

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ НАУКИ И КУЛЬТУРЫ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
КЫРГЫЗСКО-РОССИЙСКИЙ СЛАВЯНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Э.М.Кучук

**Молекулярные основы биохимических процессов
в организме**

Ферменты – биокатализаторы клеточного геноза

Часть I

Учебное пособие

Издательство КРСУ
Бишкек 2003г.

УДК 571.1

К 88

Э.М.Кучук

Молекулярные основы биохимических процессов в организме (ферменты-биокатализаторы клеточного генеза).

Часть I Учебное пособие. Кыргызско-Российский Славянский Университет. Издательство КРСУ. Бишкек 2003г. 38 стр.

В учебном пособии дано системное изложение современных положений о структуре, свойствах, молекулярной организации биокатализаторов клеточных структур. Детально рассмотрены механизмы действия ферментов, кинетика ферментативных реакций, влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативных реакций, регуляции активности ферментов в клеточных компартментах и вне клетки, энзимодиагностика и применение ферментов в медицине.

Рецензенты: д.м.н. проф. Р.Р.Тухватшин
д.б.н. проф. В.Н.Кобзарь

Печатается по решению кафедры специальных естественно-научных дисциплин и РИСО КРСУ.

КРСУ 2003г.

Предисловие

В каждой клетке организма одновременно протекают многие тысячи взаимосвязанных химических превращений веществ, однако в клетках нет того колоссального беспорядка, который мог бы возникнуть при взаимодействии большого количества разнообразных субстратов.

Ряд факторов обуславливает строгий порядок направленности, согласованности и скорости биохимических реакций в клетках организма. Наиважнейшим из них является организация биохимических процессов – пространственная разобщённость биохимических реакций в различных клеточных структурах (компартаментах): ядре, митохондриях, лизосомах, цитозоле, рибосомах и других. Ферменты – важнейшие компоненты этих клеточных структур теснейшим образом связаны с разнообразными процессами жизнедеятельности. Практически все биохимические реакции катализируются ферментами, организованных в обособленные ферментные ансамбли, расположенных в мембранных структурах клеток. Через ферментативный аппарат, регуляцию его активности происходит и регуляция скорости метаболических реакций и их направленности. Многие болезни (врождённые нарушения обмена веществ) определяются генетически обусловленными нарушениями в синтезе ферментов.

Действие многих лекарственных веществ, ядов, токсинов обусловлено их активирующим или ингибирующим действием на ферментативную активность.

При повреждении клеток некоторые ферменты попадают в плазму крови. Определение активности ферментов используется в современной медицине для диагностики заболеваний и контроля за результатом лечения. Многие ферменты применяются в терапии ряда заболеваний. Энзимодиагностика, энзимотерапия, энзиматический контроль лечения взяты на вооружение современной медициной.

Раздел: Молекулярные основы жизнедеятельности и патологии.

Тема: Ферменты: строение, свойства, механизм действия.

Целевые задачи:

1. Что такое ферменты? Их отличие от неорганических катализаторов.
2. Строение ферментов:
 - а) простые и сложные ферменты
 - б) кофакторы, простатические группы, коферменты, косубстраты
3. Активный центр фермента:
 - а) функциональные группы активного центра ферментов
 - б) факторы, влияющие на образование активного центра – контактного и каталитического участков
 - в) аллостерический (регуляторный) центр фермента
4. Механизм действия фермента
 - а) образование фермент-субстратного комплекса. Гипотеза "индуцированного" или "вынужденного" соответствия Д. Кошланда
 - б) энергетический барьер реакции, энергия активации
 - в) механизмы расщепления ацетилхолина холинэстеразой и пептидов карбоксипептидазой А.

Ферментативный катализ как механизм биологической регуляции.

Тайна жизни и многообразие ее проявлений заключается в непрерывных химических превращениях веществ, входящих в состав живой материи. Сложная совокупность химических реакций, которые используются живыми организмами для осуществления многих тысяч взаимосвязанных химических превращений веществ в клетке, управляется, направляется и ускоряется высокоспециализированными биомолекулами белковой природы – ферментами.

Ферменты – белки катализаторы, образующиеся в клетке, обеспечивают осуществление таких важнейших процессов жизнедеятельности, как реализация наследственной информации, образование и использование энергии макроэргов, синтез и распад биомолекул – компонентов клеточных и внеклеточных структур, взаимопревращение простых биомолекул и многие другие химические превращения веществ.

Химические реакции вне клетки сами по себе протекают медленно, так как очень немногие молекулы реагирующих веществ при температуре окружающей среды обладают тем минимумом кинетической энергии, достаточного для их взаимодействия.

Возможность протекания химических реакций определяется разницей между свободной энергией молекул исходных веществ и продуктов реакции. Если свободная энергия выше у исходных веществ, чем у продуктов реакции (т.е. ΔG отрицательна), то возможно самопроизвольное течение реакции (реакция экзергоническая). Обратное соотношение в показателях свободной энергии говорит об энергетической невозможности реакции (реакция эндергоническая). Но достаточно ввести в эту систему дополнительное количество энергии (например, повышение температуры среды) все большее число молекул исходных веществ приобретает тот минимум энергии, который способствует образованию комплекса, способного преодолеть энергетический барьер реакции.

Дополнительное количество энергии, которое необходимо сообщить молекулам вещества, чтобы они, преодолев энергетический барьер, вступали в реакцию, называется свободной энергией активации. Чем выше энергетический барьер реакции, тем выше энергия активации и тем медленнее протекает реакция.

Катализатор не влияет на изменение свободной энергии молекул исходных веществ и продуктов реакции, он снижает высоту энергетического барьера реакции, т.е. понижает энергию активации, что увеличивает долю реакционно-способных молекул и, следовательно, скорость реакции. Катализатор, вступая в реакцию с субстратом, по завершении реакции регенерирует, т.е. возвращается в свою исходную форму. Благодаря этому биокатализатор может вновь и вновь участвовать в реакции, что обеспечивает высокую активность ферментов при очень низких концентрациях. Энергия образования фермент-субстратного комплекса ниже, чем энергия образования промежуточных активированных продуктов в некатализируемой реакции, а поэтому большее число молекул может вступать в реакцию при данной температуре.

Биологический катализ, осуществляемый ферментами-биокатализаторами клеточного геноза, подчиняется тем же общим законам катализа, что и не ферментативный катализ. Однако ферментативный катализ отличается от других форм катализа главным образом более высокой эффективностью в снижении энергии активации (т.е. в преодолении энергетического барьера), *во-вторых* ферменты обладают уникальной способностью ускорять освобождение энергии органических соединений, а также синтез и использование химической энергии макроэргических соединений в реакциях катализа. В тоже время ускорение химических реакций лишь одна сторона катализа, другая его сторона связана с регуляцией метаболических процессов. Эта регуляция возможна благодаря тому, что ферменты, обладая высокой субстратной специфичностью, образуют с другими белками мембран клеток сопряжённые полифункциональные системы. Так, находясь в мембранных структурах пограничных компартментов в комплексе с пермеазами (белками – переносчиками), ферменты-изомеразы катализируют изомерные превращения молекул метаболитов. Трансмембранный перенос изомеров молекул субстрата в соответствующий компартмент клетки позволяет изменить направленность и скорость биохимических процессов. В этом и заключается секрет способности ферментов осуществлять тонкую регуляцию процессов протекающих в клетке.

Общие и специфические свойства ферментов.

Ферменты и небиологические катализаторы имеют ряд общих признаков:

1. Ферменты не могут возбудить реакции, противоречащих законам термодинамики, они катализируют только энергетически возможные реакции.
2. Ферменты не расходуются в процессе катализа, выходят из реакции в первоначальном регенерированном состоянии. Фермент в клетке работает до тех пор, пока по каким-либо причинам не разрушается.
3. Ферменты не смещают равновесие обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление.

От небиологических катализаторов ферменты отличаются рядом специфических свойств, что связано с особенностями их строения, отражающих их белковую природу:

1. Ферменты – катализаторы белковой природы, обладают высокой каталитической активностью благодаря "индуцированного" формирования активного центра ферментов в процессе многоточечного контакта фермента и субстрата. Скорость каталитической реакции при участии ферментов на несколько порядков выше, чем при участии химических катализаторов.

2. Обладая способностью улавливать очень малые различия в структуре субстрата, ферменты обладают высокой специфичностью, избирательностью действия на субстраты, что позволяет не только увеличивать скорость химических реакций, но и направлять обмен веществ в строгое русло, тогда как небиологические катализаторы (платина,

палладий и другие) используются в качестве катализаторов при самых разнообразных реакциях.

3. Ферменты являются катализаторами с регулируемой активностью. Это уникальное свойство ферментов позволяет изменять скорость реакций превращения веществ в организме в зависимости от условий среды (температура, pH среды, концентрации молекул субстрата и продуктов реакции, действия специфических активаторов и ингибиторов, осмотического давления, участия воды во многих реакциях, протекания реакций в водной среде).

4. Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству молекул фермента, что строго контролируется как на генетическом уровне путём регуляции синтеза, так и посредством действия внутриклеточных протеиназ, расщепляющих молекулы фермента.

Строение фермента.

По своей химической природе ферменты – белки и им присущи все особенности структурной организации и физико-химические свойства белков.

Являясь глобулярными белками, ферменты имеют следующие уровни молекулярной организации: первичную, вторичную, третичную, а для большинства природных ферментов присуща четвертичная структура. Молекула фермента четвертичной структуры состоит из нескольких протомеров (субъединиц).

В зависимости от химического состава ферменты делятся на *простые (протеины)* и *сложные (протеиды)*.

Простые ферменты при гидролизе распадаются исключительно на аминокислоты. Большинство природных ферментов относятся к классу *сложных белков*, содержащих помимо полипептидных цепей (апофермента) небелковый компонент (кофактор).

Кофакторы – это различные термостабильные соединения – порфириновые циклы, витамины, нуклеотиды, пигменты геминовой природы, а также ионы металлов. Кофакторы в молекулах сложных ферментов различаются по прочности связи с полипептидной цепью. Соединение белковой части с небелковой может осуществляться за счёт ионных и водородных связей, гидрофобных взаимодействий, реже – с помощью ковалентных связей.

