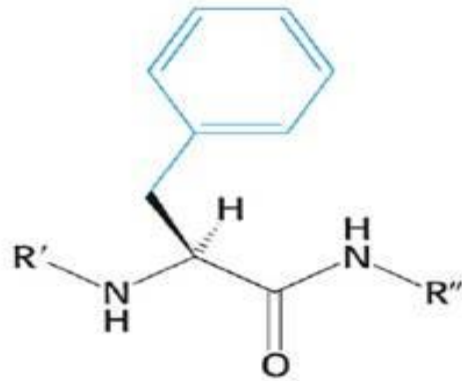
-реагируют со специфическими R группами



# Аналоги субстратов

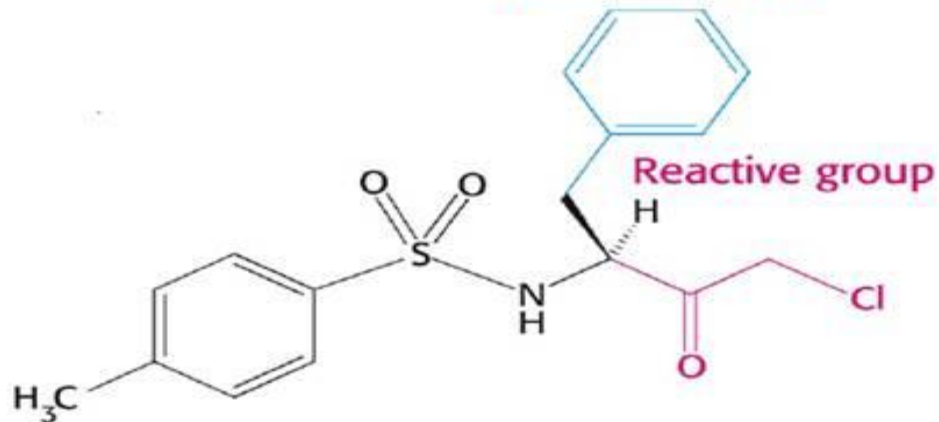
- структурно похожи на субстрат фермента
- ковалентно модифицируют активный центр

(A)



Natural substrate for chymotrypsin

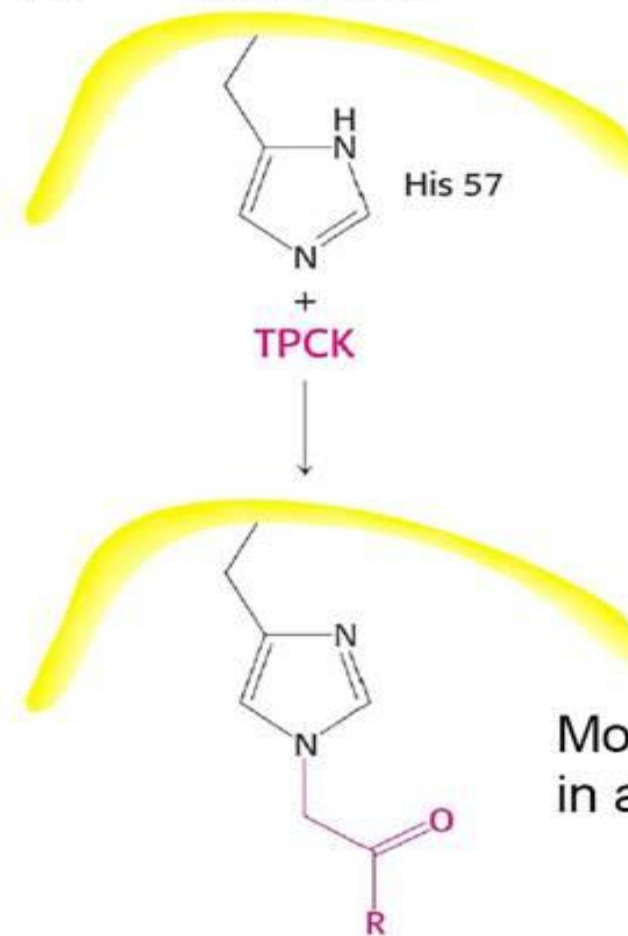
Specificity group



Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)

(B)

