

Развитие моделей взаимодействия фермента с субстратом.

Модель «ключ-замок»

Активный центр фермента точно соответствует форме и структуре молекулы субстрата.

Модель индуцированного соответствия

Активный центр фермента может изменить конформацию после связывания субстрата. Модель индуцированного соответствия объясняет не только специфичность ферментов, но и стабилизацию переходного состояния. Эта модель получила название «рука-перчатка».

Классы ферментов

Класс 1. Оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции, осуществляют перенос 2H или O.

Класс 2. Трансферазы переносят ту или иную функциональную группу, отличную от 2H или O, от одного субстрата на другой.

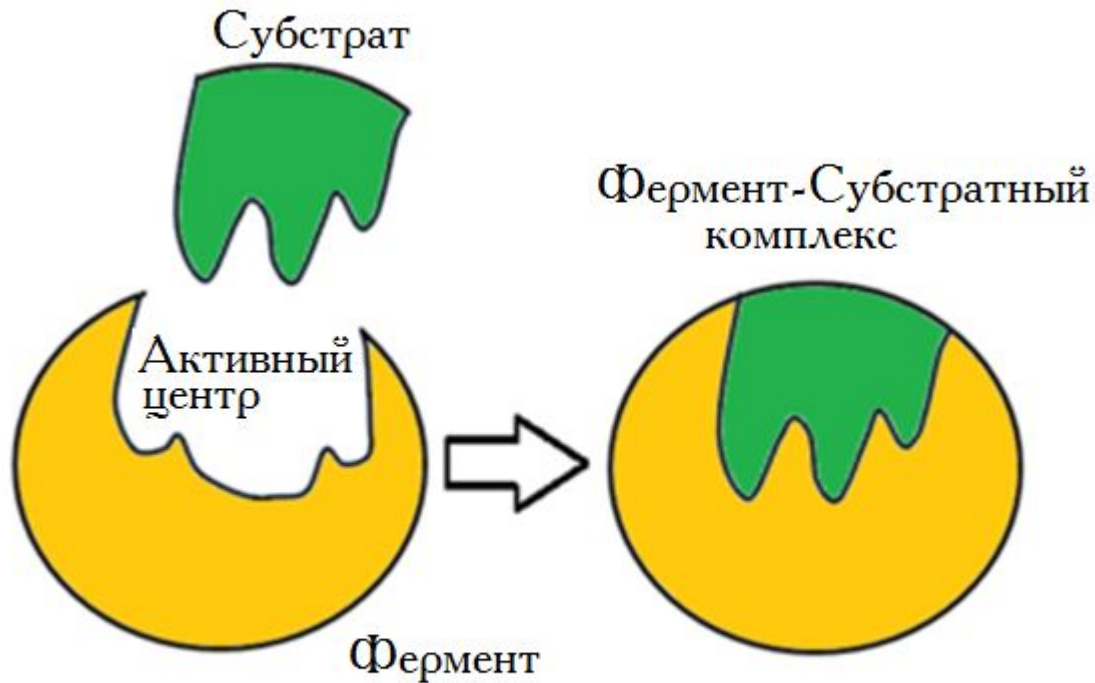
Класс 3. Гидролазы также участвуют в переносе групп, однако акцептором здесь всегда является молекула воды.

Класс 4. Лиазы катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи.

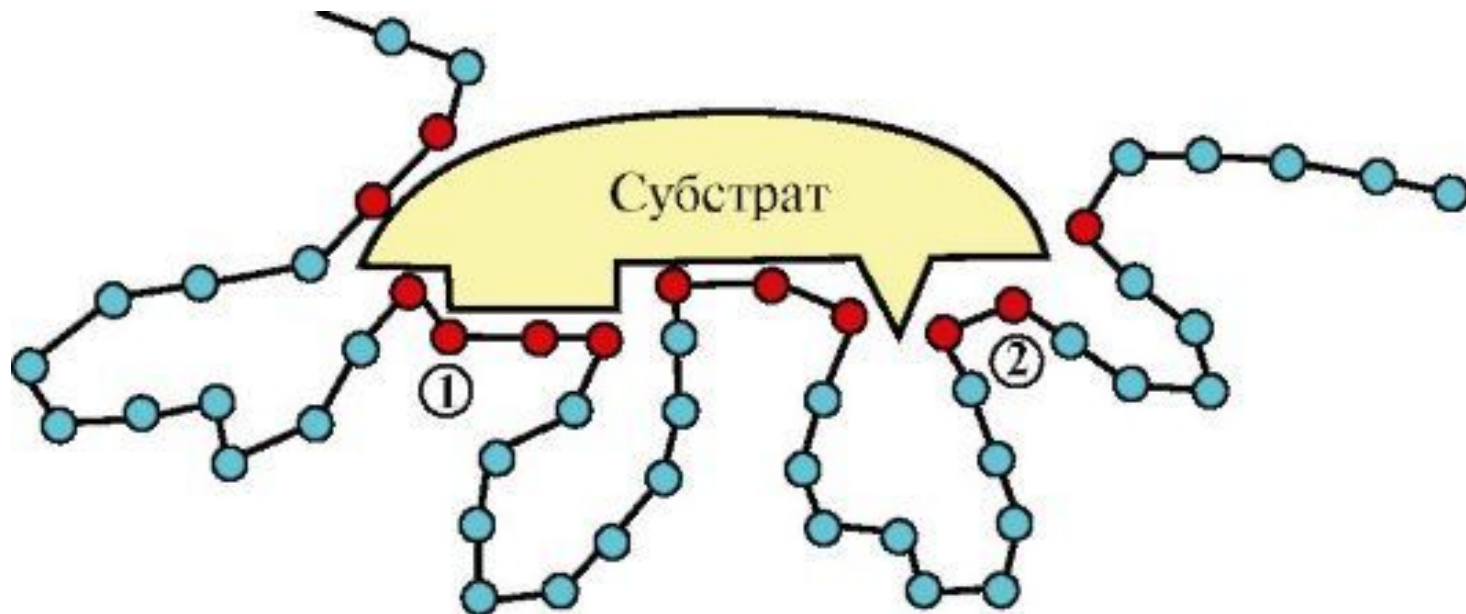
Класс 5. Изомеразы перемещают группы в пределах молекулы без изменения общей формулы субстрата.

Класс 6. Лигаза катализируют энергозависимые реакции присоединения и поэтому их действие сопряжено с гидролизом нуклеозидтрифосфата (чаще всего АТФ).

Ферменты это Катализаторы биохимических реакций **белковой природы**, содержат **Активный центр**, который является особой областью, щелью, или впадиной на поверхности фермента.



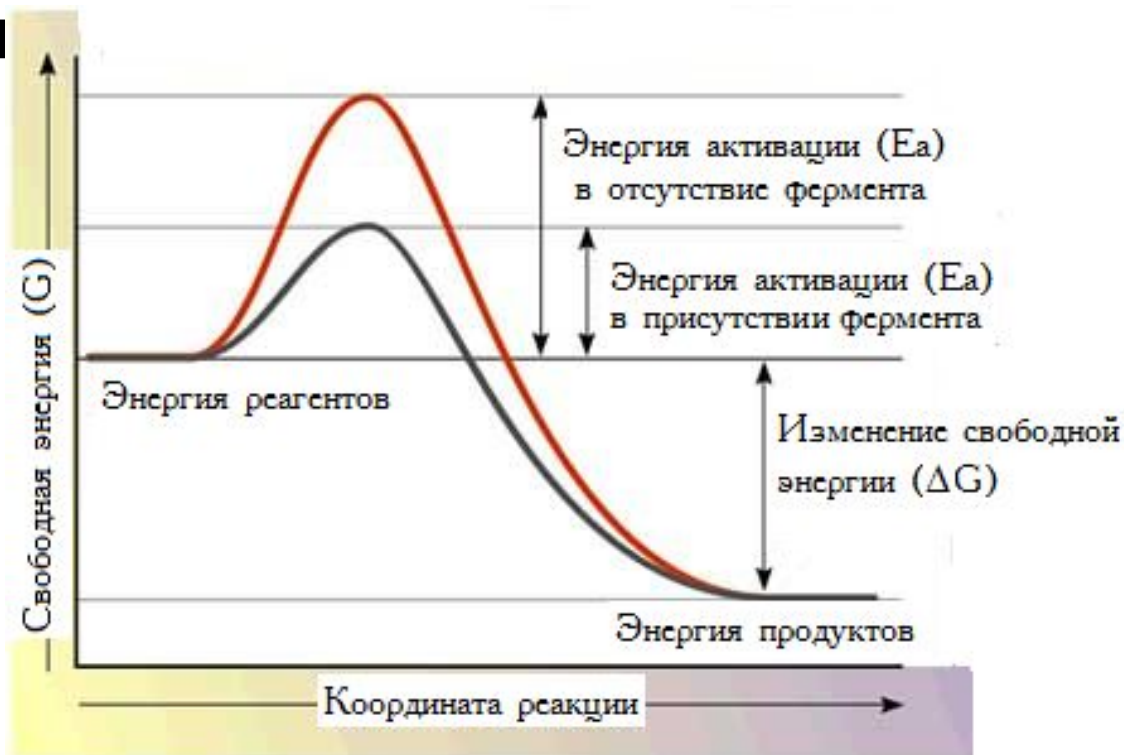
Активный центр комплементарен структуре субстрата, и необходим для его связывания.