При низкой константе диссоциации сложного фермента все полипептидные цепи оказываются связанными со своими кофакторами и не разделяются при выделении и очистке. Такой сложный фермент называется холоферментом (холоэнзим), а кофактор – протетической группой, которая рассматривается как интегральная часть молекулы фермента. В молекулах ряда ферментов химические связи между полипептидными цепями и коферментами могут быть относительно слабыми (водородные, электростатические и гидрофобные взаимодействия), что ведёт к полной диссоциации молекул сложного фермента. Свободный белковый компонент теряет ферментативную активность, пока извне не будет добавлен недостающий кофактор. Низкомолекулярные небелковые органические факторы, легко отделяющиеся от апофермента по окончании каталитической реакции или присоединяющиеся к нему в ходе реакции, называются коферментами. Однако разницу между протетической группой и коферментом нельзя абсолютизировать, поскольку в одних случаях, например, у оксидазы Д-аминокислот, кофактор ФАД может быть легко отделён от белковой части путём диализа. Тот же кофактор ФАД прочно связан ковалентно с ферментом тканевого дыхания (сукцинат-дегидрогеназа), выполняя функции протетической группы.

Функциями коферментов и протетических групп являются:

1. участие в акте катализа,
2. осуществление контакта между ферментом и субстратом,
3. стабилизация апофермента.

Апофермент, в свою очередь усиливает каталитическую активность небелковой части и, кроме того, определяет специфичность действия ферментов, поскольку одна и та же по химизму небелковая часть может функционировать в составе различных ферментов. Например, НАД⁺ является коферментом многих дегидрогеназ-ЛДГ (лактатдегидрогеназы), МДГ (малатдегидрогеназы) и др. Ферменты отличаются апоферментной белковой частью молекулы, а в некоторых случаях имеет место наличие изомеров коферментов.

Известен ряд коферментов, которые активно включаются в химические реакции, выполняя функции промежуточных переносчиков электронов, атомов водорода, различных функциональных групп: аминных, ацетильных, карбоксильных и др.

В подобных случаях кофермент рассматривается в качестве второго субстрата, или косубстрата: S-аделозилметионин, ацетил-S-КоА, пиридоксальфосфатамин, витамин С, НАДФН₂, глутатион и др.

Активный центр ферментов.

1. Активный центр – это небольшая часть молекулы фермента.

Ферментативный катализ осуществляется в процессе контакта между ферментом и субстратом. Образованию или расщеплению химических связей каким-либо ферментом предшествует формирование фермент-субстратного комплекса. При этом субстрат присоединяется к специфическому участку на ферменте. В большинстве ферментативных реакций участвуют субстраты, молекулы которых достаточно малы по сравнению с молекулами самих ферментов. Поэтому естественно образование фермент-субстратного комплекса обеспечивается комплиментарным взаимодействием ограниченного числа аминокислот полипептидной цепи фермента с определенными группами атомов субстрата.

Та небольшая часть молекулы фермента, обеспечивающая связывание и превращение субстрата называется активным центром. Активный центр фермента образуется определёнными боковыми радикалами аминокислотных остатков полипептидной цепи, обеспечивающих непосредственное взаимодействие фермента с молекулой субстрата и прямое участие в реакции катализа. К таким функциональным группам относятся:

1. - OH группы серина и треонина
2. - SH группы цистеина и дисульфидные цистина
3. - COOH группы дикарбоновых кислот и концевая карбоксильная группа полипептидной цепи
4. - NH₂ группа лизина и концевая аминогруппа полипептидной цепи
5. - имидозольные группы гистидина
6. - гуанидиновые группы аргинина
7. - индольные группы триптофана
8. - S-CH₃ (тиозфирные) группы метионина
9. - фенольные группы тирозина
10. - гидрофобные цепи алифатических аминокислот и ароматическое кольцо фенилаланина

У сложных ферментов в состав активного центра входят также небелковые группировки (кофакторы).

Число активных центров в олигомерных (имеющих четвертичную структуру) ферментах может быть равно числу субъединиц – по одному центру на протомер. Иногда две субъединицы фермента участвуют в образовании одного функционально-способного активного центра.

2. Активный центр – сложная трехмерная структура.

Функционально-активный центр условно подразделён на связывающую (контактную) зону, где функциональные группировки, образованные радикалами

аминокислот образующих активный центр, обеспечивают связывание субстрата в *контактном участке и каталитическую зону*, принимающую непосредственное участие в химической реакции превращения субстрата.

Активный центр, расположенный в углублении на поверхности молекулы фермента, образуется из 12-14 аминокислотных остатков, находящихся в различных местах полипептидной цепи фермента, но которые в процессе пространственной укладки сближаются и образуют зоны активного центра, имеющие сложные трехмерные структуры.

Щелевидная форма активного центра создает микроокружение, куда нет доступа воде, за исключением тех случаев, когда вода является одним из реагирующих веществ.

Микросреда активного центра, в котором отдельные полярные остатки приобретают особые свойства существенно важные для катализа, отличается от остального окружения фермента более низкой диэлектрической проницаемостью, приближающейся к таковой для некоторых органических растворителей. Среда с пониженной диэлектрической проницаемостью является более благоприятной по сравнению с водной для протекания реакций с переносом заряда, которые характерны для работы большого числа ферментов. Помимо этого, микросреда активного центра характеризуется повышенной вязкостью, что ограничивает свободу вращательного движения группировок активного центра.

Аминокислотные остатки полипептидной цепи, не входящие непосредственно в состав активного центра фермента, обеспечивают правильную пространственную ориентацию аминокислот активного центра и влияют на реакционную способность его групп, тем самым способствуют катализу, фиксируя группировки каталитической зоны в активном состоянии. Активный центр сложных (двухкомпонентных) ферментов формируется путем присоединения небелкового кофактора к апоферменту в процессе последующего взаимодействия с субстратом.

3. Активный центр формируется в ходе специфического связывания субстрата ферментом и образования фермент-субстратного комплекса.

Согласно гипотезе "ключ к замку" Э.Фишера (1890г) фермент существует в относительно жесткой конформации и субстрат входит в активный центр, только если он соответствует ему по форме. С помощью этой гипотезы объяснимо представление о стереоспецифичности катализа, ибо ясно, что жесткость шаблона "ключ-замок" должна обусловить пространственное затруднение для молекул, отличающихся по своей структуре от нормального субстрата данного фермента. Однако данные многочисленных исследований показывают, что активные центры многих ферментов не являются жесткой структурой, их форма модифицируется при связывании субстрата. В этих ферментах форма активного центра становится комплементарной форме субстрата в процессе динамического индуцированного соответствия только после связывания с молекулой субстрата (теория индуцированного соответствия К. Кошланда 1963 г).

Эта теория основывается на трех постулатах:

1. присоединение субстрата к активному центру вызывает значительные изменения в геометрии белка-фермента
2. для действия фермента необходима точная ориентация каталитических групп.
3. субстрат индуцирует эту требуемую ориентацию, изменяя геометрию белка.

Согласно модели индуцированного соответствия Кошланда, активный центр фермента формируется в процессе взаимодействия субстрата с аминокислотными остатками и другими группами фермента, которые принимают пространственную ориентацию необходимую для связывания субстрата и катализа. В отсутствие субстрата каталитические и субстратсвязывающие группы находятся друг от друга на расстоянии в несколько раз превышающем длину связи. Субстрат путём образования специфических связей (гидрофобных, ионных, водородных и др.), то есть установления электронного или химического соответствия с субстратсвязывающими группами фермента, индуцирует в

нем конформационные изменения, в результате которых соответствующие группы занимают положения, необходимые для образования фермент-субстратного комплекса и катализа.

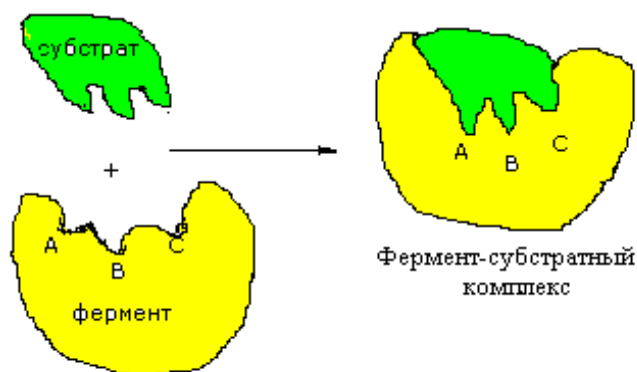


Рис.1 Взаимодействие субстрата с ферментом согласно модели индуцированного соответствия.

Аллостерический (регуляторный) центр фермента.

Ферменты не только ускоряют реакции, в которых участвуют органические соединения, с их помощью осуществляется так же регуляция биохимических процессов в клетке.

Активность многих ферментов может быть усилена или подавлена под действием некоторых низкомолекулярных веществ - эффекторов, обычно представляющих собой промежуточные продукты метаболических процессов, в которых участвуют эти ферменты, а также гормонами, ионами металлов или кофакторами регулируемого фермента. Однако действие этих низкомолекулярных веществ на ферментативную активность не является конкурентным с молекулой субстрата за связывание с активным центром, что подтверждается экспериментальными данными (Герхард и Шахман) о наличии в молекулах многих ферментов, пространственно разделённых с активным центром одного или более центров регуляции активности ферментов, названных аллостерическими (термин "аллостерия" от греч. "аллос"- иной. Мано, Шанже и Жакоб, 1963 г.) Аллостерические ферменты построены, как правило, из двух или более субъединиц различающихся наличием каталитического, либо регуляторного центра.

Присоединение низкомолекулярного эффектора, или модулятора (аллостерического активатора или ингибитора) к аллостерическому центру изменяет третичную (часто и четвертичную) структуру молекулы фермента и собственно конфигурацию активного центра, и каталитическую активность фермента.

Распределение ферментов в клетках организма, полиферментные системы.

Каждая клетка организма имеет свой специфический набор ферментов. Многие ферменты присутствуют практически во всех клетках. Это ферменты, которые участвуют в энергетическом обеспечении клетки (ферменты гликолиза – ЦТК, тканевого дыхания), в синтезе нуклеиновых кислот и белков, организации клеточных мембран, органелл. С

другой стороны клетки, выполняющие специализированные функции, различаются по ферментному составу. Так гепатоциты содержат ферменты орнитинового цикла мочевинообразования, клетки пучковой зоны коры надпочечников – ферменты синтеза глюкокортикоидов, клетки клубочковой зоны – ферменты синтеза минералокортикоидов, клетки сетчатой зоны – ферменты синтеза андрогенов. Некоторые ферменты обнаруживаются только в одном-двух органах (органоспецифические ферменты): так урокиназа есть только в печени, гистидаза – в печени и коже, кислая фосфатаза – преимущественно в предстательной железе.

