

Лекция № 5

Ферменты.
Структура и функция.
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:



- **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

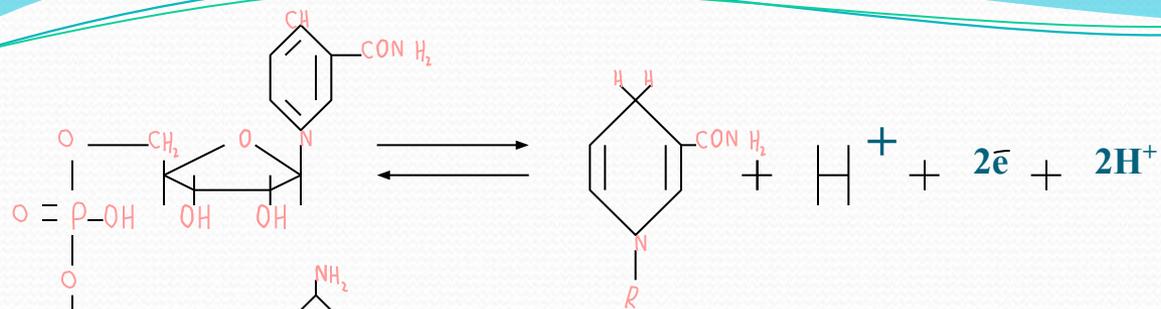
(Апофермент)

Кофермент (диссоциир.)

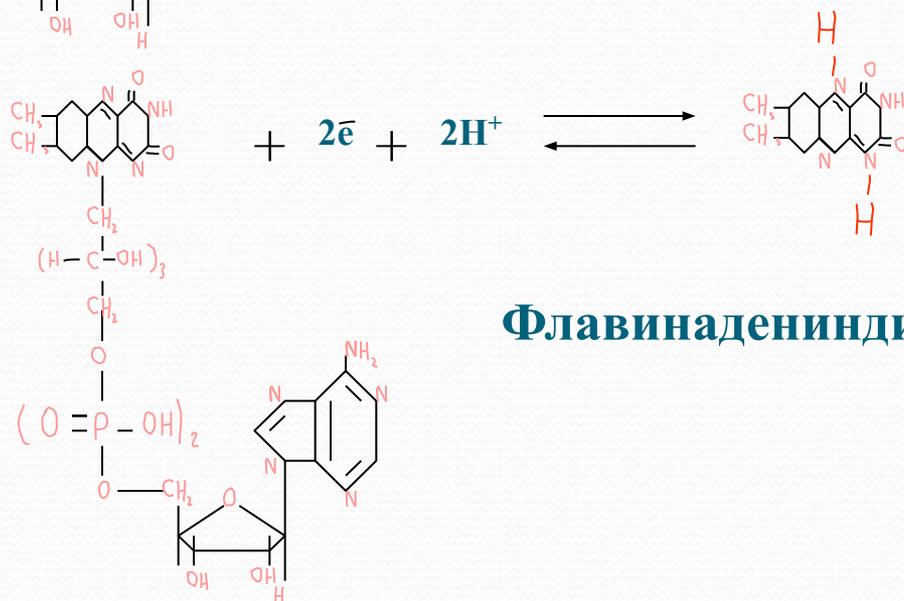
НАД, НАДФ, Me^{++}

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

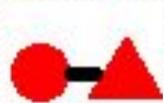


Механизм действия ферментов [по А. Кантарову, Б. Шепартцу]

Субстрат (S)

Апофермент

Кофермент



+



+



P 2

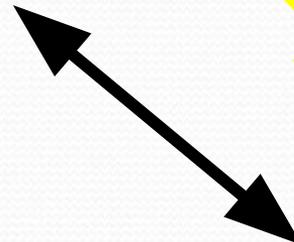


+



P 1

+



**АКТИВНЫЙ
КОМПЛЕКС**

3. Функциональные участки молекулы фермента

Mr уреазы = 480 000, а мочевины – 60.

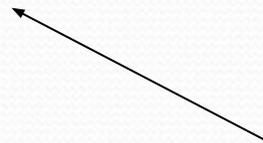


Фермент взаимодействует с субстратом лишь частью молекулы – **АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ**.

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.