Связывание субстрата приводит к:

- Стабилизации переходного состояния,
- Уменьшению энергии активации,
- Увеличению скорости превращения Субстрата (S) в Продукт (P).

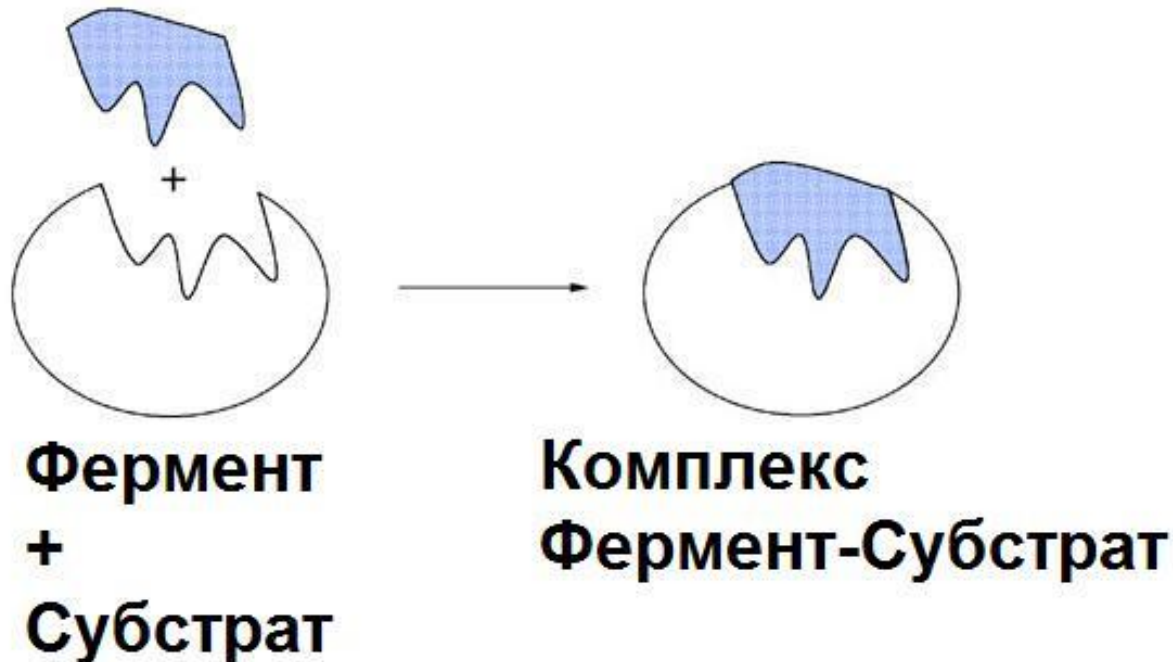
Но в тоже время нет смещения равновесия реакции



Развитие моделей взаимодействия фермента с субстратом.

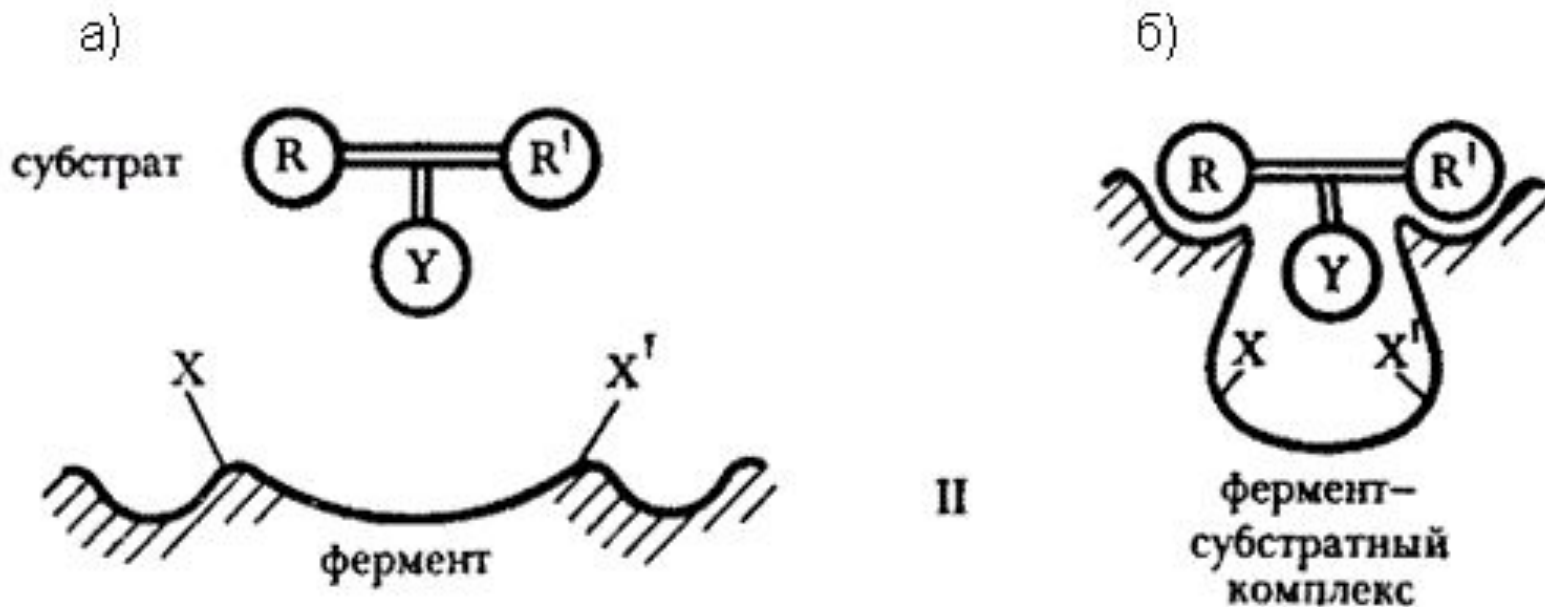
Модель «ключ-замок» (Эмиль Фишер, 1890 г.)

Активный центр фермента точно соответствует форме и структуре молекулы субстрата.



Модель индуцированного соответствия (Дениел Кошланд, 1958 г.)

Активный центр фермента может изменить конформацию после связывания субстрата. Модель индуцированного соответствия объясняет не только специфичность ферментов, но и стабилизацию переходного состояния. Эта модель получила название «рука-перчатка».



Поскольку молекула фермента довольно гибкая, а субстрат имеет жесткую структуру, энергетически менее предпочтительная, но каталитически активная конформация активного центра образуется лишь в фермент-субстратном комплексе (схема б). На образование ее тратится часть свободной энергии сорбции.

Рассмотрим *индуцированное соответствие* на примере фосфорилирующего белка - гексокиназы - его субстрату. Этот белок переносит фосфатную группу с АТФ на глюкозу. Но эта же фосфатная группа может быть перенесена и на воду; однако этого не происходит. В попытке ответить на вопрос, почему этого не происходит, Кошланд постулировал следующее.