Кардинальное значение имеет пространственное расположение и клеточная компартментация ферментов. Как правило, ферменты содержатся и действуют в строго определённых органеллах клетки. Внутриклеточная локализация ферментов непосредственно связана с той функцией, которую выполняет данная органелла, компартмент. Например, ферменты гликолиза содержатся в цитоплазме, ферменты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), окислительного декарбоксилирования пирувата, β -окисления жирных кислот – в матриксе митохондрий.

Работа каждого фермента в компартменте не индивидуальна, а тесно связана с другими ферментами, участвующими в данном биохимическом процессе. Из отдельных ферментов формируются полиферментные системы, локализованные в определённых органеллах и осуществляющие определённый метаболический цикл, причём в полиферментной системе продукт реакции первого фермента служит субстратом для следующего и т.д.

Такая ассоциация отдельных ферментов в единый недиссоциирующий комплекс имеет определённый биологический смысл и ряд преимуществ. В частности при этом резко сокращаются расстояния при которых молекулы промежуточных продуктов реакции не должны перемещаться от фермента к ферменту, как это имеет место при действии изолированных ферментов.

Ряд таких мультиферментных комплексов, структурно связанных с какой-либо органеллой или биомембраной, составляют высокоорганизованные системы, обеспечивающие жизненно важные функции. Например, цикл трикарбоновых кислот \rightarrow ферменты дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования.

Множественные молекулярные формы ферментов. Изоферменты.

В клетках организма содержатся множественные молекулярные формы ферментов, отличающиеся по структуре и ряду физико-химических свойств, но выполняющих идентичную каталитическую функцию. Так известно большое число ферментов, представленных в организме несколькими молекулярными формами. Среди множественных молекулярных форм ферментов (ММФФ) есть как генетически детерминированные, их принято называть изоферментами или изозимами (отличаются друг от друга по первичной структуре), так и формы, возникающие в результате эпигенетических изменений (на постраскрипционном уровне).

Изоферменты – это молекулярные формы ферментов, возникающие вследствие генетических различий в первичной структуре белка. Следует подчеркнуть, что изоферменты, обладая почти одинаковой ферментативной активностью, различаются некоторыми физико-химическими свойствами, молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, отношением к активаторам и ингибиторам.

Приведём в качестве примера изоферментов лактатдегидрогеназу и креатинфосфокиназу. Лактатдегидрогеназа представляет собой тетрамер, в котором имеется разное сочетание протомеров двух типов - Н и М. Возможны пять комбинаций этих протомеров в тетрамерной молекуле: $H_4(LDG_1)$, $H_3M(LDG_5)$, $H_2M_2(LDG_3)$, $HM_3(LDG_4)$, $M_4(LDG_5)$

Для клеток каждой ткани характерен свой изоферментный спектр. Например в сердечной мышце преобладает изоформа $H_4(LDG_1)$, а в скелетных мышцах и печени – $H_4(LDG_5)$.

Известны три изоформы креатинфосфокиназы. Молекула креатинфосфокиназы построена из двух субъединиц, протомеров В и М. Креатинфосфокиназа I(ВВ) содержит две В-субъединицы и преобладает в нервной ткани, креатинфосфокиназа II(ВМ) – содержит В и М субъединицы и преобладает в кардиомиоцитах, в скелетных мышцах содержится креатинфосфокиназа III(ММ), которая состоит из двух М субъединиц.

Наличие множественных молекулярных форм ферментов в клетках организма одного биологического вида имеет определённое биологическое значение. Изоферменты играют регуляторную роль в обмене веществ, и позволяет метаболизму в разных тканях лучше приспособляться к действию внутренних и внешних факторов. Содержание отдельных изоферментов в разных клетках тканей и даже в отдельных органеллах клеток неодинаково, это позволяет изменять направление биохимических реакций в определённое русло.

Обладая разным сродством к субстратам и скоростью их превращения, изоферменты обеспечивают неодинаковую скорость протекания прямой и обратной реакций. Направление превращений определяет изофермент, преобладающий в данном компартменте клетки. Сдвиги в соотношении числа молекулярных форм фермента, активности каждой из форм и её стабильность является одним из механизмов регуляции обменных процессов. Различные молекулярные формы ферментов играют важную роль в процессе дифференцировки и развития клеток.

Специфичность ферментов как проявление конформационной и электростатической комплементарности между молекулами субстрата и фермента.

Индивидуальные особенности строения активных центров различных ферментов обуславливают специфичность их действия. Высокая специфичность – наиболее характерная черта, отличающая ферменты от неорганических катализаторов, что обусловлено конформационной и электростатической комплементарностью уникальной структуры активного центра фермента структуре субстрата, молекула которого должна обладать двумя основными структурными особенностями. Во-первых, молекула субстрата должна содержать специфическую химическую связь, которую фермент мог бы атаковать, и, во-вторых, в ней должна присутствовать та или иная функциональная группа, которая способна связываться с ферментом и ориентировать молекулу субстрата в активном центре катализатора таким образом, чтобы атакуемая связь субстрата была правильно расположена по отношению к каталитической группе фермента. Вследствие этого данный фермент, обладая способностью улавливать очень малые различия в структуре субстрата, из множества веществ, имеющих в компартменте клетки присоединяет только свой субстрат и катализирует не любое из всех возможных химических превращений субстрата, а какое-либо одно.

Различают *абсолютную и групповую специфичность ферментов.*

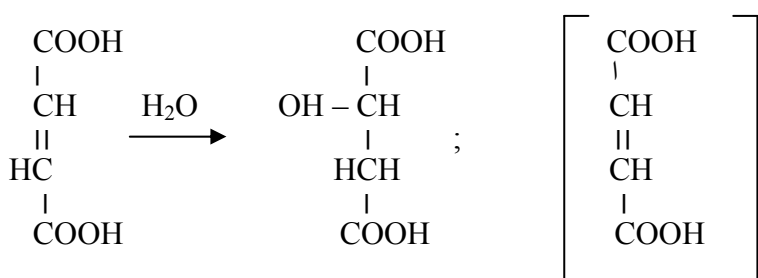
1. *Абсолютной субстратной специфичностью* обладают такие ферменты, которые катализируют превращение только одного субстрата. Так, уреазы используют в качестве субстрата только мочевины и не действуют даже на самые простые ее производные.

2. *Абсолютная групповая субстратная специфичность* – ферменты катализируют превращение определенных категорий соединений, подобно алкогольдегидрогеназе, действующей только на спирты:



Скорость ферментативной реакции зависит от природы всей молекулы субстрата в целом. Алкоголь-дегидрогеназа катализирует превращение не только этанола, но и другие более высокомолекулярные спирты с неразветвленной цепью (хотя и с разной эффективностью).

3. *Стереохимическая субстратная специфичность* – фермент катализирует превращение только одного из возможных изомеров субстрата. Так, фумаратгидратаза катализирует превращение только фумаровой кислоты, но не ее стереоизомера – малеиновую кислоту.



фумарат (транс-форма) малат малеат (цис-форм)

4. *Относительная групповая субстратная специфичность* – фермент действует на отдельные связи определённой группы субстратов. Например, протеолитические ферменты – трипсин, пепсин специфичны по отношению к пептидным связям, образованным определёнными аминокислотами в полипептидной цепи.

5. *Относительная субстратная специфичность* - фермент катализирует превращение субстратов, принадлежащих к разным группам химических соединений. Например, фермент цитохром P₄₅₀ участвует в гидроксировании разных соединений (около 7000 наименований). Эта наименее специфичная ферментативная система, участвующая в превращениях природных веществ, лекарств, ядов и продуктов распада веществ в организме.

Механизм действия ферментов.

Ферменты увеличивают скорость реакций, но не расходуются в ходе процесса и не претерпевают необратимых изменений; они не изменяют состояние равновесия химической реакции, ускоряя в равной степени как прямую, так и обратную реакцию. Фермент повышает скорость реакции, понижая энергию активации, тот энергетический барьер, который отделяет одно состояние системы от другого.

Благодаря образованию фермент-субстратного комплекса, фермент снижает энергию активации, изменяет путь, по которому протекает реакция, не влияя при этом на полное изменение свободной энергии, причем, вершина энергетического барьера соответствует переходному состоянию.

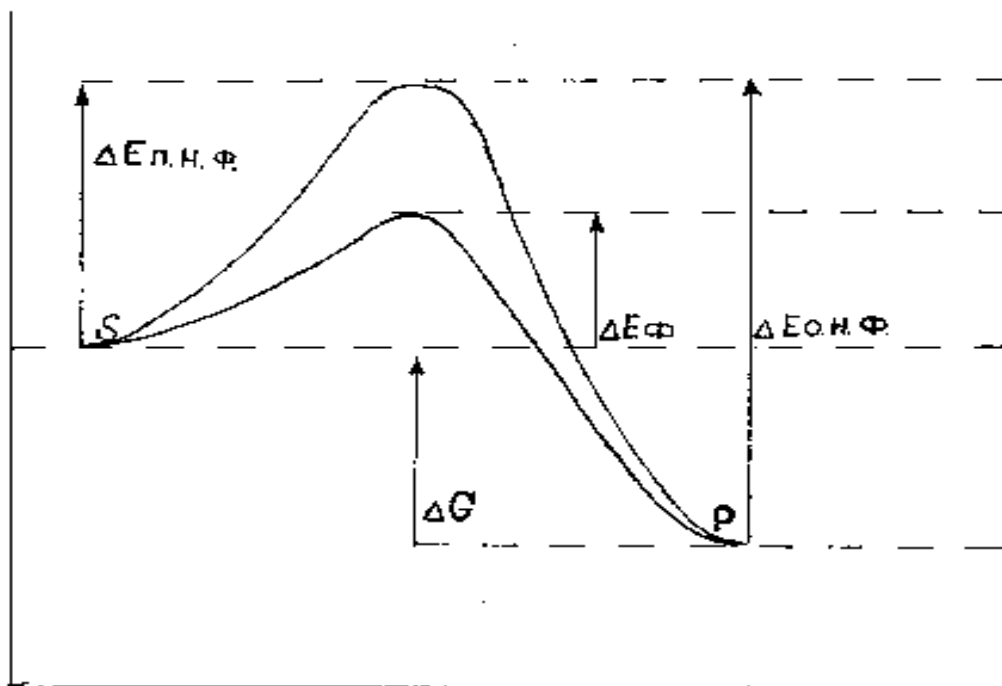


Рис.2 Энергетическая схема ферментативной и не ферментативной химических реакций.