Chymotrypsin





## Суицидные ингибиторы

- Ингибитор связывается как субстрат и сначала инициирует нормальный каталитический механизм
- Потом образуются химически реактивные соединения, которые инактивируют фермент, вызывая его ковалентную модификацию
- "Суицидный", потому что фермент сам принимает участие в своем инактивировании

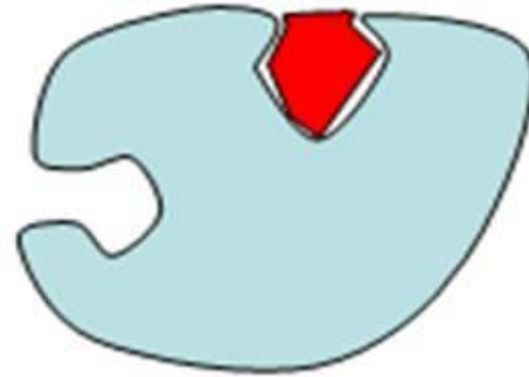


# Обратимые ингибиторы

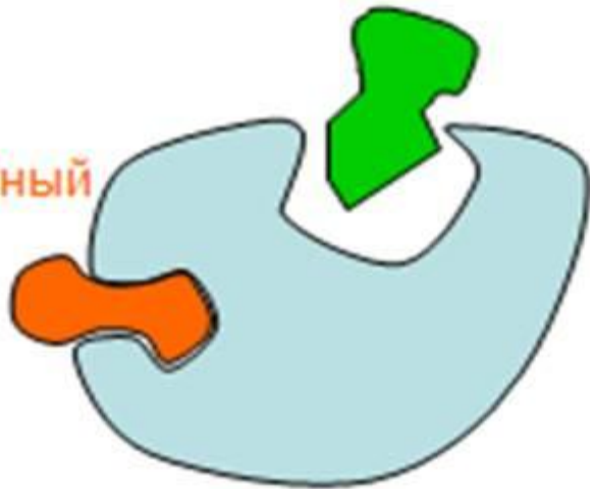
субстрат



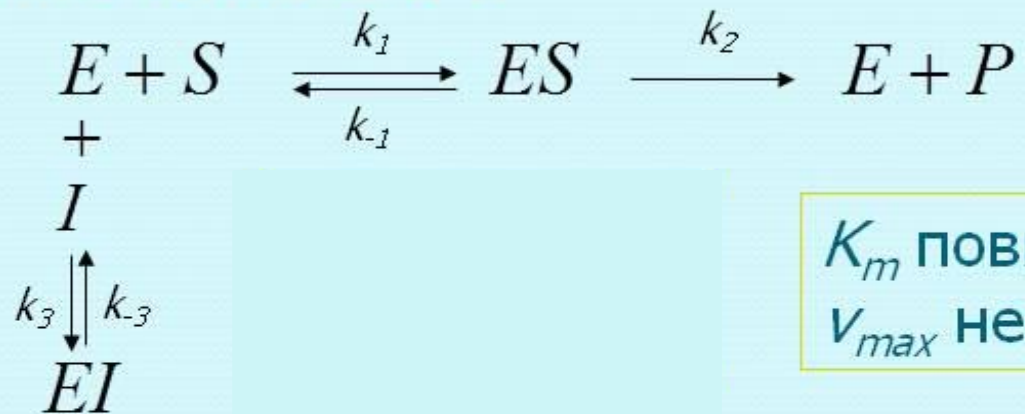
конкурентный ингибитор



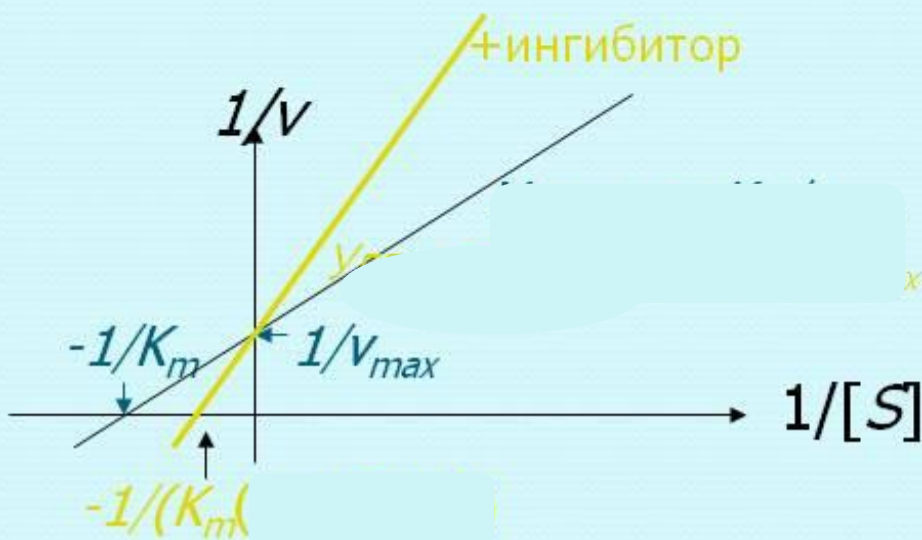
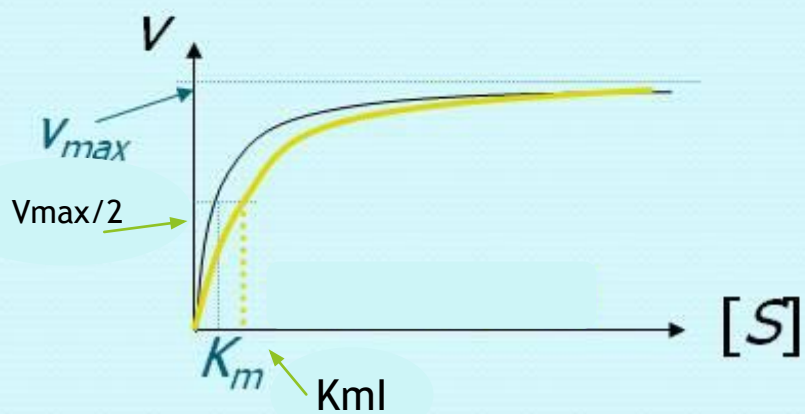
неконкурентный ингибитор