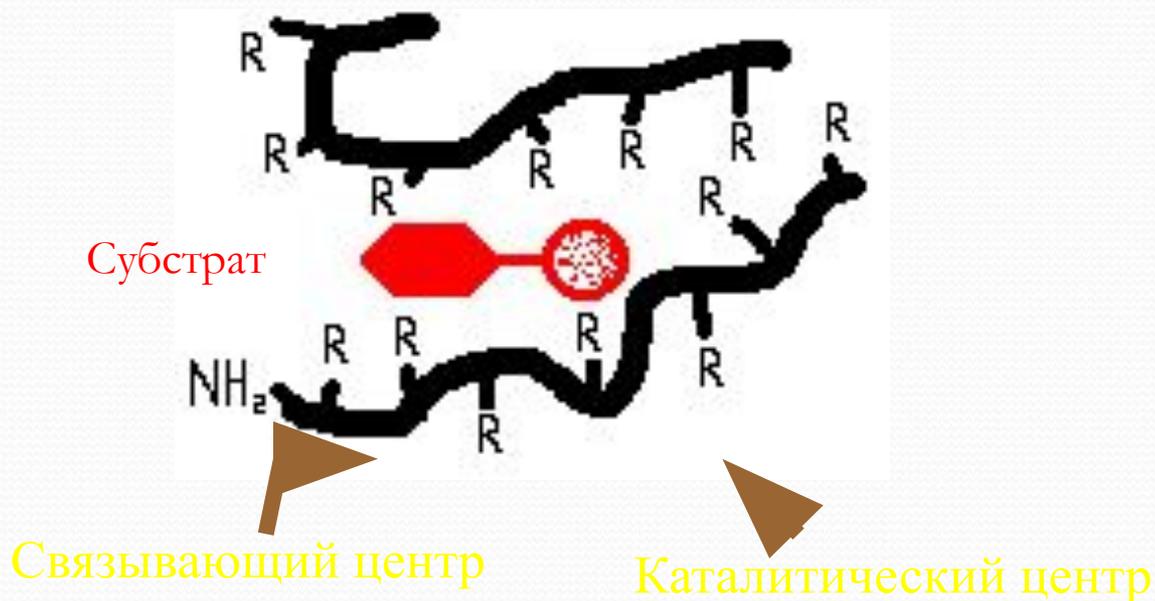
● У *простых* ферментов в образовании активного центра принимают участие следующие **R** аминокислот:

- NH₂ – лиз, арг.
- COOH - дикарбоновые к-ты.
- NH - гист.
- SH – цис.
- OH – сер, тир.

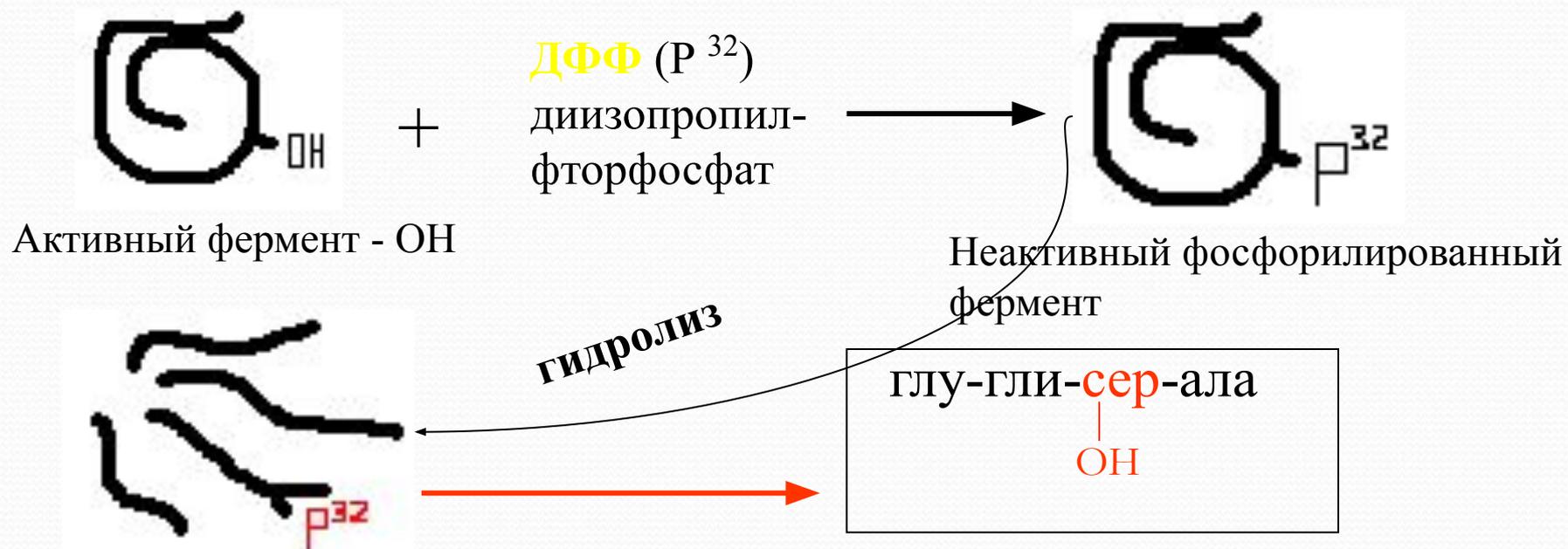
• У *сложных*:

+ **кофакторы**

• Активный центр фермента [схема по Малеру и Кордесу]:



Установление активного центра фермента:



Аминокислоты активного центра фермента:

- Серин (- OH)

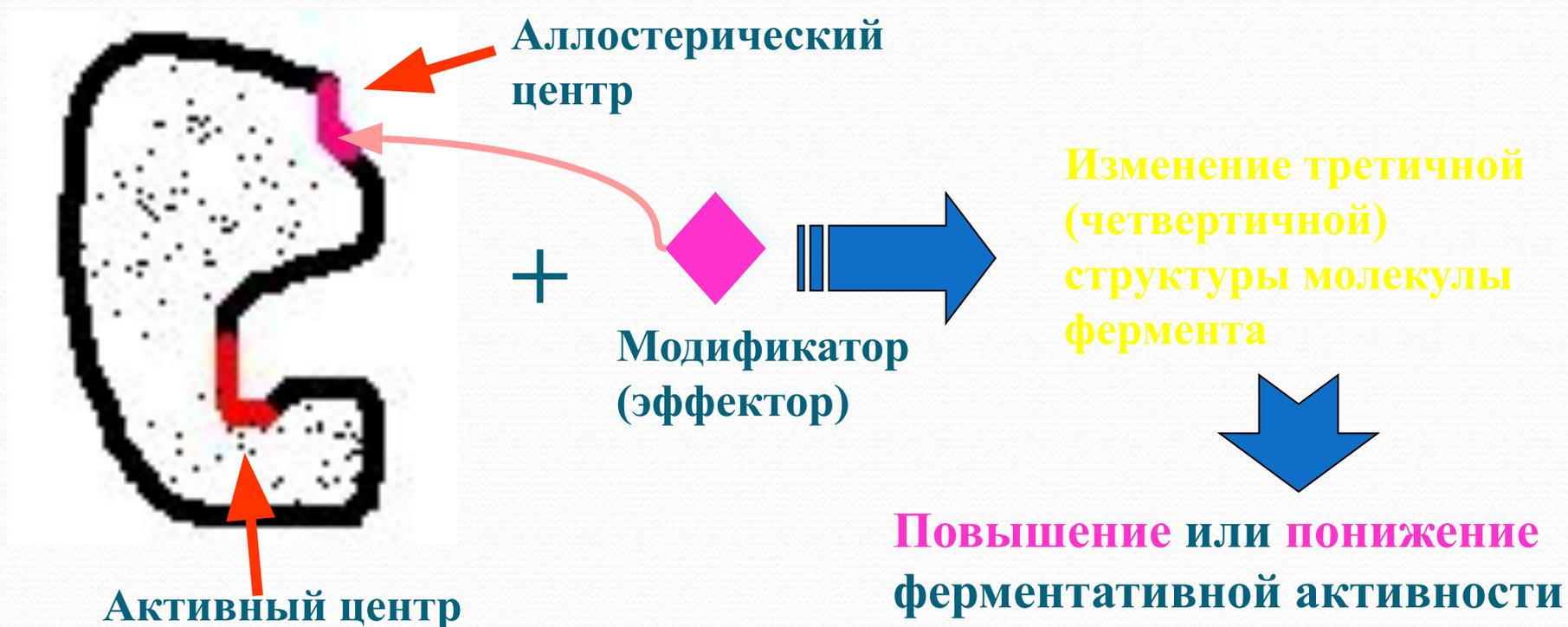
- Гистидин (- )

- 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-глу-сер-ала
Ацетилхолинэстераза	глу-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	глу-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.)