S- исходный субстрат, **P-** продукт

Δ Eп.н.ф.- свободная энергия активации прямой неферментативной реакции

Δ Eо.н.ф.- свободная энергия активации обратной неферментативной реакции

Δ Eф- свободная энергия активации ферментативной реакции

Δ G- стандартное изменение свободной энергии

Большую роль в развитии представлений о механизме действия ферментов сыграли классические работы Михаэлиса и Ментен, согласно которым ферментативная реакция – это многоступенчатый процесс. При ферментативном катализе образованию продуктов реакции предшествует образование фермент-субстратного комплекса (E*S-комплекс), который через переходное состояние (E*S*-комплекс) преобразуется в комплекс фермент-продукт (E*P*), после чего происходит высвобождение продуктов реакции (P-продукт, E-фермент). В общем виде процесс ферментативного катализа представлен уравнением:



На первой стадии устанавливается индуцированное комплементарное соответствие между ферментом и субстратом. При этом вхождение субстрата в активный центр фермента вызывает конформационные изменения в ферменте, причем функциональные группы в молекуле фермента занимают положение оптимальное для протекания каталитической реакции (E*S – комплекс).

На второй стадии образования фермент-субстратного комплекса в переходном состоянии (E*S*- комплекс) происходит геометрическая и электронно-топографическая перестройка молекулы субстрата, вследствие чего в молекуле субстрата индуцируется напряжение разрываемых или образуемых связей.

На третьей стадии происходит освобождение продуктов реакции и регенерированного фермента.

Среди изученных механизмов действия ферментов можно отметить следующие:

1. Эффект сближения и ориентации

При образовании фермент-субстратного комплекса молекулы фермента и субстрата не только сближаются, но и определенным образом ориентируются относительно друг друга, обеспечивая взаимодействие узнающих групп связывающей зоны фермента и узнаваемых групп субстрата. Связывание фермента и субстрата многоточечное, что обуславливает степень специфичности действия фермента.

2. Эффект деформации и дестабилизации молекулы субстрата

В процессе взаимодействия фермента с субстратом индуцируется напряжение разрываемых связей в субстрате, происходит геометрическая и электронно-топографическая перестройка молекулы субстрата, разрываемые связи становятся менее стабильными, чем в свободном субстрате. Это обеспечивается разнообразием аминокислотных остатков белковой части фермента и групп кофакторов в активном центре. На превращающуюся химическую связь субстрата одновременно или в результате ряда последовательных атак воздействует несколько групп фермента. В результате происходит поляризация превращающейся связи, и затем ее разрыв.

3. **Кислотно-основной катализ** органических соединений может быть подразделен на три главных типа: *специфический кислотно-основной катализ, обобщенный кислотно-основной катализ и катализ льюисовскими кислотами и основаниями.*

Специфический кислотно-основной катализ, где каталитическая активность ферментов определяется способностью к увеличению концентрации свободных ионов H^+ (H_3O^+) или OH^- в реакционной среде, в биохимических реакциях встречаются редко. Значительно более существенную роль в реакциях, катализируемых большинством ферментов, играет обобщенный кислотно-основной катализ. Важное значение имеет тот факт, что молекулы ферментов содержат целый ряд функциональных групп (амино -, карбоксильные, сульфгидрильные, гидроксильные, имидозольные и др. группы), которые сами по себе способны функционировать в качестве обобщенных кислот и оснований.

Согласно Бренстеду обобщенные кислоты – это любые доноры протонов, а обобщенные основания – акцепторы протонов. В реакциях обобщенного кислотно-основного катализа фермент определенной стадии каталитического цикла сам выполняет роль акцептора или донора протонов. К реакциям кислотно-основного катализа относятся, в частности, реакции присоединения воды к карбонильным группам, реакции гидролиза эфиров карбоновых кислот и фосфорной кислоты, отщепление воды с образованием двойных связей, многие внутримолекулярные перегруппировки, всевозможные реакции замещения.

В ферментативном катализе важную роль выполняют льюисовские кислоты или основания. Наличие электрофильной группы – акцептора электронной пары (кислота Льюиса) или нуклеофильной группы – донора электронной пары (основание Льюиса) в каталитическом участке фермента вызывает перераспределение электронной плотности на участке субстрата, атакуемого кислотно-основными группами, что облегчает перестройку и разрыв связей в молекуле субстрата.

Примерами электрофильных групп могут служить ионы металлов - Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , а также – NH_3^+ группы белков. К нуклеофильным группам относятся имидозольная группа гистидина, гидроксильная группа серина, сульфгидрильная группа цистеина.

Кислотно-основной катализ характерен для гидролаз, изомераз, лиаз.

4. **Ковалентный катализ** характерен для ферментов, которые образуют неустойчивые ковалентные фермент-субстратные промежуточные соединения благодаря способности нуклеофильных групп фермента вступать в реакции нуклеофильного замещения. В ходе реакций нуклеофильного замещения нуклеофильная группа фермента становится на место замещенной группы, ранее связанной с участвующим в реакции атомом углерода субстрата; при этом между ферментом и оставшейся частью молекулы

субстрата возникает ковалентная связь, образовавшийся фермент-субстратный комплекс крайне неустойчив и легко распадается на продукты реакции.

Для большинства ферментов характерно сочетание описанных выше механизмов, что обеспечивает их высокую каталитическую активность.

В качестве примера рассмотрим один из известных механизмов катализа полипептида карбоксипептидазой А.

Протеолитический фермент поджелудочной железы карбоксипептидаза А гидролизует все С-концевые пептидные связи в полипептидах, за исключением тех случаев, когда С-концевыми аминокислотами являются лизин или аргинин или же когда предпоследней аминокислотой является пролин.

Молекула фермента, состоящая из одной полипептидной цепи содержащей 307 аминокислотных остатков, имеет эллипсоидную форму размером 50x42x38 Å.

Ферментативная активность фермента обусловлена наличием в активном центре остатка тирозина-248, аргинина-145, глутаминовой кислоты-270, иона цинка, расположенного в углублении близко к поверхности молекулы фермента, причём он образует координационные связи с боковыми цепями двух гистидинов(69 и 196), боковой цепью глутамата-72 и молекулой воды. В активном центре фермента имеется "гидрофобный карман"- углубление, содержащее гидрофобные радикалы аминокислот.

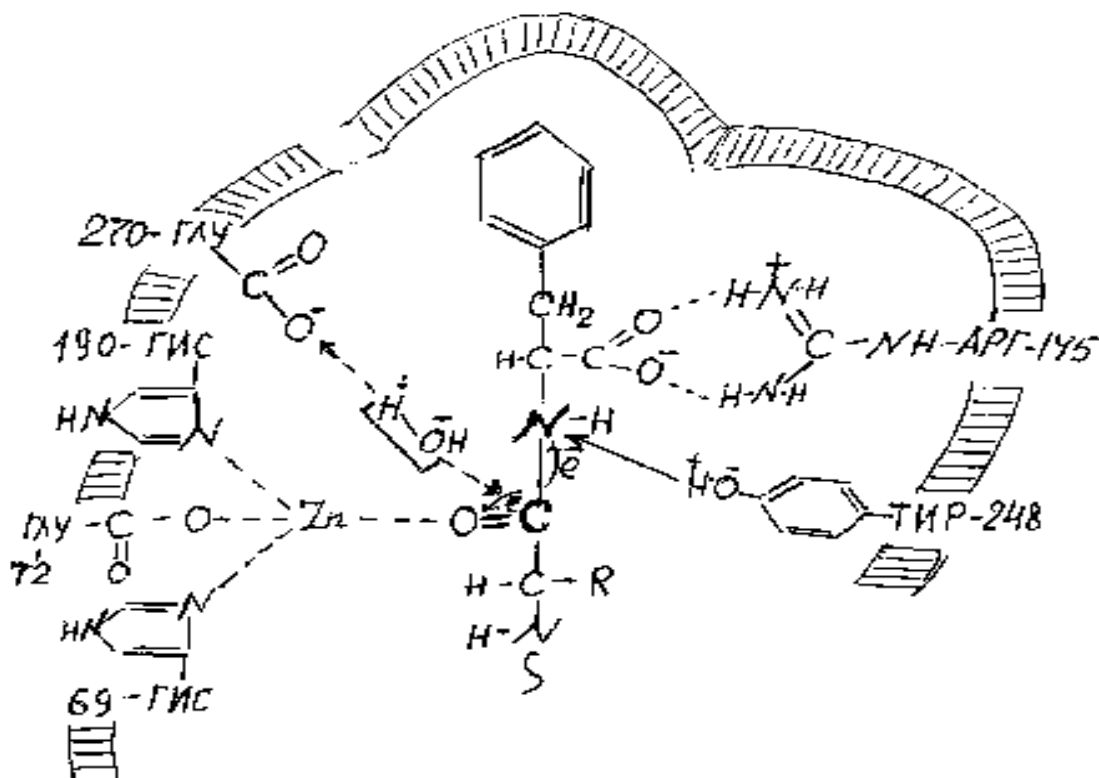


Рис. 3. Постулированный механизм каталитического действия карбоксипептидазы А.

Процесс гидролиза пептидной связи двух концевых аминокислот, можно представить в виде пяти последовательных этапов:

1. Субстрат через боковые ароматические или алифатические радикалы С-концевой аминокислоты связывается в неполярном кармане фермента.
2. Отрицательно заряженная концевая карбоксильная группа субстрата-полипептида вступает в электростатическое взаимодействие с положительно заряженной боковой цепью аргинина-145, что инициирует структурные изменения и перемещение тирозина-248 фермента к пептидной связи субстрата, которая должна гидролизироваться.