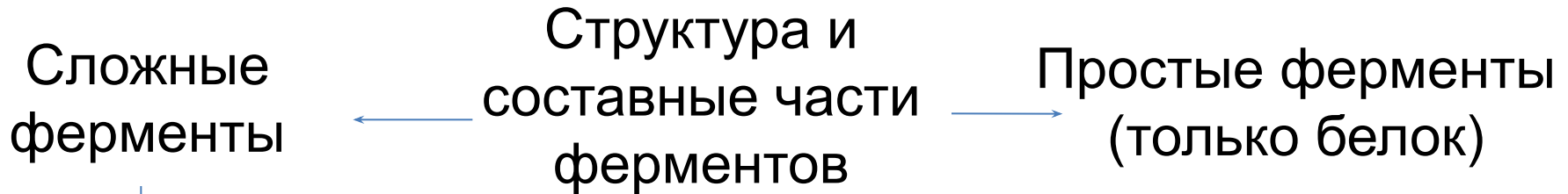
- 1) До связывания с субстратом фермент находится в "открытой" форме (в которой он может захватить субстрат из воды, но не способен провести его фосфорилирование).
- 2) После связывания с субстратом домены поворачиваются, щель закрывается, вода из нее вытесняется, а все компоненты каталитического центра сходятся вместе: фермент - переходит в "закрытую", каталитически-активную форму, но вода вытеснена из активного центра и потому не конкурирует с субстратом за фосфорилирование.
- 3) После каталитического акта фермент снова открывается, и фосфорилированный субстрат уходит.

Впоследствии опыт полностью подтвердил эту гипотезу, но только для тех белков, которым нужно скрыть обрабатываемый субстрат от конкурирующей с ним воды. Для действия трипсина, например, этого не нужно, и в нем индуцированного соответствия субстрату не наблюдается: трипсин (а также - химотрипсин, эластаза, субтилизин и т.д.) не деформируется и опознает субстрат по простейшему принципу "*ключ - замок*".

Индукционное соответствие достигается *смещением* либо крупных блоков, либо целых белковых доменов, - а не полной перестройкой укладки белковой цепи. А смещения эти происходят в основном путем мелких локальных деформаций. [Аналогия: мышцы сокращаются ("локальная деформация"), и пальцы ("домены") сжимаются в кулак.]

Химическая природа и структура ферментов.

- Большинство ферментов имеют белковую природу, но ферментативной активностью обладает также и РНК (Томас Р. Чек, Нобелевская премия 1989 г.).
- Доказательства белковой природы ферментов таковы:
- а) потеря активности при кипячении; б) денатурация при УФ и рентгеновском облучении, действии ультразвука, кислот, щелочей, тяжелых металлов; в) гидролиз до аминокислот; г) осаждение под действием солей, (высаливание) без потери каталитических свойств; д) высокая молекулярная масса, амфотерные свойства, способность к электрофорезу; е) возможность искусственного синтеза из аминокислот (впервые так была синтезирована рибонуклеаза).



Холофермент (Активная форма) = Белковая часть Или **апофермент** + Кофактор, Не белковые молекулы

Кофакторы:

- Витамины и их производные,
- Невитамины,
- Ионы металлов и их комплексы.

Кофакторы:

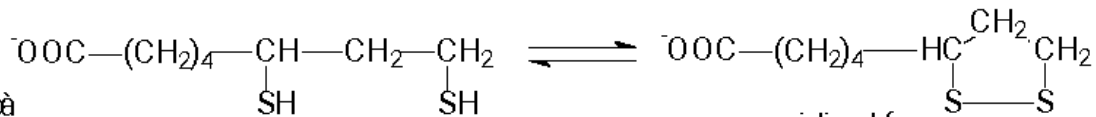
Кофермент не связан ковалентно с ферментом, но присоединяется во время реакции к молекуле фермента подобно субстрату, химически изменяется и затем снова освобождается. Первоначальная форма кофермента регенерируется во второй, независимой реакции.

Простетическая группа прочно связана с протеиновой молекулой фермента и во время реакции ее не покидает. Группа, связавшаяся с коферментом, далее переносится на следующий субстрат или другую молекулу кофермента.

1. Vitamins
Àècàì èí ù

a) Lipoic acid

Èèí í àààý èèñèí cà

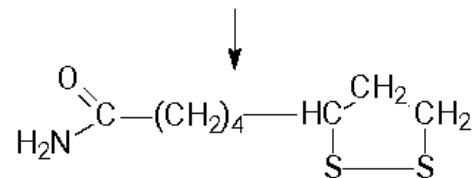
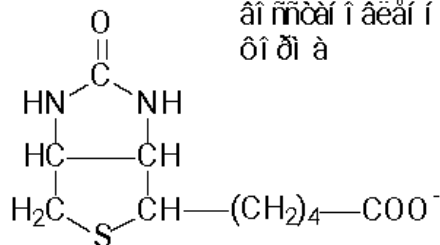


reduced form
âí ññcàí í àècàí í àý
ôí ðí à

oxidized form
í èèñècàí í àý
ôí ðí à

b) Biotin

Áèí cèí



2. Phosphoric acid esters of vitamins

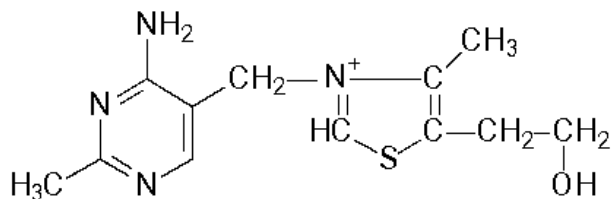
Ñèí cãí ù á ýòèðù àècàì èí í à è ôí ñôí ðí í é èèñèí cù

Lipoamide - Coenzyme form

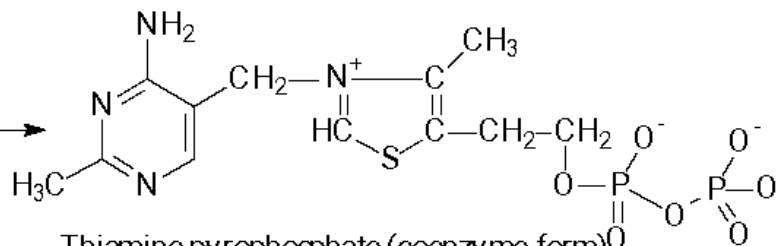
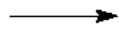
Èèí í àì èä - èí ýí çèì í àý ôí ðí à

a) Thiamine pyrophosphate

Òècàì èí í èðí ôí ñòcà



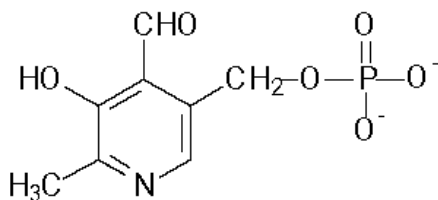
Thiamine - vitamin B₁
Òècàì èí - àècàì èí B₁



Thiamine pyrophosphate (coenzyme form)
Òècàì èí í èðí ôí ñòcà (cècàì èí àèôí ñòcà, èí ècãáí èñèècà)
- èí ýí çèì í àý ôí ðí à