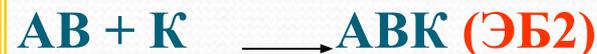
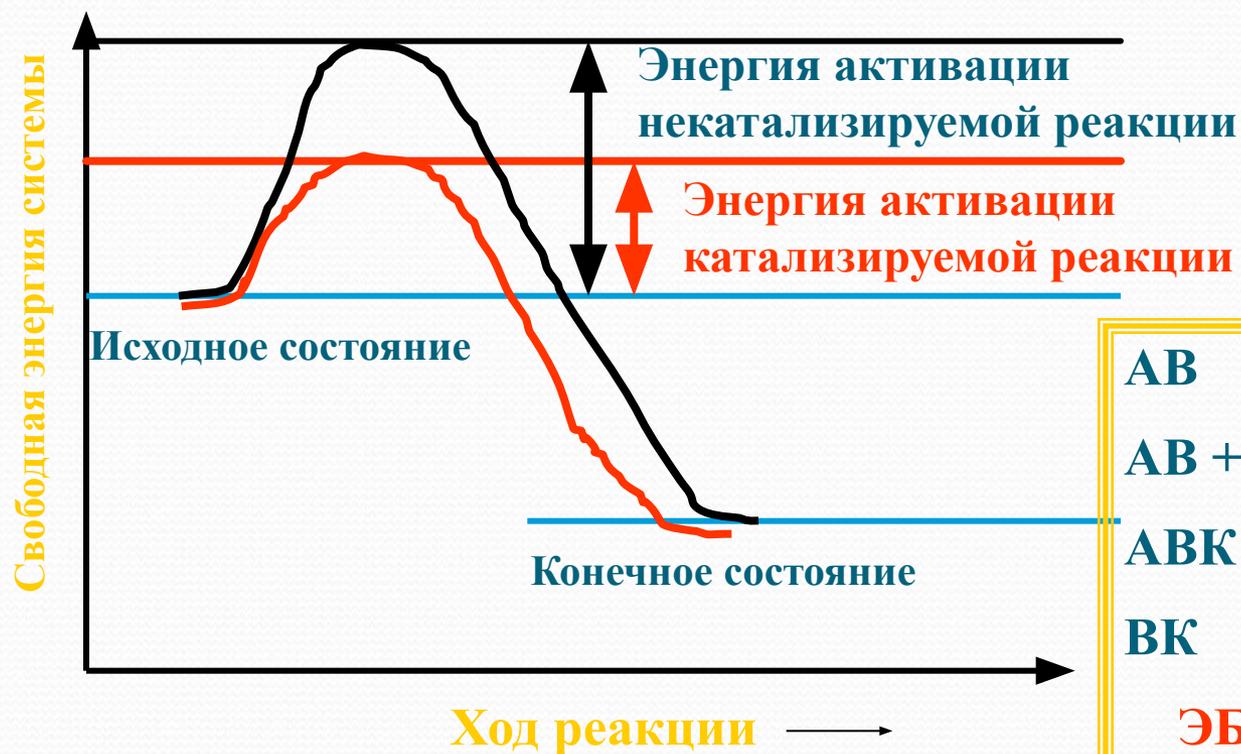
Участки в молекуле фермента:

- 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.