3. Водород NH-группы пептидной связи соединяется водородной связью с OH-группой тирозина-248.
4. Карбонильный кислород той же пептидной связи вступает в координационную связь с ионом цинка, что поляризует C=O группу и делает карбонильный атом углерода более чувствительным к нуклеофильной атаке. неполярное окружение иона цинка увеличивает его эффективный заряд и тем самым его способность индуцировать диполь.
5. Глутамат-270 перехватывает молекулу воды от иона цинка и активирует её. Образующийся OH⁻ непосредственно атакует карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи. Поляризации карбонильной группы способствует также близость отрицательного заряда глутамата-270. Одновременно тирозин-248 отдаёт протон на NH-группу пептидной связи и в итоге пептидная связь гидролизуется.

Таким образом, содержащийся в активном центре карбоксипептидазы А ион цинка и другие функциональные группы индуцируют перераспределение электронов в молекуле субстрата, что снижает энергетический барьер пептидной связи, облегчая и ускоряя тем самым процесс гидролиза полипептида.

Тема: Свойства ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Регуляция активности ферментов.

Целевые задачи:

1. Основные свойства ферментов:
 - а) термолабильность ферментов
 - б) влияние pH среды на активность ферментов
 - в) зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента
 - г) зависимость скорости ферментативной реакции от времени
 - д) влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции
2. Основы кинетики ферментативных реакций.
3. Ферментативная активность и единицы активности фермента.
4. Активаторы ферментов
5. Ингибиторы ферментов
6. Конкурентное ингибирование
7. Неконкурентное ингибирование
8. Тип ингибирования и кинетика ферментативной реакции
9. Регуляция активности ферментов
10. Энзимодиагностика. Применение ферментов в медицине.

Основы кинетики ферментативных реакций.

Кинетика химических реакций – это учение о скорости реакций, их зависимость от различных факторов.

Под ферментативной кинетикой понимают зависимость скорости реакции от химической природы реагирующих веществ (субстрата, фермента) и условий их взаимодействия (концентрации субстрата, температуры, pH среды, наличия активаторов или ингибиторов).

Кинетика ферментов позволит изучить закономерности влияния химической природы реагирующих веществ и условий их взаимодействия, позволяет понять природу молекулярных механизмов действия факторов, влияющих на скорость ферментативного катализа.

Ферментативная активность зависит от следующих факторов: концентрации молекул субстрата и фермента, температуры, pH, присутствия ингибиторов, активаторов.

1. Температура среды и ферментативная активность

Одним из характерных свойств ферментов является термолабильность или чувствительность ферментов к изменению температуры. Для всех ферментов существует некоторая определенная температура, при которой фермент обнаруживает наибольшую активность. Для большинства ферментов, выделенных из тканей и органов теплокровных животных, наиболее оптимальной температурой является 37-40⁰С. Скорость ферментативной реакции повышается с ростом температуры: при повышении температуры на каждые 10⁰С скорость увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа). Коэффициент, указывающий во сколько раз повышается скорость реакции при повышении температуры на 10⁰С, называется температурным коэффициентом и обозначается Q₁₀. Для ферментативных реакций это правило справедливо лишь в области низких температур до 50⁰С, а в некоторых случаях до 60⁰С.

Термолабильность ферментов связана с их белковой природой. Некоторые ферменты денатурируют уже при температуре около 40⁰С, но большая часть их инактивируется при температуре выше 40-50⁰С. Повышение скорости ферментативной реакции при повышении температуры объясняется увеличением кинетической энергии реагирующих молекул субстратов и ферментов. Но при дальнейшем повышении температуры кинетическая энергия молекулы фермента становится критической, что приводит в молекуле к разрыву связей, стабилизирующих вторичную и третичную структуру фермента – происходит тепловая денатурация фермента, потеря им каталитической активности.

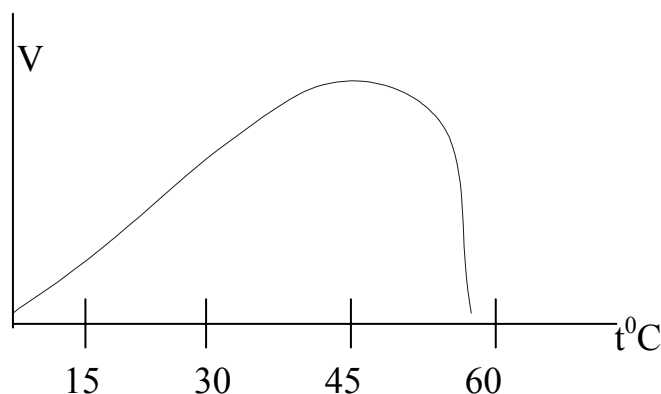


Рис. 4 Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры

При низких температурах ферментативная активность снижается с той же закономерностью в два раза на каждые 10⁰С понижения температуры. Отдельные ферменты денатурируют при температуре близкой к 0⁰С.

Некоторые ферменты не подчиняются этим закономерностям. Так, например, аденилаткиназа или миокиназа (фермент мышечной ткани), выдерживает кратковременное повышение температуры до 100⁰С без инактивации. В противоположность к этому фермент каталаза не утрачивает своей активности при температурах, приближающихся к 0⁰С. Для ферментов микроорганизмов, адаптированных к обитанию в горячих природных источниках, оптимальная температура может быть близка к точке кипения воды.

Высокая термоустойчивость этих организмов объясняется тем, что многие белки и ферменты этих микроорганизмов являются гликопротеидами, что и придает им термостабильность. Термоустойчивость многих сложных ферментов и белков обуславливается наличием в их структуре небелковых компонентов (кофакторов) различной химической природы, в том числе и олигосахаридов.

Повышение температуры организма (лихорадочное состояние при инфекциях) активирует ферментативные реакции, ускоряет биохимические процессы в клетках, что ведёт к усиленному распаду веществ и истощению резерва питательных веществ. При повышении температуры тела до 40⁰С часть термолабильных ферментов денатурирует, что приводит к нарушению биохимических реакций, но с другой стороны термозависимость ферментативных реакций позволяет использовать метод повышения температуры тела (пирогенный эффект некоторых веществ) в практике лечения некоторых форм злокачественных опухолей. Интересно, что снижение температуры организма приводит к изменению чувствительности клеточных рецепторов к гормонам, снижению активности ферментов, замедлению скорости протекания химических реакций, снижению обмена веществ и в итоге к снижению активности клеточных функций.

Гибернация или искусственное охлаждение организма применяется в клинике при проведении хирургических операций.

2. Зависимость ферментативной активности от рН.

Оптимальной активности каждого фермента соответствует определенная область рН, причем, уменьшение или увеличение рН приводит к снижению активности фермента. Обычно кривая зависимости скорости ферментативной реакции от рН среды имеет колоколообразную форму (рис.5) (* - оптимальная активность фермента)

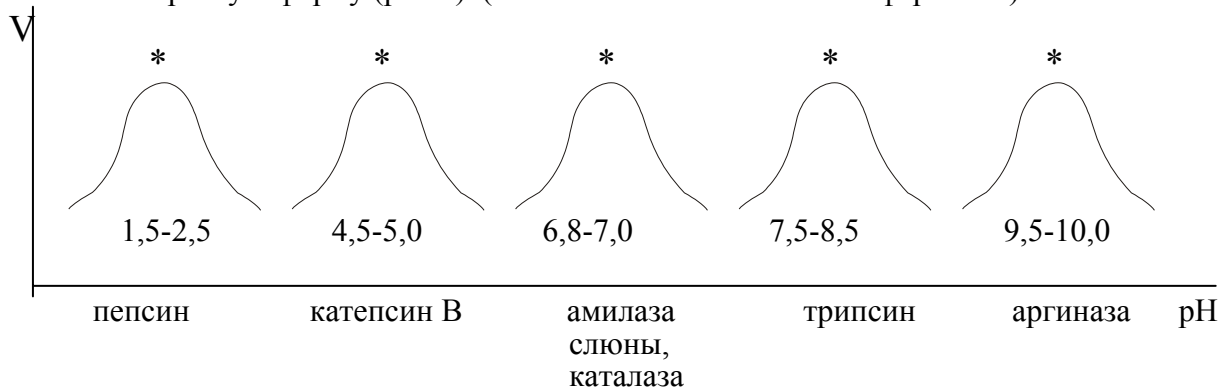


Рис.5 Зависимость ферментативной активности от рН

Оптимум рН для большинства ферментов лежит в пределах от 5 до 9. Вместе с тем отдельные ферменты, например, пепсин, аргиназа активны при значениях рН, лежащих далеко за пределами этого интервала.

Ферментативные реакции чувствительны к изменению рН, потому что ферменты содержат большое число ионогенных групп. Уже незначительное изменение рН оказывает влияние на ионное состояние фермента, а зачастую и субстрата.

Зависимость скорости ферментативной реакции от рН главным образом свидетельствует о состоянии функциональных групп активного центра фермента. Изменение рН среды приводит к изменению степени ионизации кислотных и основных групп аминокислотных остатков активного центра, которые участвуют в связывании и превращении субстрата. Изменение рН приводит к изменению величины заряда молекул субстрата и фермента, что вызывает конформационные изменения фермента и субстрата, изменение их сродства и каталитической активности фермента.

В физиологических условиях диапазон колебаний рН в клетке незначителен, однако на ограниченном участке клетки возможно изменение рН вследствие действия гипоксии, нарушения гликолиза и других обменных циклов, что вызывает изменение скорости сопряжённых ферментативных реакций.

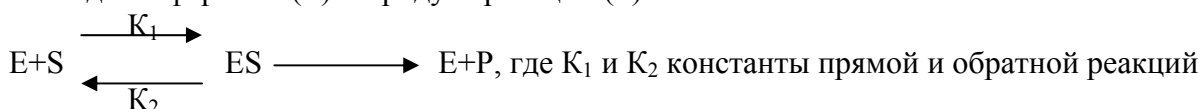
Помимо этого, рН, дестабилизируя структуру ферментов, может нарушать прочность связи апофермента с небелковым кофактором и как следствие этого активности

фермента. Знание оптимума рН для индивидуальных ферментов важно как для определения активности фермента с целью диагностики, так и для лечебной практики.

3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента.