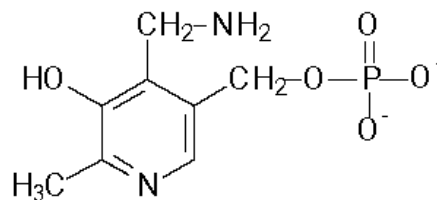
b) Pyridoxal phosphate

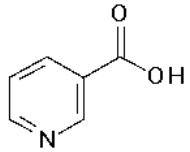
Í èðècàí èñcèü ôí ñòcà



b) Pyridoxamin phosphate

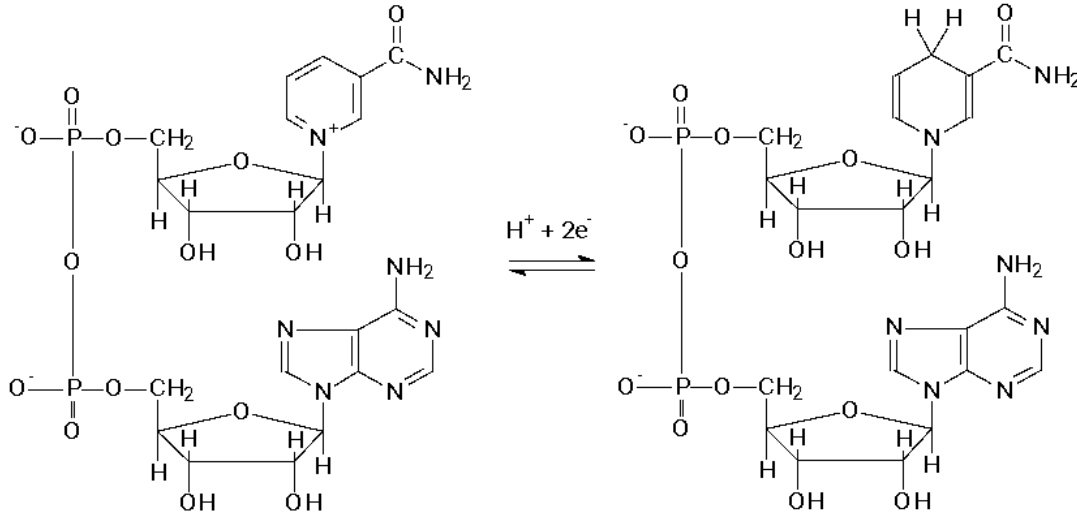
Í èðècàí èñcàì èí ôí ñòcà





Nicotinic acid, niacin, Vitamin B₅ or Vitamin PP

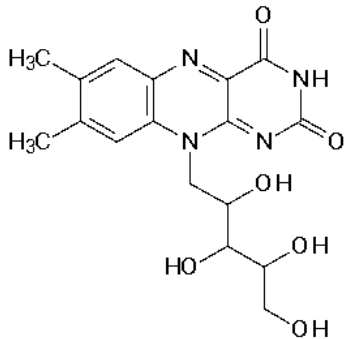
Í eef ðeif í ááy eeneif ðá, í eáðeif, áeðáí eif B₅ eee áeðáí eif B₅



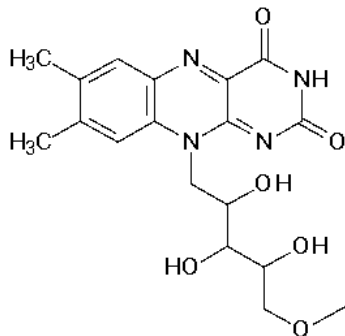
Nicotinamide adenine dinucleotide, abbreviated NAD⁺

Í eef ðeif áí eá áááif eif áeif eéeeif ðeá, í ÁÁ⁺

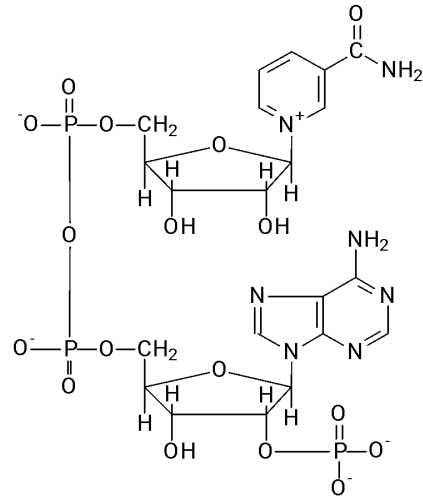
NADH
í ÁÁí



Riboflavin, also known as vitamin B₂,
Eeáí ðeááeif eee Áeðáí eif B₂

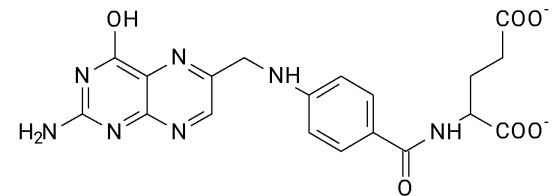


Flavin adenine dinucleotide (FAD)
Óeááeif áááif eif áeif eéeeif ðeá (ÓÁÁ)



Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP⁺

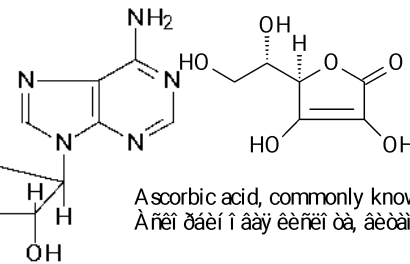
Í eef ðeif áí eá áeif eéeeif ðeá óí ðeáðeí eee í ÁÁÓ⁺



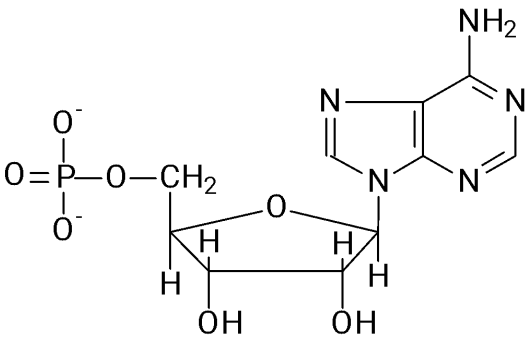
Folic acid, also known as vitamin B₉ or folacin,
as folate, the naturally occurring form.

Óí eé áááy eeneif ðá ðeáeáá eçááñóí áy
eáe áeðáí eif B₉ eee óí eáðeif.

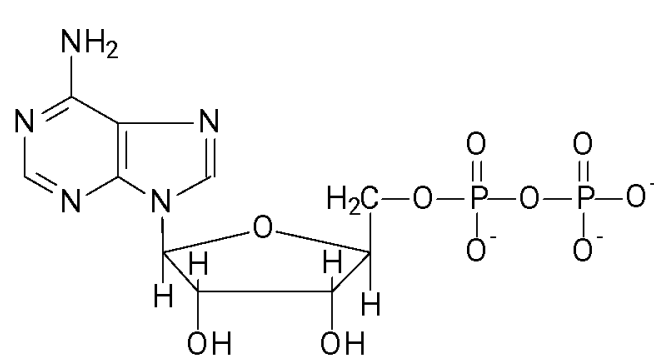
Í ðááñeáeáí á áeááí ðeðí áí í eí óí ðí ú - óí eáðá



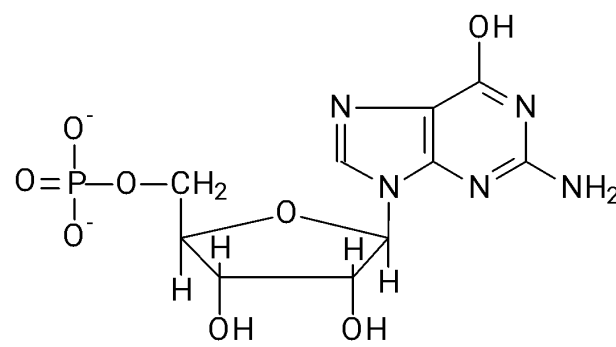
Ascorbic acid, commonly known as vitamin
Áñeif ðeáeif í ááy eeneif ðá, áeðáí eif Á



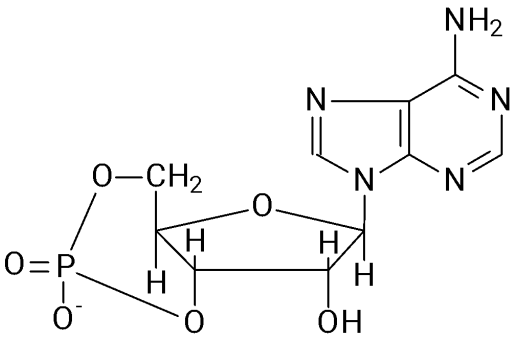
Adenosine monophosphate (AMP)
5-Adenylic acid
Àáâ ã çèí ì îíî ïò ñò àò (ÀÌ Ô)