# Конкурентные обратимые ингибиторы связывание только с E

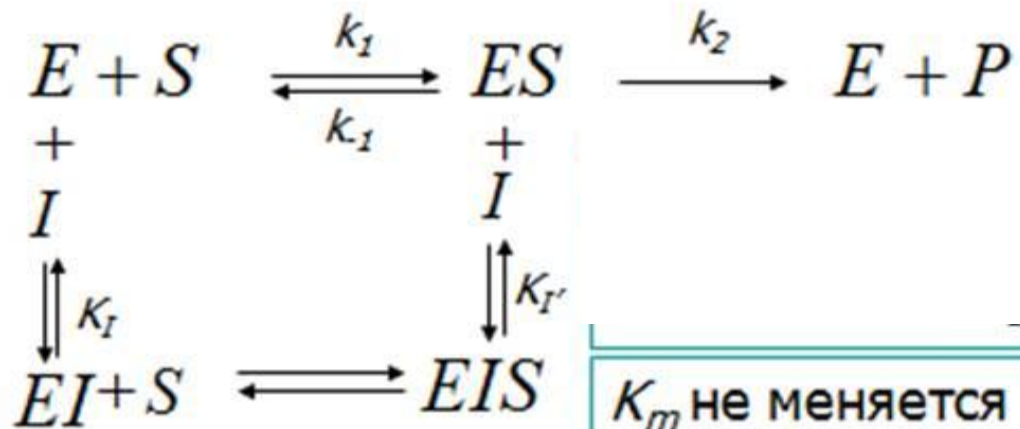


$K_m$  повышается  
 $V_{max}$  не меняется



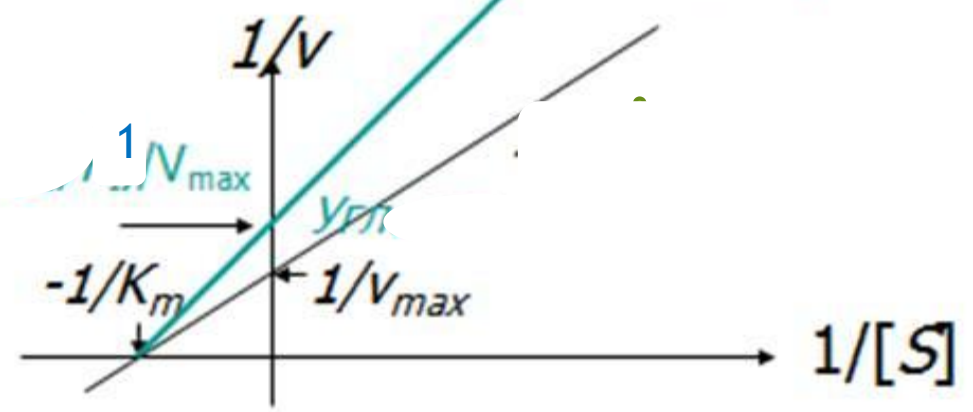
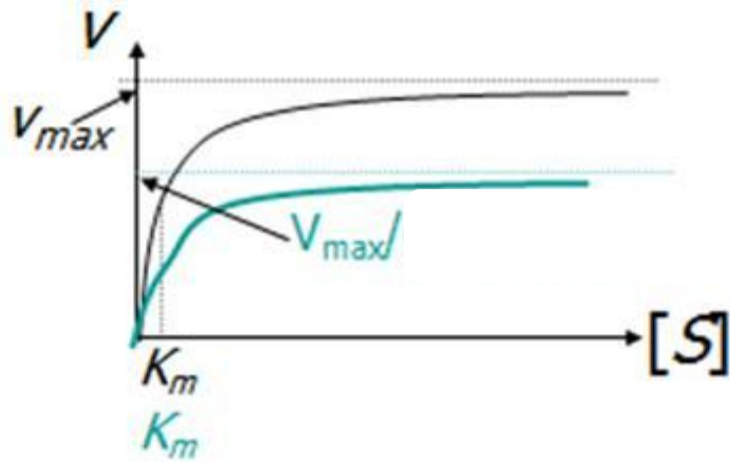