В начальный период любой ферментативной реакции скорость её имеет однонаправленный линейный характер. На начальной стадии, когда ферментативная реакция только начинается, и продукт реакции практически отсутствует, обратная реакция не идёт. Кроме того, в начальный период реакции концентрация субстрата соответствует его исходному уровню. Поэтому линейная зависимость между начальной скоростью реакции и концентрацией фермента пропорционально концентрации молекул фермента.

Являясь участником реакции, фермент при взаимодействии с молекулой субстрата, образует промежуточный фермент-субстратный комплекс (ES), распадающийся на свободный фермент (E) и продукт реакции (P).



Концентрация фермента в выражении для скорости прямой и обратной реакций является обязательным компонентом: $V_1=K_1[E] \cdot [S]$ $V_2=K_2[E] \cdot [P]$

Однако, в уравнении для константы равновесия (K_p) концентрация фермента уже не содержится и не имеет значения:

$$K_p = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[E] \cdot [P]}{[E] \cdot [S]} = \frac{[P]}{[S]}$$

Таким образом, концентрация фермента не оказывает влияния на константу равновесия, а K_p не зависит от того, каким образом достигается равновесие – с участием фермента или без него. Фермент определяет направление и скорость химической реакции, но не оказывает влияния на конечные (равновесные) концентрации реагирующих молекул субстратов и продуктов, определяющих величину константы равновесия (K_p) и изменения стандартной свободной энергии (ΔG).

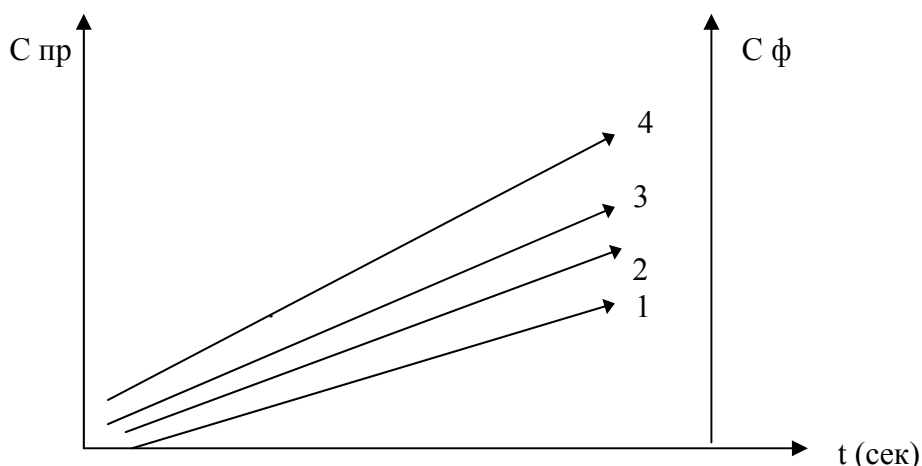


Рис. 6 Зависимость скорости реакции от концентрации фермента в присутствии насыщенных концентраций субстрата.

(С пр - концентрация продукта, С ф – концентрация фермента)

4. Зависимость скорости ферментативной реакции от времени.

Интервал времени, в течение которого скорость равна начальной скорости или близка к ней, соответствует прямолинейному участку графика зависимости реакции от времени (на рисунке этот интервал отмечен пунктирной линией).

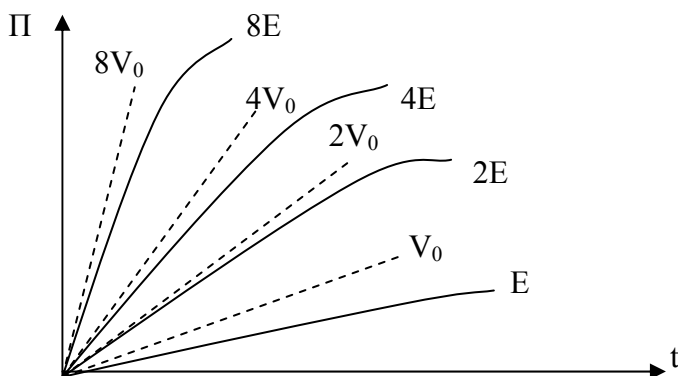


Рис.7 Зависимость скорости ферментативной реакции от времени. Начальная скорость (V_0) увеличивается пропорционально количеству фермента в пробах.
П – продукт реакции

По мере увеличения времени инкубации скорость реакции снижается, вследствие уменьшения концентрации субстрата, увеличения скорости обратной реакции (в результате накопления продуктов прямой реакции), ингибирования фермента продуктом реакции, денатурации фермента вследствие изменения pH среды. При кинетических исследованиях, и при количественном определении ферментов измеряют начальную скорость реакции сразу после начала реакции во избежание осложнений, зависящих от уменьшения концентрации субстрата, обратимости реакции или образования тормозящих реакцию продуктов.

5. Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции .Кинетика реакции. Уравнение Михаэлиса-Ментен.

Для многих ферментов скорость катализа зависит от концентрации субстрата. Скорость ферментативной реакции или мера каталитической активности фермента измеряется количеством превращенного субстрата [S] или нарастанием продукта реакции [P] за единицу времени.

Известно, что любая химическая реакция характеризуется константой термодинамического равновесия. Она выражает состояние химического равновесия, достигаемого системой, и обозначается K_p . Значение константы равновесия определяется из соотношения констант скоростей прямой (K_1) и обратной (K_2) реакций. В состоянии равновесия, как сказано выше, скорость прямой реакции $V_1 = K_1 [A][B]$ равна скорости обратной реакции $V_2 = K_2 [C][D]$, т.е. $V_1 = V_2$. Отсюда, константа равновесия $[K_p]$ равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакций:

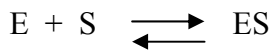
$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}; \quad \text{т.е.} \quad K_p = \frac{K_1}{K_2}.$$

Величину, обратную константе равновесия, в ферментативных реакциях принято называть константой диссоциации фермент-субстратного комплекса, обозначается символом K_s и равна отношению произведения концентрации фермента и субстрата к концентрации фермент-субстратного комплекса или отношению констант скоростей обратной и прямой реакций:

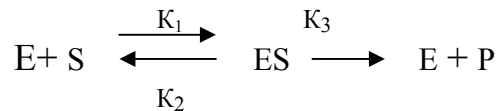


K_s зависит от природы субстрата и фермента и определяет степень их сродства. Чем ниже значение K_s , тем выше сродство фермента к субстрату.

Кинетические свойства многих ферментов можно объяснить в рамках модели Михаэлиса-Ментен, согласно которой необходимым промежуточным этапом катализа является образование специфического фермент-субстратного комплекса:



Согласно модели Михаэлиса-Ментен, субстрат связывается с ферментом [E] с константой скорости K_1 . Образующийся фермент-субстратный комплекс ES может диссоциировать на E и S с константой скорости K_2 , либо с константой скорости K_3 , превратится в продукт "P", и свободный фермент "E",.



В модели предполагается, что продукт не может обратно превращаться в субстрат, что и характерно для ранних стадий, когда концентрация продукта низка.

Скорость реакции V связана с концентрацией субстрата [S] следующим соотношением:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]}, \text{ где } V_{\max} - \text{максимальная скорость реакции, достигающаяся в том}$$

случае, когда все молекулы фермента связаны с субстратом (эффект насыщения), а K_S – константа диссоциации фермент субстратного комплекса моль/л.

$$K_S = \frac{K_2}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} - \text{мера сродства фермента и субстрата } K_S = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{K_2}{K_1}$$

Из уравнения Михаэлиса-Ментен следует, что при высокой концентрации субстрата и низком значении K_S скорость реакции максимальна (реакция нулевого порядка). При низкой концентрации субстрата, напротив, скорость реакции оказывается пропорциональной концентрации субстрата в каждый данный момент (реакция первого порядка).

Уравнение Михаэлиса-Ментен не учитывает влияние на скорость ферментативного процесса продуктов реакции.

Бриггс и Холдейн усовершенствовали уравнение:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \text{ где } K_M - \text{представляет константу Михаэлиса, величина которой}$$

определена экспериментально и всегда больше, чем K_S – константа диссоциации

ES – комплекса на $\frac{K_2}{K_1}$

$$K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \text{ или } K_M = \frac{K_2}{K_1} + \frac{K_3}{K_1}, \text{ где } \frac{K_2}{K_1} = K_S,$$

$$\text{тогда } K_M = K_S + \frac{K_3}{K_1}$$

K_M – константа Михаэлиса, численно равна концентрации субстрата в моль/л, при которой скорость реакции составляет половину максимальной величины (V_{\max}).

Для определения числового значения K_M находят ту концентрацию субстрата, при которой V – ферментативной реакции составляет половину от V_{\max} , т.е.:

$$V = \frac{1}{2} V_{\max}, \text{ тогда } V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \text{ откуда } K_M = [S]$$

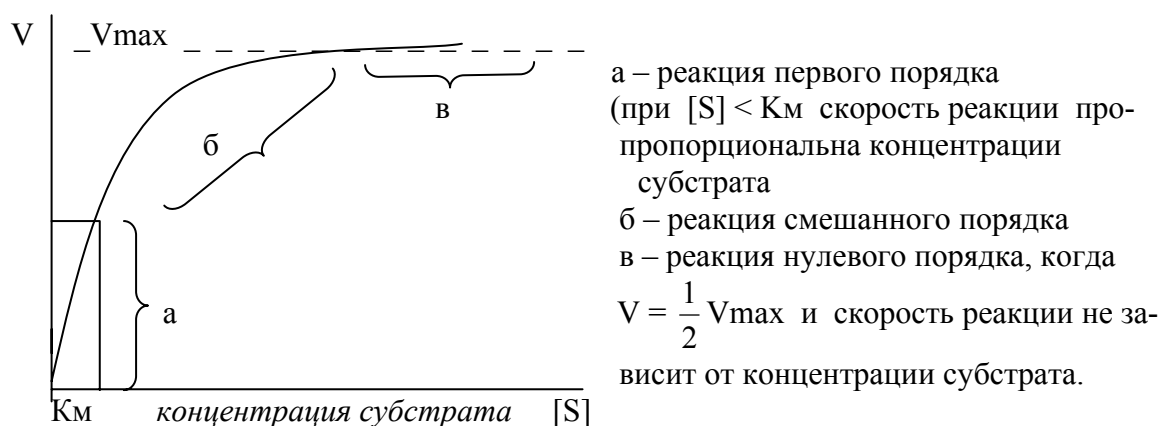


Рис. 8 Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянном содержании фермента.