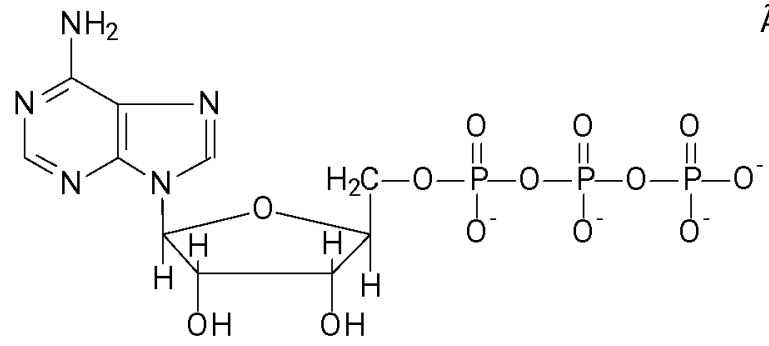
Adenosine diphosphate (ADP)
Àáâ ã çèí äèò ï ñò àò (ÀÄÔ)



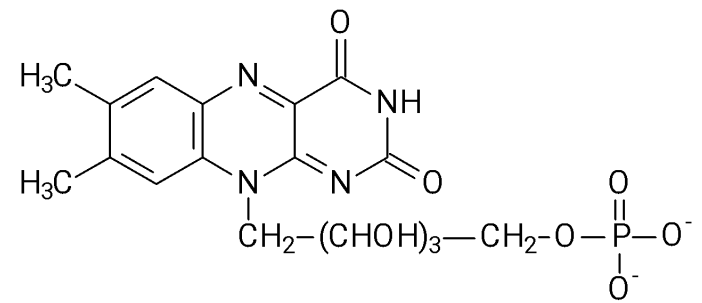
Guanosine monophosphate (GMP)
5-Guanylic acid
Ãóà ì éí ì îíî ïò ñò àò (ÃÌ Ô)



cyclo-Adenosine monophosphate (cAMP)
öèèè ì -Àáâ ã çèí ì îíî ïò ñò àò (öÀÌ Ô)



Adenosine triphosphate (ATP)
Àáâ ã çèí òèèèò ï ñò àò (ÀÒÔ)



Flavin mononucleotide (FMN)
Ôèèèè ì îíî ïò èèèè òèèè (ÔÌ Í)

Ионы металлов и их комплексы

Ион		Примеры ферментов содержащих этот ион
Медь	Cu^{2+}	Цитохром оксидаза Каталаза
Железо	Fe^{2+}	Цитохром (посредством Гема) Нитрогеназа Гидрогеназа
Магний	Mg^{2+}	Глюкозо-6-фосфатаза Гексокиназа
Марганец	Mn^{2+}	Аргиназа
Молибден	MoO_4^{2-}	Нитрат редуктаза
Никель	Ni^{2+}	Уреаза
Селен	Se	Глутатион пероксидаза Алкоголь дегидрогеназа
Цинк	Zn^{2+}	Карбоангидраза ДНК полимераза

Классификация ферментов.

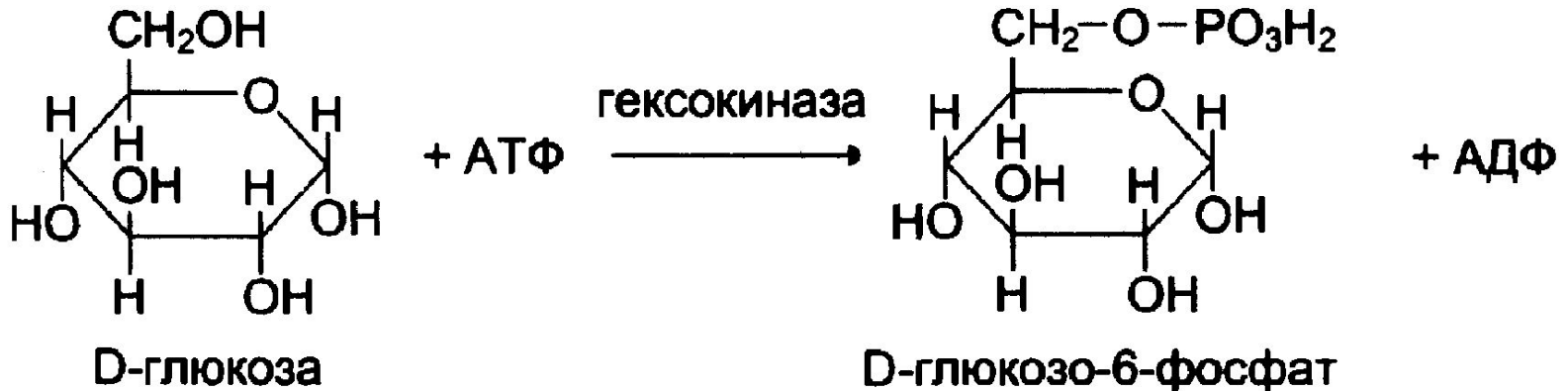
Различают два главных вида специфичности ферментов: **субстратную специфичность и специфичность действия.**

Субстратная специфичность это способность фермента катализировать превращения только одного определенного субстрата или же группы сходных по строению субстратов. Определяется структурой адсорбционного участка активного центра фермента. Специфичность, т.е. высокая избирательность действия ферментов, основана на комплементарности структуры субстрата и активного центра фермента и способности фермента катализировать превращения определенных стереоизомеров.

Различают 4 типа **субстратной** специфичности:

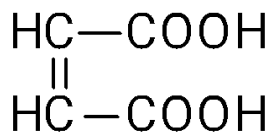
1. **Стереоспецифичность** – катализ только одного из стереоизомеров, например:

- специфичность к L- или D-аминокислотам, почти все ферменты человека взаимодействуют с L-аминокислотами, фермент оксидаза L-аминокислот способен окислять все аминокислоты, но относящиеся только к L-ряду.
- специфичность к D-сахарам, специфичность к α -гликозидным связям, например, амилаза.

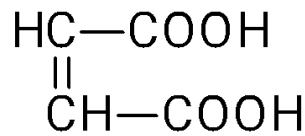


Специфичность к цис- и транс-изомерам.

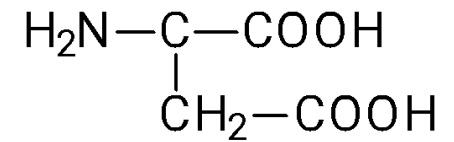
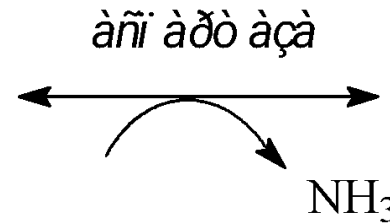
Например, аспартаза реагирует только с транс-изомером – фумаровой кислотой, но не с малеиновой кислотой (цис-изомер).



Ì àëãèí î âàÿ
êèñëí òà
(öèñ-èçì àđ)



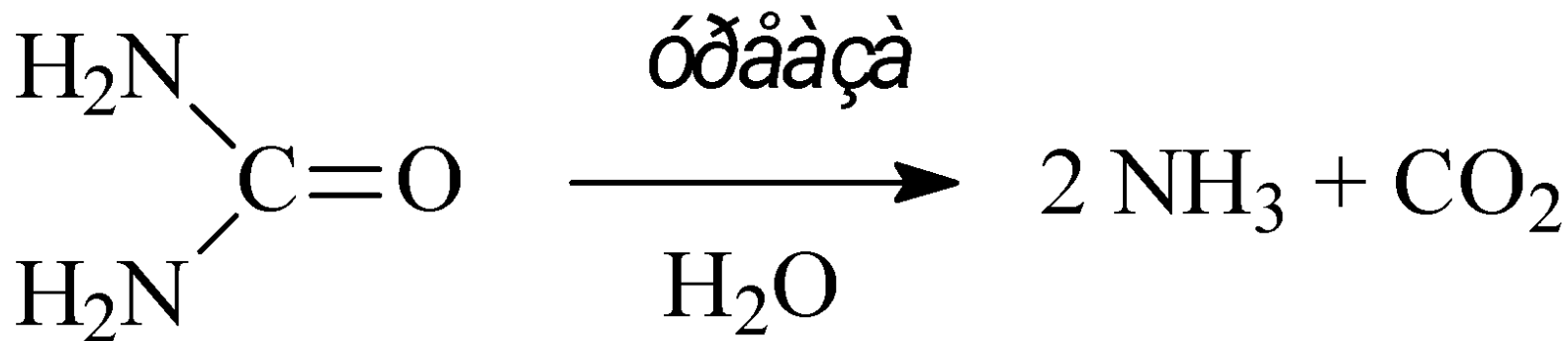
Ô ôí àđí âàÿ
êèñëí òà
(òđáí ñ-èçì àđ)