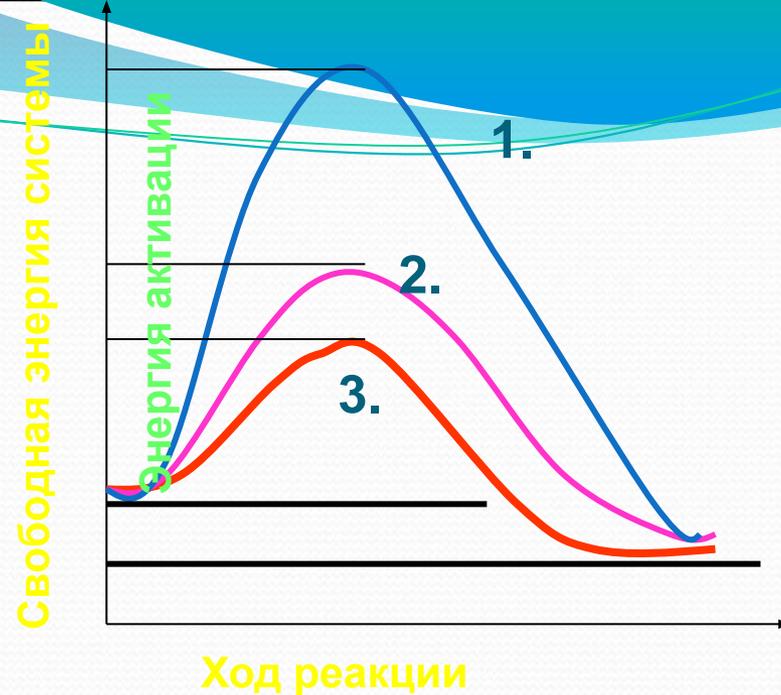
ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ - кол-во энергии, которое необходимо сообщить молекуле для преодоления ЭБР.



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.

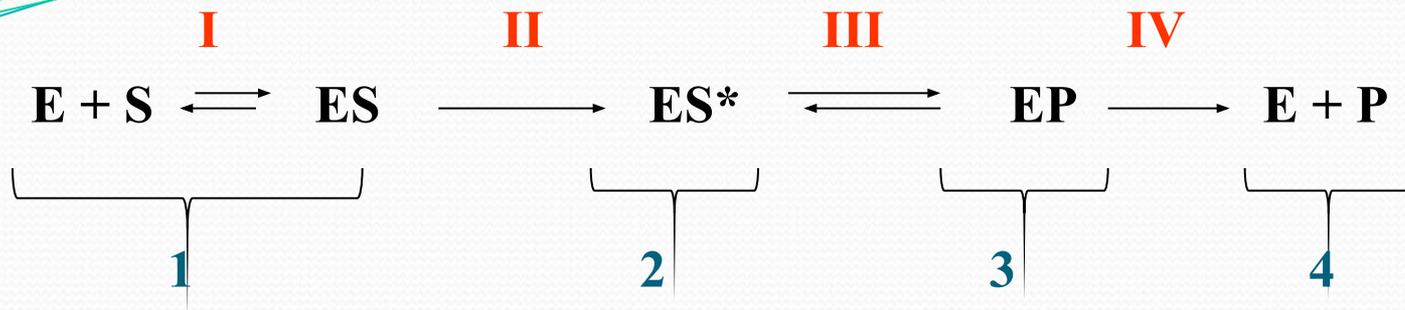
Общие черты ферментов и неорганических катализаторов

- 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 ($T=37^{\circ}$, $pH = 7,4$)
- 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.

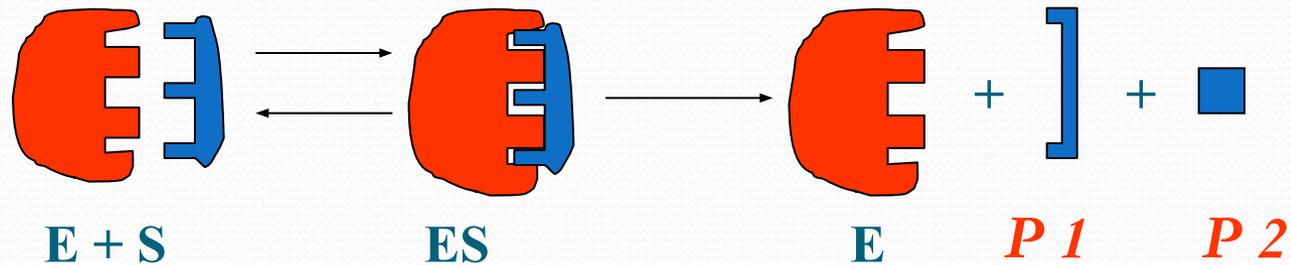
2 – Активация фермент – субстратного комплекса