# Неконкурентные обратимые ингибиторы

## Связывание с E и ES



$K_m$  не меняется  
 $V_{max}$  уменьшается

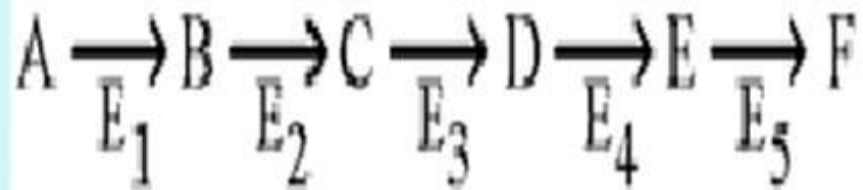
+ингибитор





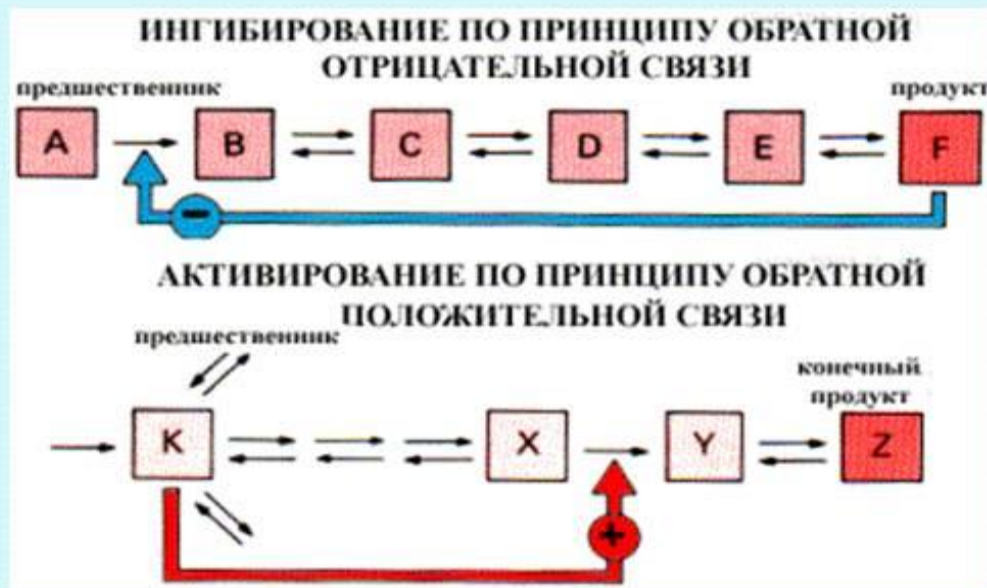
# МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ

- Цепь ферментативных реакций, в которой продукт одного фермента является субстратом следующего фермента:



# Ключевой фермент метаболического пути

- Является лимитирующим звеном (минимальная величина  $V_{\text{макс.}}$ )
- Обладает аллостерическим центром.



# УРОВНИ РЕГУЛЯЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

1. Генетический уровень.
2. Посттрансляционная модификация.
3. Автономная саморегуляция.
4. Регуляция инактивации и деградации.



# 1. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ УРОВЕНЬ



- Регуляция биосинтеза белка-фермента.
- Осуществляется на уровне транскрипции и трансляции.
- Индукция синтеза → увеличение концентрации фермента → увеличение скорости ферментативной реакции.

## 2. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ

- Ограниченный протеолиз (профермент → фермент)

Катализируется высокоспецифичной протеиназой

- Фосфорилирование. С помощью АТФ и протеинкиназ

- Дефосфорилирование. С помощью  $H_2O$  и протеинфосфатаз

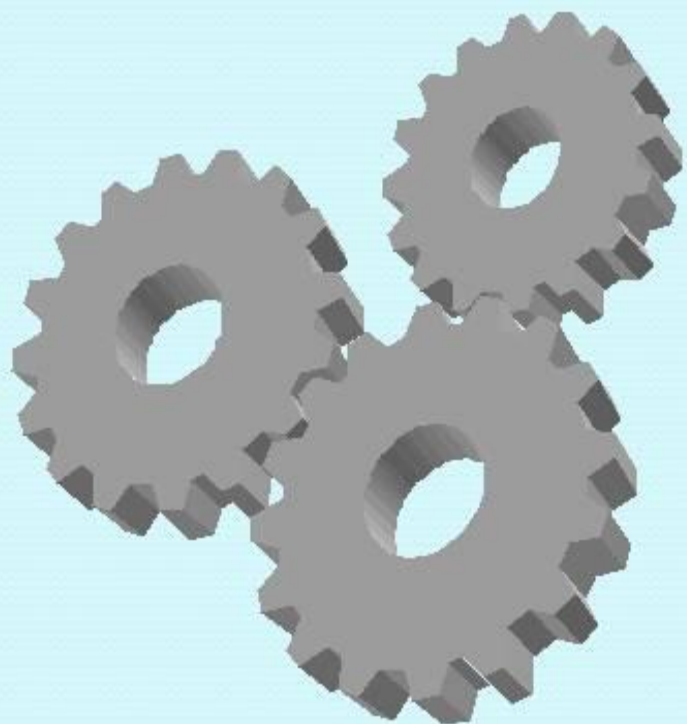
- Восстановление серы в активном центре цистеиновых ферментов.



В присутствии восстановителей : Цис, глутатион, НАДН<sub>2</sub>, и др.



### 3. АВТОНОМНАЯ САМОРЕГУЛЯЦИЯ



- Регуляция со стороны самих участников ферментативной реакции (E, S, P).
- Два механизма:
  - а) кинетический (присущи каждому ферменту)  
один E-один S-один P  
два E-один S  
изоферменты
  - б) аллостерический.

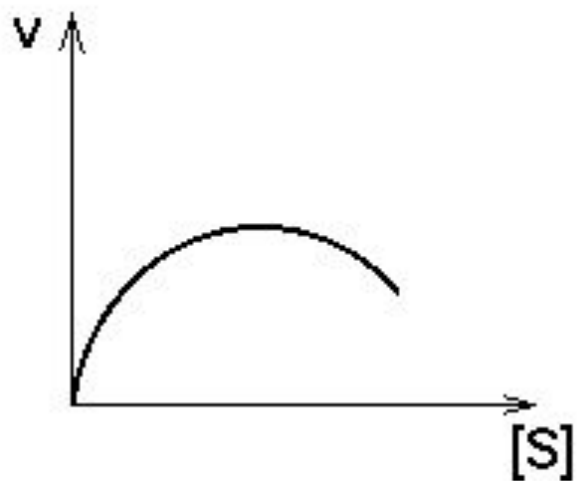
# АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФЕРМЕНТА

- Образован боковыми цепями аминокислот.
- Лиганды аллостерического центра – эффекторы («-» ингибиторы или «+» активаторы).
- Конформационное изменение распространяется на активный центр.