À ñí àđàãèí î âàÿ
êèñëí òà

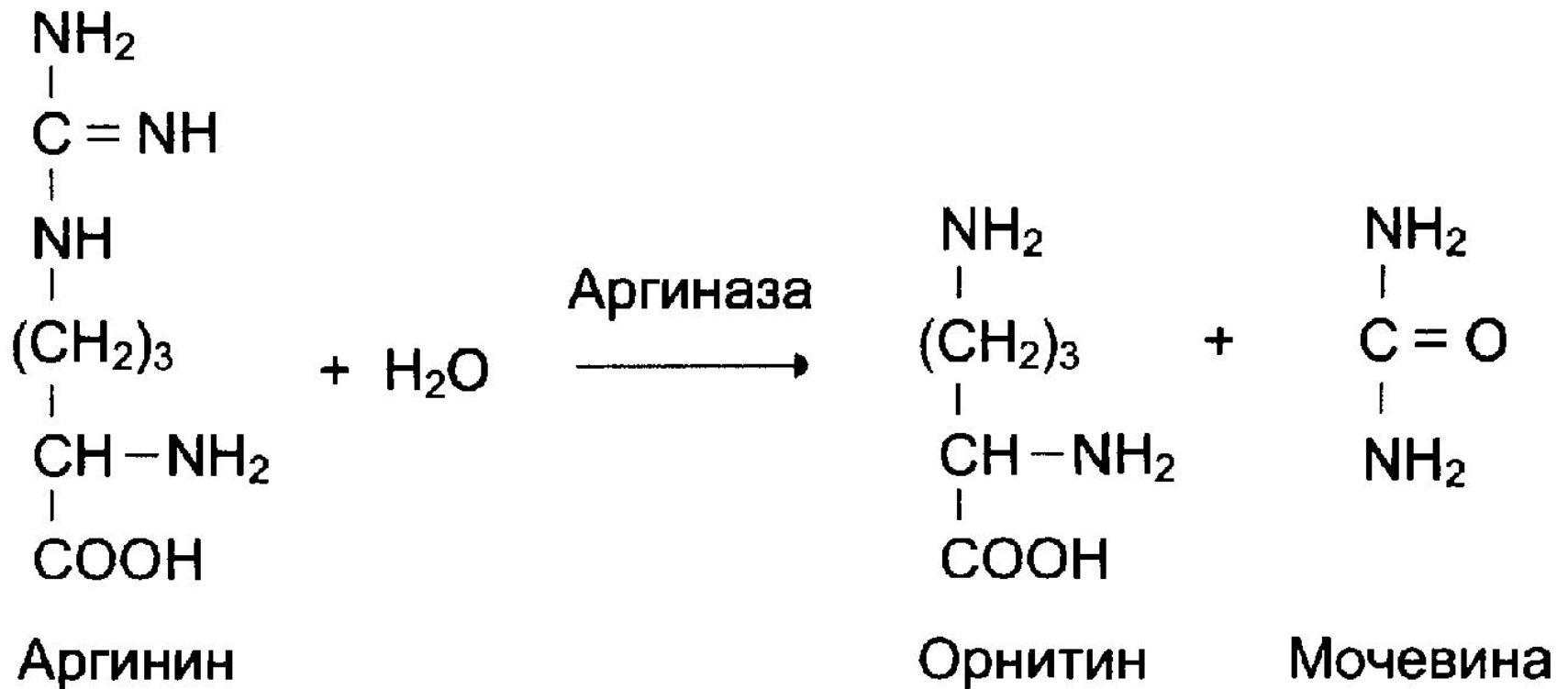
2. Абсолютная специфичность – фермент производит катализ только одного вещества.

Например, расщепление мочевины уреазой.



ì î ÷ââèí à

Другой пример – аргиназа, катализирующая расщепление аргинина до мочевины и орнитина.



3. Групповая специфичность – катализ субстратов с общими структурными особенностями, т.е. при наличии в молекуле определенной связи или химической группы: например, наличие пептидной связи:

- бактериальный фермент субтилизин специфичен к пептидной связи независимо от строения образующих ее аминокислот,
- пепсин катализирует разрыв пептидной связи, образованной аминокетонами ароматических аминокислот,
- тромбин расщепляет пептидную связь только между аргинином и глицином.

Или например, наличие ОН-группы:

алкогольдегидрогеназа окисляет до альдегидов одноатомные спирты (этанол, метанол, пропанол).

4. Относительная групповая специфичность – превращение субстратов с некоторыми общими признаками.

Например, цитохром P₄₅₀ окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

Специфичность действия - это способность фермента катализировать только определенный тип химической реакции.

В соответствии со специфичностью действия все ферменты делятся на 6 классов.

Классы ферментов обозначаются латинскими цифрами. Название каждого класса ферментов соответствует этой цифре.

В основу принятой классификации положен тип катализируемой реакции, который является специфичным для действия любого фермента. Этот принцип логично использовать в качестве основы для классификации и номенклатуры ферментов.

Номенклатура ферментов принята V Международным конгрессом биохимиков (1961).

1. Систематическая номенклатура. Название фермента включает: химическое название субстрата; тип химической реакции (в соответствии с международной классификацией ферментов); суффикс «-аза». Например: L-Лактат:НАД⁺ - оксидоредуктаза.

2. Рабочая номенклатура. Название фермента образуется из химического названия субстрата с добавлением суффикса «-аза» либо из названия химического превращения субстрата с добавлением суффикса «-аза». Например: lipos (жир), фермент катализирующий его превращение называется «липаза». Лактатдегидрогеназа - это рабочее название фермента L-Лактат:НАД⁺-оксидоредуктазы.

3. Тривиальное (исторически сложившиеся) название. Не дает представления о субстрате или типе химического превращения. Пример - пепсин, тромбин, трипсин, ренин.

Согласно систематической номенклатуре каждому ферменту был дан код (шифр), состоящий из 4х цифр, которые обозначают: 1-класс, 2-подкласс, 3-подподкласс, 4-порядковый номер фермента в подподклассе. Например: 1.1.1.27 - лактатдегидрогеназа, которая относится к I классу – оксидоредуктазам.

Таблица. Международная классификация ферментов

№Класс	Тип катализируемой реакции
1 Оксидоредуктазы	Перенос протонов 2H или O и электронов
2 Трансферазы	Перенос групп отличных от протонов
3 Гидролазы	Гидролиз различных связей с участием воды
4 Лиазы	Образование двойных связей путем удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5 Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6 Лигаза (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей C–C, C–O, C–N, C–S, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

Классы ферментов

Класс 1. Оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции, осуществляют перенос $2H$ или O .

Класс 2. Трансферазы переносят ту или иную функциональную группу, отличную от $2H$ или O , от одного субстрата на другой.

Класс 3. Гидролазы также участвуют в переносе групп, однако акцептором здесь всегда является молекула воды.

Класс 4. Лиазы катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи.

Класс 5. Изомеразы перемещают группы в пределах молекулы без изменения общей формулы субстрата.

Класс 6. Лигазы катализируют энергозависимые реакции присоединения и поэтому их действие сопряжено с гидролизом нуклеозидтрифосфата (чаще всего АТФ).

На основании разработанной системы, которая служит основой как для классификации, так и для нумерации (индексации) ферментов, Международная комиссия подготовила также Классификацию ферментов (КФ) с включением списка ферментов, первоначально состоявшего к 1961 г. примерно из 900 ферментов. В списке ферментов (см. Номенклатуру ферментов, 1978) насчитывалось уже 2142 индивидуальных фермента, к декабрю 1995 г. их идентифицировано более 3500. В списке для каждого фермента, помимо кодового номера (шифра), приводятся систематическое (рациональное) название, рекомендуемое (рабочее) название, химическая реакция, которую катализирует данный фермент, а также примечания о специфичности действия. Номер каждому ферменту рекомендуется присваивать по четырехзначному коду.