3 – Образование продуктов реакции

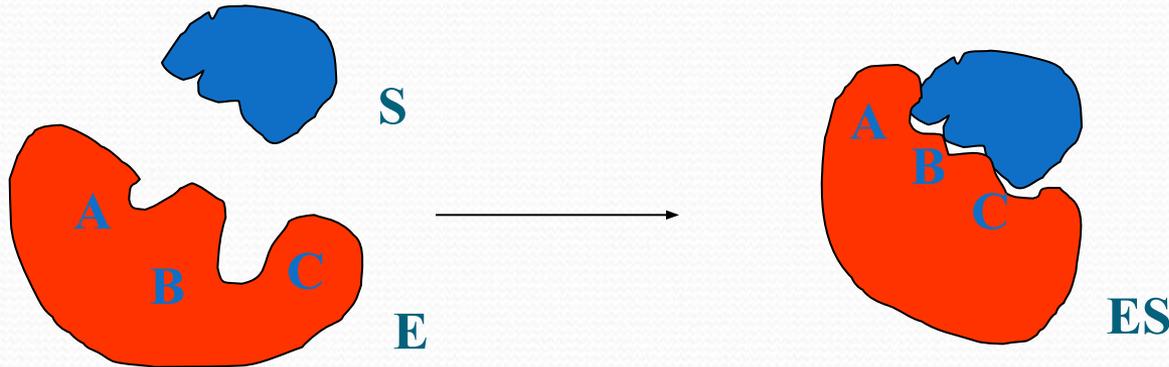
4 – Отделение продуктов реакции от фермент – субстратного комплекса

Взаимодействие субстрата с ферментом.

1. Модель «ключ – замок»