K_M – это мера сродства к ферменту (в том случае, когда $k_3 \ll k_2$) которое, в свою очередь, отражает прочность связывания субстрата с активным центром. Однако, следует знать, что K_M не просто мера сродства между ферментом и субстратом, но и что её точный физический смысл зависит от механизма взаимодействия между данным ферментом и субстратом. При концентрациях субстрата многократно превышающих K_M фермент будет работать практически с максимальной скоростью, поэтому V_{max} будет отражать количество присутствующего активного фермента. Это используется для оценки содержания фермента в исследуемом биологическом объекте.

Определение константы Михаэлиса (K_M) имеет важное значение при выяснении механизма действия различных эффлекторов (активаторов или ингибиторов) на активность ферментов, позволяет отличить конкурентный от неконкурентного механизма ингибирования. Согласно уравнения Михаэлиса-Ментен величину K_M можно вычислить по графику, где отрезок на оси ординат соответствует половине максимальной скорости. Однако определение K_M по графику гиперболической зависимости скорости (V) ферментативной реакции от концентрации субстрата $[S]$ затруднено, поскольку V_{max} величина асимптотическая и определяется недостаточно точно.

Лайнуивер и Бэрк предложили альтернативный способ представления уравнения Михаэлиса-Ментен с помощью графика двойных координат. Вследствие чего уравнение Бриггс-Холдена:

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

преобразуется в выражение

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Это уравнение прямой линии $y = ax + b$. Если построить график зависимости $\frac{1}{V}$ от $\frac{1}{[S]}$, то получим прямую линию, тангенс угла наклона которой будет равен величине $\frac{K_M}{V_{max}}$.

Отрезок отсекаемой прямой от оси ординат, представляет собой $\frac{1}{V_{max}}$ (обратную величину максимальной скорости). Если продолжить прямую линию за ось ординат, тогда на оси абсцисс отсекается отрезок соответствующий константе Михаэлиса $\frac{1}{K_M}$.

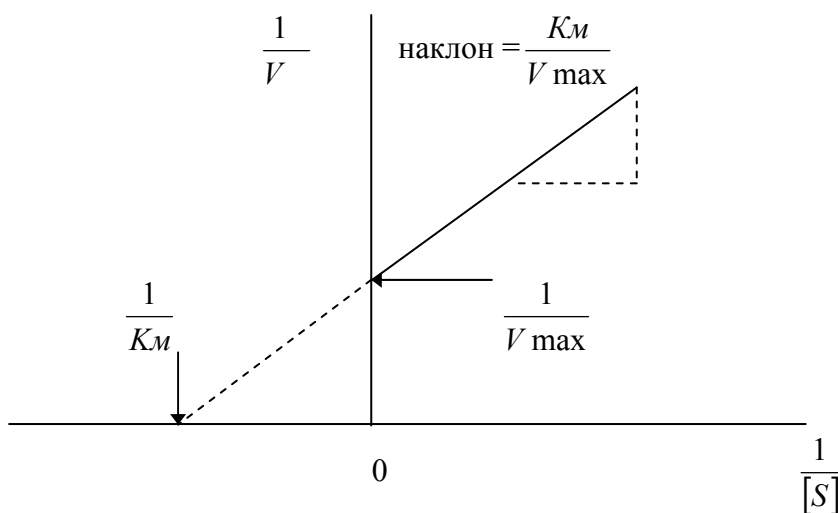


Рис. 9 График Лайкуивера-Бэрка в двойных обратных координатах (зависимость $1/V$ от $1/[S]$), используемый для графического определения K_M и V_{\max} .

Используя график двойных обратных координат, K_M можно найти либо из наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси Y , либо из длины отрезка, отсекаемого в области отрицательных значений от оси X . Поскольку $[S]$ имеет размерность молярной концентрации, K_M тоже измеряется в молях на литр.

На основе графика гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции нами предложен простой графический метод определения K_M и скорости ферментативной реакции, где исключается необходимость математических расчётов, применяемых при построении графика двойных обратных координат.

Проведём прямую линию, соединяющую точку начала реакции нулевого порядка и точку пересечения лучей реакции первого порядка и $\frac{V_{\max}}{2}$. При продолжении прямой линии за ось ординат на оси абсцисс (X) в области её отрицательного значения отсекается отрезок n -кратно превышающий величину отрезка $K_M=[S]$ на оси $+X$, а на оси ординат ($+Y$) — отрезок соответствующий максимальной скорости реакции (V_{\max}). Принимая отрезок на оси $-X$ за величину положительную, легко рассчитать $K_M=[S]$ даже при самых низких значениях K_M на оси $+X$.

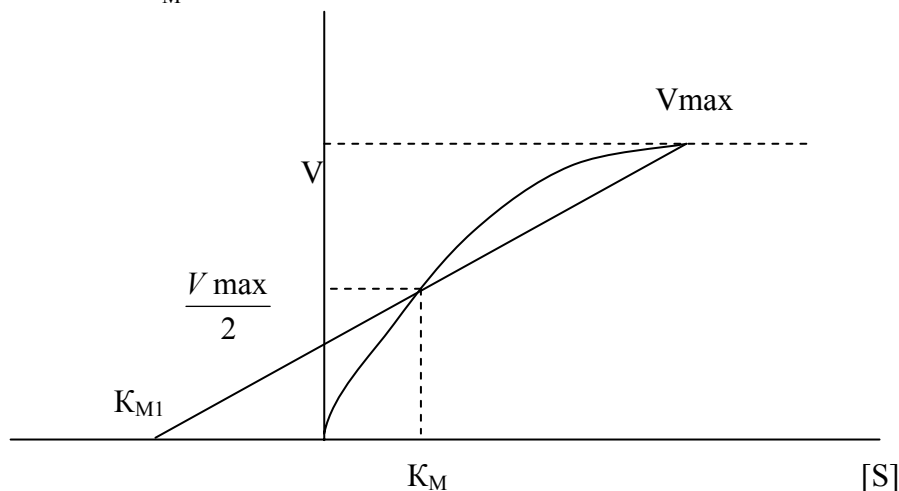


Рис.10 Преобразованный график гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, используемый для графического определения K_M и V_{\max} .

Метод позволяет быстро определить K_M и V_{\max} при изучении характера действия ингибиторов. (стр. 29 и 30)

Большая группа аллостерических ферментов не подчиняется классической кинетике насыщения Михаэлиса-Ментен. Для этой группы сложных белков график зависимости начальной скорости (V) от концентрации субстрата $[S]$ имеет не гиперболическую, а сигмоидную форму наподобие кривой насыщения гемоглобина кислородом, что указывает на кооперативное связывание субстрата многими центрами – с одним каталитическим и другими центрами связывания. Для оценки концентрации субстрата, при которой скорость составляет половину максимальной, в условиях сигмоидного характера кинетической кривой применяют преобразованное уравнение Хилла:

$$\log \frac{V}{V_{\max} - V} = n \cdot \log[S] - \log K^1$$

где K^1 - константа ассоциации; n - число субстратсвязывающих центров.

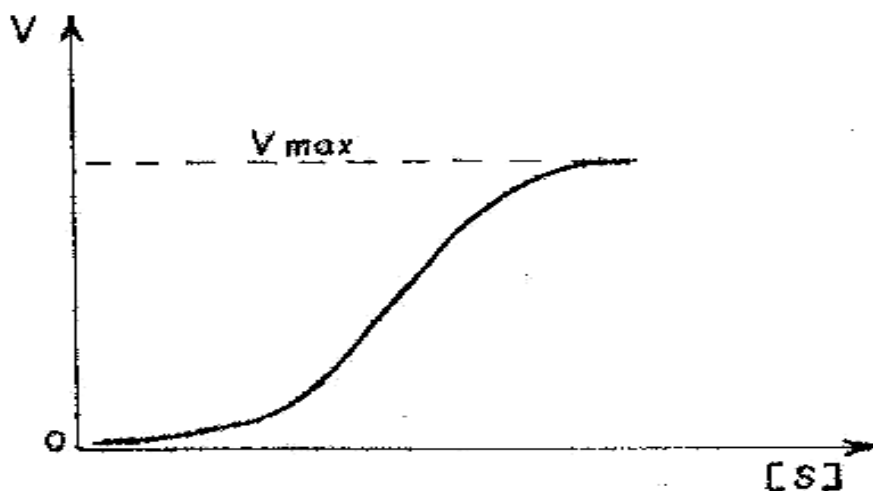


Рис.11 Сигмоидная кинетическая кривая насыщения аллостерических ферментов субстратом

Активность фермента. Единицы активности.

Содержание ферментов в биологических объектах (кровь, слюна, желудочный сок, клетки тканей и т.д.) чрезвычайно мало, кроме того, концентрация фермента в тканях еще не является критерием активности биохимических процессов в клетках, так как часть молекул фермента может находиться в неактивном (ингибированном) состоянии.

Поэтому для количественного определения фермента пользуются косвенными методами, где критерием оценки является скорость катализируемой реакции, определяемая по скорости расщепления молекул субстрата или нарастания количества продуктов реакции в единицу времени, что и служит мерой активности фермента.

Активность фермента определяется по скорости реакции катализируемой ферментом при стандартных условиях измерения: при температуре 25°C , оптимуме pH, в определенном буфере и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения.

При этих условиях скорость соответствует нулевому порядку реакции (V_{\max}) в отношении субстрата и будет зависеть только от концентрации активных молекул фермента и может быть выражена в различных единицах.

Единицы активности фермента:

1. Одна *стандартная* международная единица активности фермента (Е или U): за единицу активности любого фермента принимают то количество его, которое в

оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образования 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин)

Мкмоль – 10^{-6} моль, наномоль – 10^{-9} моль, пикомоль – 10^{-12} моль.