Код каждого фермента содержит четыре цифры, разделенные точками, и составляется по определенному принципу.

Первая цифра указывает номер одного из шести главных классов ферментов.

Вторая цифра означает подкласс, характеризующий основные виды субстратов, участвующих в данном типе химических превращений. Например, у трансфераз вторая цифра указывает на природу той группы, которая подвергается переносу, у гидролаз – на тип гидролизуемой связи и т.д.

Эти подклассы в свою очередь делятся на более частные подгруппы (подпод-классы), отличающиеся природой химических соединений доноров или акцепторов, участвующих в данной подгруппе реакций. Номер (цифра) подподкласса ставят на 3-е место в шифре фермента.

У гидролаз, например, эта цифра уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз – тип отщепляемой группы и т.д.

Первые 3 цифры кода точно определяют тип фермента. Наконец, все ферменты, относящиеся к данному подподклассу, получают порядковый номер в алфавитном порядке, который ставят на 4-е место в шифре.

<http://www.brenda-enzymes.org/index.php>

<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>

Клеточная организация ферментативной активности

Ферменты располагаются в субклеточных структурах (органеллах) соответственно их функциям. Например:

- а) в ядре содержатся ферменты преобразования нуклеиновых кислот;
- б) во внутренней мембране митохондрий – ферменты дыхательной цепи;
- в) в лизосомах – гидролазы; г) в цитоплазме – ферменты гликолиза, синтеза жирных кислот; д) в матриксе митохондрий – ферменты ЦТК, окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, β -окисления жирных кислот; е) плазматическая мембрана содержит ферменты транслоказы, которые переносят через мембрану ионы Na^+ , K^+ , глюкозу, аминокислоты и т.д.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Ферментативные реакции, как и все химические реакции, ускоряются при повышении температуры (в 2-4 раза на каждые 10°C). Однако скорость ферментативной реакции имеет свой температурный оптимум, превышение которого приводит к понижению активности ферментов из-за тепловой денатурации их молекул.

Для большинства ферментативных реакций температурный оптимум - $38-40^{\circ}\text{C}$, а при $50-60^{\circ}\text{C}$ и выше скорость ферментативных реакций сильно уменьшается из-за разрушения молекул фермента (искл. - миокиназа не инактивируется даже при 100°C).

Зависимость активности ферментов от температуры называется *термолабильностью*.

Ферменты лучше сохраняются при низких температурах – их активность снижается, но денатурации не происходит. Это свойство используется в медицине для производства препаратов ферментов.

При некоторых операциях необходимо снизить скорость обмена веществ. Тогда используют охлаждение органов (например, при пересадке почек, сердца и др. органов).

Зависимость ферментативной активности от pH среды.

Каждый фермент имеет свой pH–оптимум - значение pH, при котором его активность максимальна.

Фермент, как и любой белок, имеет в своей структуре ионогенные группы (например, карбоксильные группы или аминогруппы в боковых цепях), а от концентрации ионов водорода зависит их диссоциация и соотношение между положительно и отрицательно заряженными группами.

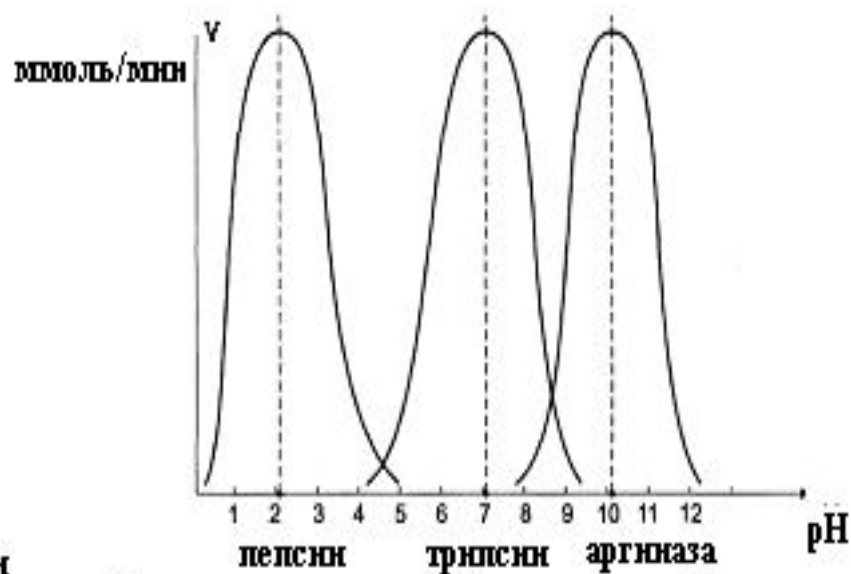
Соотношение между этими группами определяет и пространственное строение молекулы фермента (его конформацию), а следовательно, и его активность.

Большинство ферментов наиболее активны при pH=6-8.

Для пепсина $pH_{\text{опт}}$ 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.



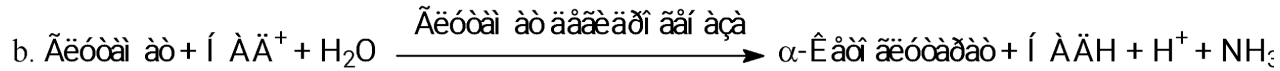
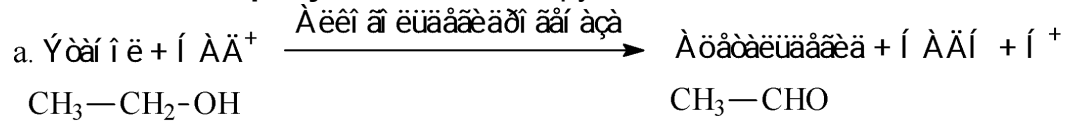
Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



Зависимость скорости ферментативной реакции от рН

Классы ферментов

Класс 1. Оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции, осуществляют перенос 2H или O.



Класс 2. Трансферазы переносят ту или иную функциональную группу, отличную от 2H или O, от одного субстрата на другой.

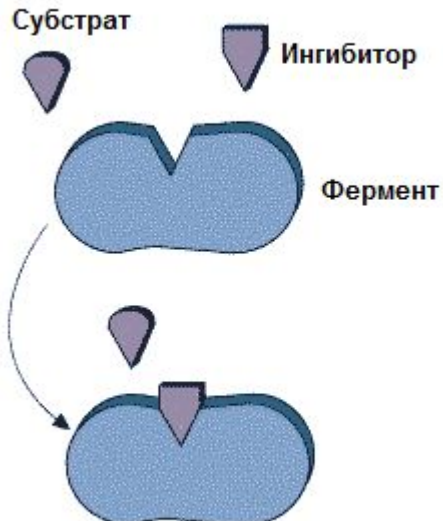
Класс 3. Гидролазы также участвуют в переносе групп, однако акцептором здесь всегда является молекула воды.

Класс 4. Лиазы катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи.

Класс 5. Изомеразы перемещают группы в пределах молекулы без изменения общей формулы субстрата.

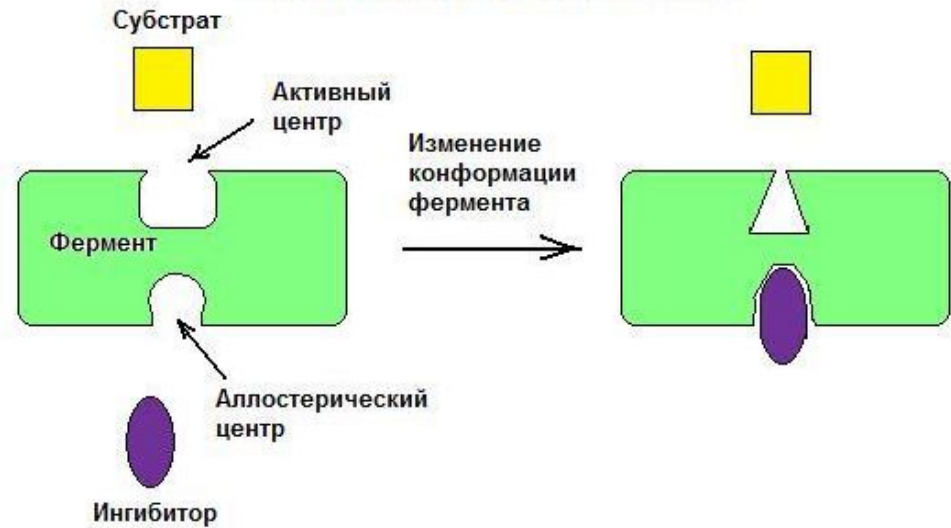
Класс 6. Лигазы катализируют энергозависимые реакции присоединения и поэтому их действие сопряжено с гидролизом нуклеозидтрифосфата (чаще всего АТФ).