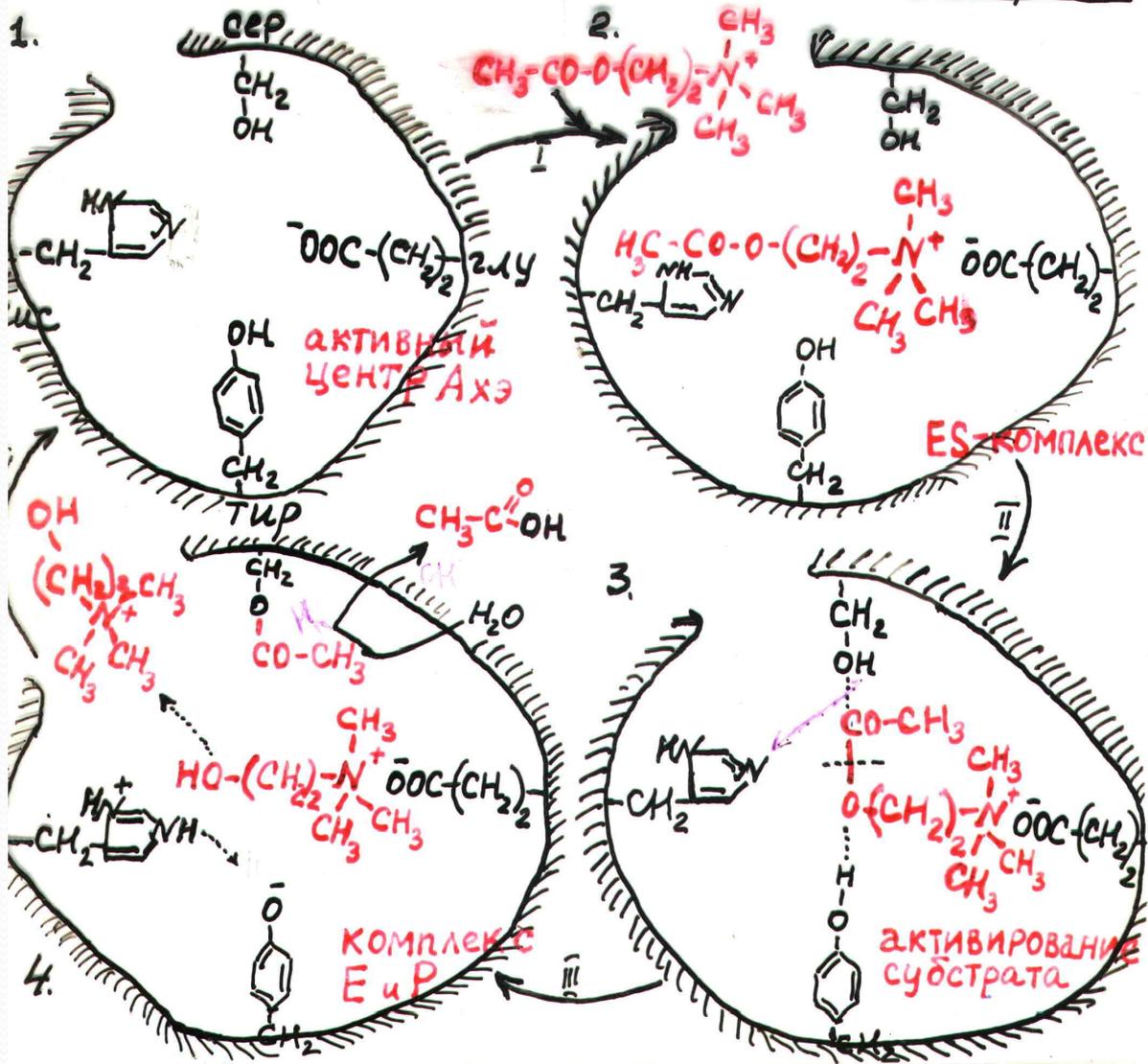


2. Модель индуцированного соответствия



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

Механизм действия ацetylхолинэстеразы



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)

На собрании V Международного биохимического союза, прошедшем в Москве в 1961 году, была принята современная классификация ферментов. Данная классификация подразумевает их деление на классы, в зависимости от типа реакции, в которой энзим выступает катализатором. Кроме того, каждый класс ферментов делится на подклассы. Для их обозначения используется код из четырех чисел, разделенных точками:

- первое число обозначает механизм реакции, в которой фермент выступает катализатором;
- второе число указывает на подкласс, к которому принадлежит данный энзим;
- третье число – подкласс описываемого фермента;
- и четвертое – порядковый номер энзима в подклассе, к которому он принадлежит.

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	Тирозинаминотранс фераза	L-тирозин + 2 – оксо- глутарат = 4 – оксифе- нилпируват + L - глутамат	L – тирозин: 2 – оксо- глутарат аминотрансфераза

Ферменты человека и наследственные заболевания

Многие заболевания развиваются на фоне энзимопатий – нарушений функций ферментов. Выделяют первичные и вторичные энзимопатии. Первичные нарушения являются наследственными, вторичные – приобретенными. Наследственные энзимопатии относят, как правило, к метаболическим заболеваниям. Наследование генетических дефектов или снижения активности ферментов происходит преимущественно по аутосомно-рецессивному типу. К примеру, такое заболевание как фенилкетонурия является следствием дефекта такого фермента как фенилаланин-4-монооксигеназа. Данный фермент в норме отвечает за преобразование фенилаланина в тирозин. В результате нарушений функций фермента происходит накопление аномальных метаболитов фенилаланина, являющихся токсичными для организма.

Пищеварительные ферменты



Процесс переработки пищи в организме человека происходит с участием различных пищеварительных ферментов. В процессе переваривания пищи все вещества расщепляются до небольших молекул, ведь исключительно низкомолекулярные соединения способны проникать сквозь стенку кишечника и всасываться в кровоток. Особая роль в данном процессе отводится ферментам, расщепляющим белки до аминокислот, жиров до глицерина и жирных кислот, а крахмала до сахаров. Расщепление белков обеспечивается действием фермента пепсина, содержащегося в основном органе пищеварительной системы – желудке. Часть пищеварительных ферментов вырабатывается в кишечник поджелудочной железой. В частности к ним относится:

трипсин и химотрипсин,
основным предназначением
которых выступает гидролиз
белков;
амилаза – ферменты,
расщепляющие жиры;
липаза – пищеварительные
ферменты, расщепляющие
крахмал.