## Аллостерический механизм автономной саморегуляции

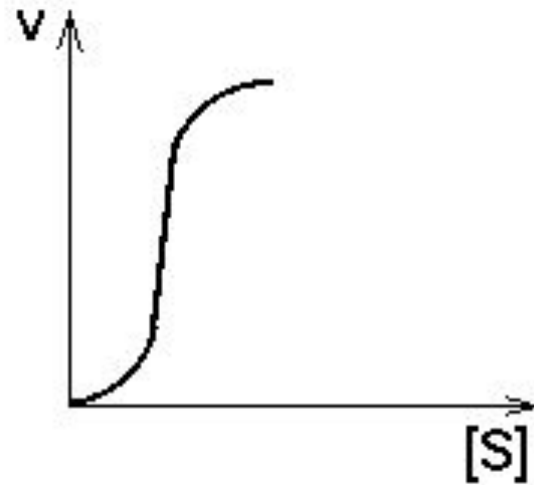
- Субстрат или продукт могут быть аллостерическими активаторами или ингибиторами фермента.

## СУБСТРАТ или ПРОДУКТ - аллостерический ИНГИБИТОР своего фермента.



При чрезмерном поступлении субстрата в клетку скорость утилизации субстрата все больше будет замедляться. Так происходит, когда избыток продукта реакции опасен для клетки (опаснее, чем избыток субстрата).

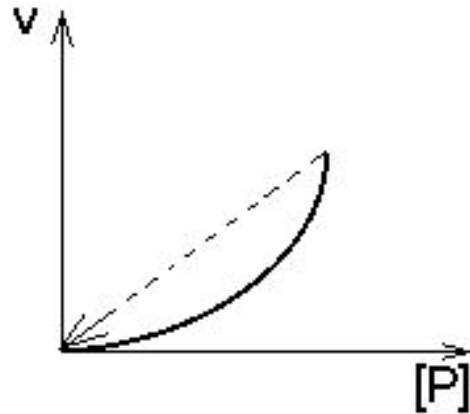
# СУБСТРАТ - аллостерический АКТИВАТОР своего фермента



Кинетическая кривая имеет S-образный характер, то есть имеет 2 перегиба (как кривая диссоциации оксигемоглобина). В этом случае концентрация субстрата удерживается более эффективно на постоянном уровне и в более узком диапазоне, чем в предыдущем случае. Биол. роль такого механизма регуляции - защита клетки от накопления нежелательного S (S- БАВ или токсичное вещество)



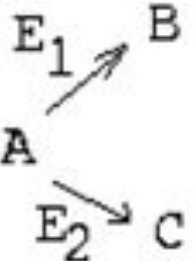
## ПРОДУКТ реакции - аллостерический АКТИВАТОР своего фермента



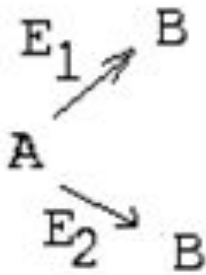
Кинетическая кривая имеет лавинообразный (взрывообразный) характер. С увеличением концентрации субстрата скорость реакции, как обычно, возрастает. Это приводит к накоплению продукта, который активирует фермент, в результате продукт накапливается еще быстрее, а фермент активируется еще сильнее. Скорость реакции становится очень большой, и реакция протекает мгновенно до полного расщепления субстрата. Биол. роль такого механизма регуляции - защита клетки от накопления нежелательного S (S- БАВ или токсичное вещество), как и в предыдущем случае, но работает более эффективно.