Конкурентное ингибирование

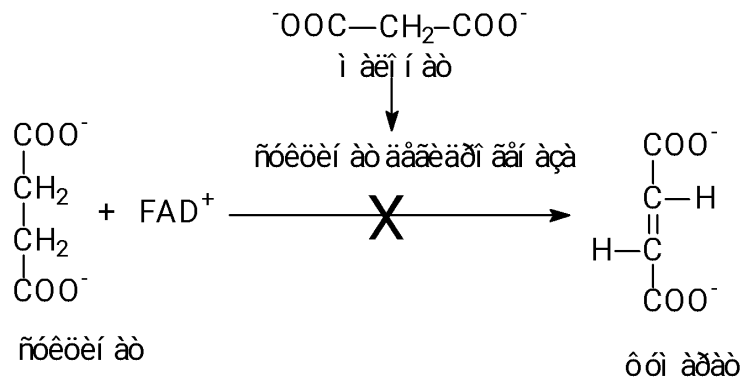
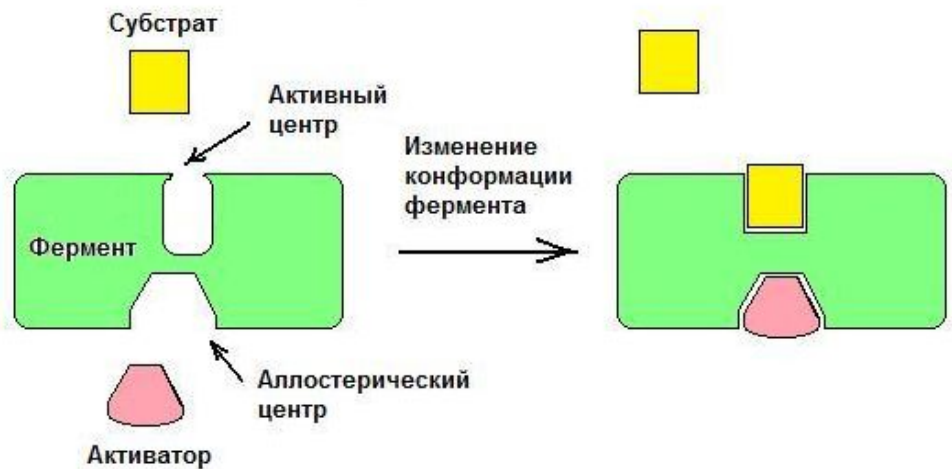


Ингибитор блокирует связывание субстрата

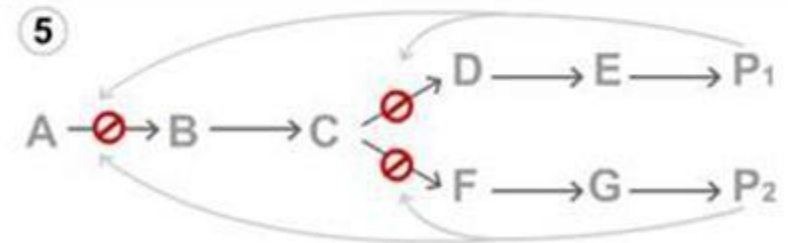
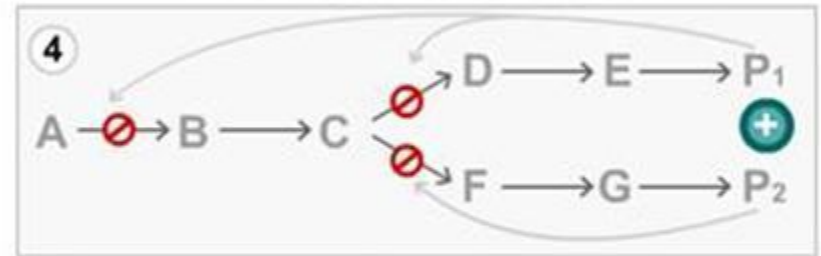
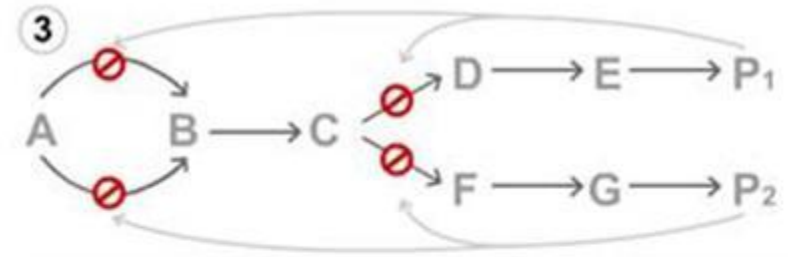
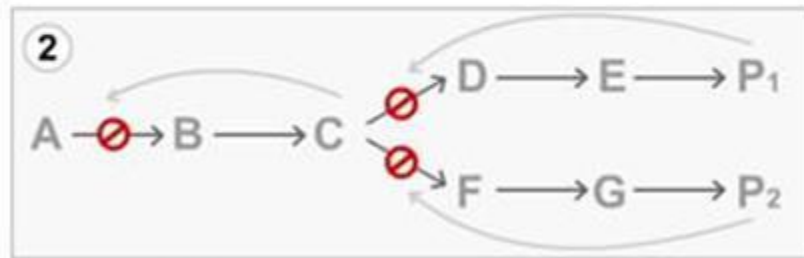
Аллостерическое ингибирование



Аллостерическая активация



Отрицательная обратная связь и метаболический путь



Образование конечного продукта (P) в достаточном количестве будет приводить к его связыванию в аллостерическом центре ингибирования соответствующего фермента и выключению метаболического пути между соответствующими стадиями.

Энзимодиагностика

Аланинаминотрансфераза (АлАт) в крови и его роль в обменных механизмах

АлАт это фермент, который в наибольшем количестве вырабатывается в печени и в меньшем – в почках, поджелудочной железе, миокарде и в скелетных мышцах. При повреждении перечисленных органов в крови наблюдается повышение уровня АлАт. В здоровом организме фермент содержится в плазме в незначительном количестве.

Энзимодиагностика

Анализ на содержание АлАт (АЛТ, GPT) помогает при диагностике заболеваний печени, поджелудочной железы и желчевыводящих протоков, болезней сердечной мышцы и скелетной мускулатуры.

Также врач может дать направление на сдачу крови на анализ АлАт, если он хочет выяснить степень повреждения печени при гепатите, влияние лекарственных препаратов или других токсичных веществ на состояние этого органа.

Обязательным для прохождения данный тест является для доноров крови.

Энзимодиагностика

Аланинаминотрансфераза (АлАт) в крови и его роль в обменных механизмах

Показания для проведения анализа

- общая слабость;
- потеря аппетита;
- тошнота или рвота;
- пожелтение кожи и белков глаз;
- потемнение мочи;
- светлый цвет кала;
- вздутие и боли живота.

Зачастую совместно с анализом на активность Аланинаминотрансферазы (АлАт) назначают исследование на активность (количество, концентрацию) аспартатаминотрансферазы (АсАт).

Оба этих фермента помогают в диагностике заболеваний печени и сердца, но особое значение имеет их активность относительно друг друга.

Соотношение активностей АлАт/АсАт называется коэффициентом де Ритиса.

Его значение в норме составляет 0,91–1,75.

Расчет коэффициента целесообразен только при выходе АлАт и/или АсАт за пределы референсных (нормальных) значений.

Коэффициент ниже 1 говорит о поражении клеток печени (гепатоцитов), а выше 2 – о сердечно-сосудистом заболевании, возможно, об инфаркте миокарда.

Процедура сдачи крови на АлАт и АсАт одинаковая.