Ферменты поджелудочной железы Поджелудочная железа является органом смешанной секреции, то есть выполняет и эндо- и экзогенные функции. Поджелудочная железа, как упоминалось выше, вырабатывает ряд ферментов, которые активируются под воздействием желчи, поступающей вместе с энзимами в органы пищеварения. Ферменты поджелудочной железы отвечают за расщепление жиров, белков и углеводов на простые молекулы, способные проникать сквозь клеточную мембрану в кровоток. Таким образом, благодаря ферментам поджелудочной железы происходит полное усвоение полезных веществ, поступающих в организм вместе с пищей. Рассмотрим подробнее действие энзимов, синтезируемых клетками данного органа ЖКТ:

Амилаза вместе с такими энзимами тонкого кишечника, как мальтаза, инвертаза и лактаза обеспечивают процесс расщепления сложных углеводов; **25 — 125 Ед/л**

Протеазы, иначе именуемые протеолитическими ферментами в организме человека, представлены трипсином, карбоксипептидазой и эластазой и отвечают за расщепление белков;

Нуклеазы — ферменты поджелудочной железы, представленные дезоксирибонуклеазой и рибонуклеазой, воздействующими на аминокислоты РНК, ДНК;

Липаза — фермент поджелудочной железы, отвечающий за преобразование жиров в жирные кислоты. **13-60Ед/мл**

Также поджелудочной железой синтезируется фосфолипаза, эстераза и щелочная фосфатаза. Наиболее опасными в активном виде являются протеолитические ферменты, вырабатываемые органом. Если процесс их выработки и выделения в другие органы пищеварительной системы нарушается, энзимы активируются непосредственно в поджелудочной железе, что приводит к развитию острого панкреатита и сопутствующих ему осложнений. Ингибиторами протеолитических энзимов, позволяющими затормозить их действие, являются панкреатический полипептид и глюкагон, соматостатин, пептид YY, энкефалин и панкреастатин. Перечисленные ингибиторы способны затормозить выработку панкреатических энзимов путем воздействия на активные элементы пищеварительной системы.



Важную роль в переваривании пищи в тонкой кишке играет желчь, поступающая в двенадцатиперстную кишку в процессе пищеварения. В составе самой желчи ферменты отсутствуют, но при этом данная биологическая жидкость усиливает действие энзимов. Наиболее значимой желчь оказывается для расщепления жиров, превращая их в эмульсию. Такой эмульгированный жир намного быстрее расщепляется под воздействием ферментов. Жирные кислоты, взаимодействуя с желчными кислотами, преобразуются в легкорастворимые соединения. Кроме того, выделение желчи стимулирует перистальтику кишечника и выработку пищеварительного сока поджелудочной железой.



Liver Function Test

Огромным значением для протекания различных биохимических процессов в организме обладают ферменты печени. Функции белковых молекул, вырабатываемых данным органом, настолько многочисленны и многообразны, что все ферменты печени принято делить на три основные группы: Секреторные энзимы, предназначенные для регуляции процесса свертывания крови. К ним относятся холинэстераза и протромбиназа. Индикаторные ферменты печени, включающие аспартатаминотрансферазу, обозначаемую аббревиатурой АСТ, аланинаминотрасферазу с соответственным обозначением АЛТ и лактатдегидрогеназу – ЛДГ. Перечисленные энзимы сигнализируют о поражениях тканей органа, при которых разрушаются гепатоциты, «выходят» из клеток печени и поступают в кровоток; Экскреторные энзимы вырабатываются печенью и покидают пределы органа с потом желчи. К таким энзимам относится щелочная фосфатаза. При нарушениях оттока желчи из органа уровень щелочной фосфатазы растет.

Дополнительные исследования активности ферментов печени используются, как правило, для дифференциальной диагностики. Для этого может проводиться анализ на ЛДГ, ГГТ и ГлДГ: Нормой активности лактатдегидрогеназы является показатель, колеблющийся в пределах 140-350 Ед/л. Повышенные показатели ГлДГ могут являться признаком дистрофических поражений органа, тяжелых интоксикаций, заболеваний инфекционной природы или онкологии. Максимально допустимым показателем такого фермента для представительниц женского пола является 3,0 Ед/л, а для мужчин – 4, 0 Ед/л. Нормой активности фермента ГГТ для мужчин является показатель до 55 Ед/л, для женщин – до 38 Ед/л. Отклонения от указанной нормы могут свидетельствовать о развитии диабета, а также болезней желчевыводящих путей. В таком случае показатель активности фермента может увеличиваться в десятки раз. Кроме того, ГГТ в современной медицине применяется для определения алкогольных гепатозов.

Спасибо за внимание