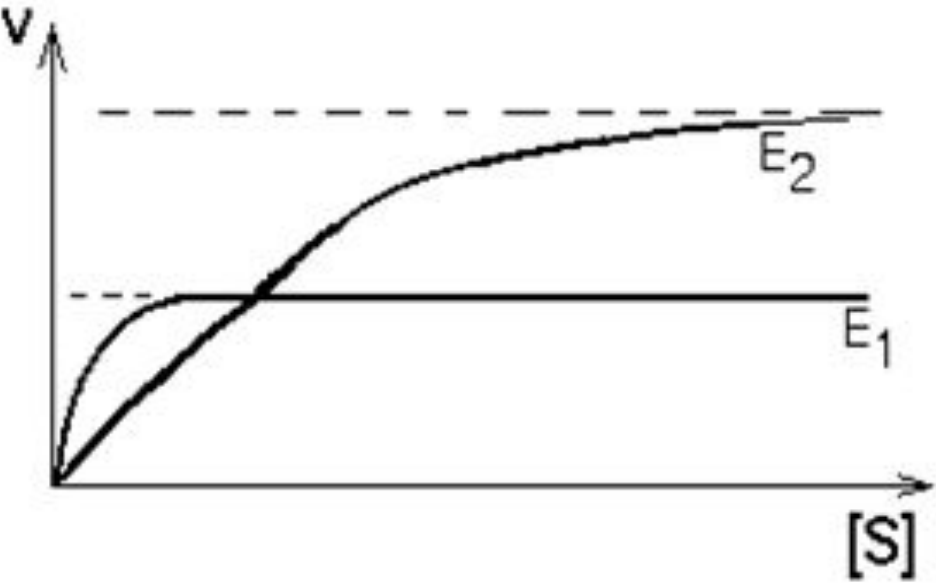
ОДИН СУБСТРАТ - ДВА ФЕРМЕНТА  
И ДВА ПРОДУКТА.



Изоферменты



В общем случае кинетические кривые этих двух реакций не совпадают.



# РЕГУЛЯЦИЯ ИЗВНЕ

- **Биологически активные вещества**
- (гормоны, нейромедиаторы и другие) влияют на
  - (1) генетический уровень,
  - (2) уровень посттранскрипционной модификации и
  - (4) процесс инактивации и деградации ключевых ферментов.
- **Фармакологические препараты и токсины** могут влиять на синтез ферментов (генетический уровень), посттрансляционную модификацию или на активность ферментов (чаще в качестве ингибиторов).

# Ферменты востребованы в медицине

*Использование ферментов в медицине  
происходит по 3 направлениям:*

- энзимодиагностика;
- энзимотерапия;
- использование ферментов в медицинских технологиях



# Энзимодиагностика

- исследование ферментов в биологических средах организма (плазма крови, моча, слюна) с диагностической целью

## *Группы ферментов плазмы крови:*

### *1) Клеточные*

- неспецифические ферменты (катализируют общие для всех тканей реакции обмена)
- **органоспецифические, или индикаторные (специфичны для определенного типа тканей). Выход органоспецифических ферментов в кровь сигнализирует о поражении определенного органа (АсАТ, АлАТ)**

# Энзимодиагностика

*Группы ферментов плазмы крови:*

## *2) Секреторные*

синтезируются в печени и постоянно высвобождаются в кровь, выполняют в крови специфические функции. При нарушении функций печени их активность в сыворотке крови снижается

## *3) Экскреторные*

Образуются органами пищеварительной системы (поджелудочная железа, эндотелий желчных путей, печень). При патологиях, когда блокирован путь экскреции активность этих ферментов в крови увеличивается ( $\alpha$ -амилаза, щелочная фосфатаза)



# Энзимотерапия

- использование ферментов и регуляторов активности ферментов в качестве лечебных средств

- 1) заместительная терапия ферментами при болезнях желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, липаза – препарат Фестал) и др.
- 2) ингибиторы моноаминоксидазы используют при лечении нервно-психических расстройств, ингибиторы ксантиноксидазы подавляют развитие подагры.



# *Использование ферментов в медицинских технологиях*

- Высокая специфичность ферментов к определенным субстратам позволяет применять их в качестве реагентов в лабораторной диагностике
  - (определения концентрации глюкозы в сыворотке крови с помощью глюкозооксидазы)
  - иммуноферментные методы диагностики (ИФА) основаны на образовании тройного комплекса фермент-антиген-антитело.