2. *Катал* (Международная система единиц – СИ). 1 катал- каталитическая активность способная осуществить реакцию со скоростью, равной 1 молю в 1 с. (моль/сек). Отношение международной единицы (U) к каталу:

1 кат = 1 моль · с⁻¹ = 60 моль·мин⁻¹ = 60 · 10⁶ мкмоль·мин⁻¹ = 6 · 10⁷ U, или:

1U = 1 мкмоль · мин⁻¹ = ($\frac{1}{60}$) мкмоль с⁻¹ = ($\frac{1}{60}$) мккат = 16,67 нкат; Таким образом, стандартная международная единица 1U = 16,67 нкат

3. *Удельная активность* фермента равна массе фермента (в мг), способной превратить 1 мкмоль субстрата за 1 мин (мкмоль/мин/мг).

4. *Молярная активность* (число оборотов или каталитическая константа) равна числу единиц активности фермента, деленному на количество фермента, выраженное в микромолях (мкмоль/мин/мкмоль).

Молекулярная активность указывает, сколько молекул субстрата превращается одной молекулой фермента за 1 мин., и может использоваться для сравнения каталитического действия разных ферментов. Например, одна молекула каталазы эритроцитов способна расщепить в 1с. 440000 молекул перекиси водорода.

Активаторы ферментов.

Ферменты-биокатализаторы с регулируемой активностью. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. К ним относятся органические и неорганические кислоты, витамины, субстраты, ионы металлов, влияющие на область активного центра ферментов. Так желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы, соляная кислота активирует действие пепсина фермента фундальных клеток слизистой желудка.

К числу активаторов, повышающих активность ферментов, усиливающих их действие, относятся ионы многих металлов и некоторые анионы. Особенно часто активаторами ферментов бывают ионы магния, марганца, цинка, калия, кобальта, железа, а из анионов – хлора. В ряде случаев ионы металлов (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) входят в состав простатических групп фермента, в других облегчают образование фермент-субстратного комплекса. Так ионы магния обеспечивают присоединение монофосфорных эфиров органических веществ к активному центру фосфатаз, катализирующих гидролиз этих соединений. В третьих – ионы металлов служат акцепторами или донаторами электронов, или выступают в качестве электрофилов или нуклеофилов, сохраняя реактивные группировки в необходимой ориентации. В четвёртых - обеспечивают становление четвертичной структуры фермента.

Иногда металл соединяется с субстратом, образуя истинный субстрат комплиментарный ферменту. Так ионы Mg^{2+} , благодаря образованию магниевой соли АТФ-субстрата креатинфосфатазы. Ионы Ca^{2+} участвуют в формировании и стабилизации активного центра и всей трёхмерной структуры молекулы амилазы слюны.

Металлы, взаимодействуя с аллостерическим центром фермента, нередко выступают в роли аллостерических эффекторов, способствуя образованию наиболее выгодной пространственной конфигурации фермента и активного фермент-субстратного комплекса.

Анионы в физиологических концентрациях оказывают небольшое активирующее влияние на фермент. Активность амилазы слюны, катализирующая гидролиз крахмала, повышается при действии ионов хлора, анионами галогенов активируется аденилатциклаза.

Ингибиторы ферментов.

Регуляция многих метаболических процессов на молекулярном уровне обеспечивается каталитической эффективностью фермента, что обусловлено рядом параметров: количеством молекул фермента, концентрацией реагентов, наличием активаторов и ингибиторов. Ингибирование ферментов представляет собой одну из систем биорегуляции, в механизме которой имеет место полное торможение реакций, катализируемых ферментами, или снижение скорости ферментативных реакций, которые частично или полностью препятствуют образованию фермент-субстратного комплекса.

К ингибиторам ферментов относятся вещества различной химической природы, которые специфически тормозят определённые ферментативные реакции. Оказывая своё действие на какой-либо один фермент или группу родственных ферментов, ингибитор вызывает обратимое или необратимое торможение реакций. Ингибиторы ферментов представляют большой интерес для изучения механизмов ферментативного катализа. Применение веществ, связывающих функциональные группы контактного, каталитического или регуляторного участков активных центров фермента позволяет прояснить значение их участия в катализе. Так, ферментативная активность сериновых протеиназ и эстераз - трипсина, химотрипсина, холинэстеразы и ряда других, снижается вследствие блокирования ключевой гидроксильной группы серина в активном центре фермента под действием специфического ингибитора диизопропилфторфосфата. Ингибиторы йодацетат $\text{ICH}_2\text{-COOH}$, парахлормеркурибензоат $\text{ClHq-C}_6\text{-H}_4\text{-COOH}$ блокируют SH- группы активного центра цистеинзависимых ферментов.

В ряде случаев действие ингибиторов направлено на простетическую группу фермента: так соли синильной кислоты (HCN) угнетают активность ферментов содержащих трёхвалентный атом Fe^{3+} (цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза и другие), окись углерода (CO) блокирует энзимы, в состав простетической группы которых входит двухвалентное железо. Действие таких ингибиторов блокирует фермент необратимо, так как ингибитор связывается с активным центром фермента прочной ковалентной связью.

Применение ингибиторов позволяет детально изучить отдельные стадии сложных многоступенчатых процессов, катализируемых большим количеством ферментов. Применение йодацетата, фторида и других ингибиторов позволило расшифровать 11 ферментативных реакций гликолитического пути окисления глюкозо-6-фосфата.

С ингибированием ферментов связан механизм действия многих ядов и токсинов на организм. Так дифтерийный токсин активирует каталитическую реакцию АДФ-риболизирования фактора элонгации (трансляционный фактор-2, TF-2), выключая тем самым его из участия в синтезе специфических белков, что приводит к развитию патологии.

Изучение действия ингибиторов на скорость ферментативной реакции помогает в поисках эффективных лекарственных средств.

По характеру своего действия ингибиторы подразделяются на *обратимые и необратимые*. Необратимые ингибиторы как сказано выше, образуя прочные ковалентные связи с ферментом, вызывают стойкие изменения пространственной структуры молекулы фермента, его активного центра.

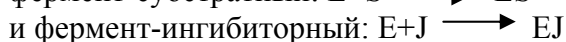
Обратимое ингибирование имеет место в тех случаях, когда ингибитор по своей химической структуре близок к субстрату или является его аналогом. Примером обратимых ингибиторов являются клеточные метаболиты и их структурные аналоги, снижающие активность ферментов. Ингибиторами могут быть не только аналоги субстратов, но и аналоги коферментов, способные занимать место настоящего кофермента, но неспособные выполнять его функцию.

По механизму действия обратимые ингибиторы ферментов делятся на конкурентные, неконкурентные и бесконкурентные. Конкурентное и неконкурентное ингибирование

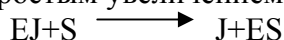
различают по зависимости преодоления торможения ферментативной реакции путём увеличения концентрации субстрата.

Конкурентное ингибирование.

Конкурентное ингибирование может быть вызвано веществами имеющими структуру, похожую на структуру субстрата. Субстрат (S) и ингибитор (J) имея сходные структуры и конкурируя друг с другом за связывание с активным центром фермента образуют соответствующие комплексы:



Образование EJ комплекса не приводит к получению продуктов реакции, кроме того образование EJ способствует уменьшению числа молекул свободного фермента, способных взаимодействовать с природным субстратом вследствие чего скорость реакции замедляется. Поскольку конкурентный ингибитор обратимо связывается с ферментом и EJ может подвергаться диссоциации, степень торможения активности фермента зависит от соотношения концентрации субстрата и ингибитора, при этом равновесие реакции можно сдвинуть влево простым увеличением концентрации субстрата:



Избыток молекул субстрата способствует образованию большей доли нормального фермент-субстратного комплекса.

Примером конкурентного торможения является ингибирующее действие щавелевоуксусной, глутаровой и малоновой кислот на активность сукцинатдегидрогеназы, катализирующей дегидрирование янтарной кислоты. Наиболее сильным ингибирующим действием обладает малоновая кислота. Ингибирующее действие малоновой кислоты объясняется её способностью взаимодействовать с теми же группами активного центра сукцинатдегидрогеназы, которые связывают и янтарную кислоту. Дегидрогеназа янтарной кислоты катализирует окисление сукцината путем его дегидрирования и превращения в фумаровую.

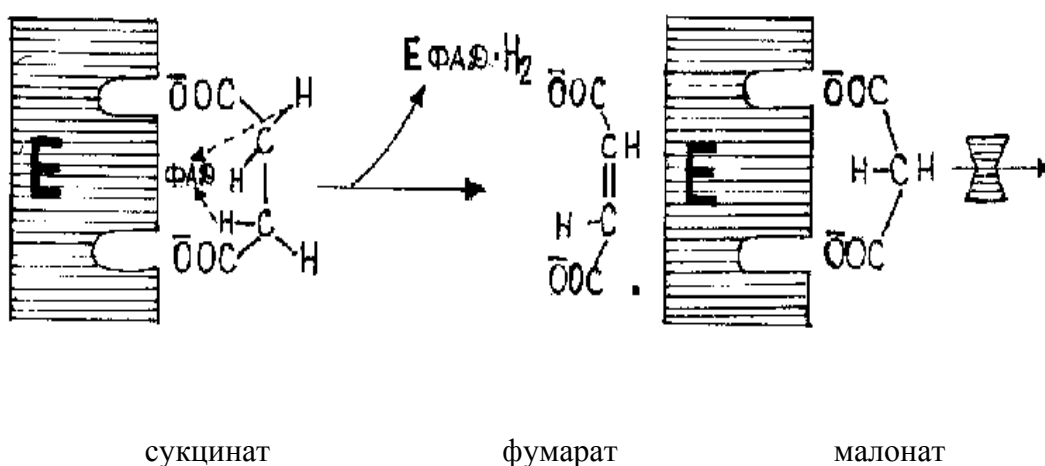


Рис.12 Конкурентный механизм ингибирования сукцинатдегидрогеназы малонатом

Малоновая кислота, вследствие структурного сходства (наличие двух ионизированных карбоксильных групп) с истинным субстратом янтарной кислотой, взаимодействует с ферментом в его участке связывания с образованием фермент-ингибиторного комплекса. Однако, в силу высокого энергетического барьера ковалентных связей водородных атомов с центральным углеродом малоновой кислоты реакция дегидрирования малоната с участием кофактора ФАД невозможна. Степень торможения

фермента определяется не абсолютной концентрацией ингибитора, а соотношением концентрации сукцината и малоната. Увеличение концентрации янтарной кислоты приводит к снижению степени ингибирования, поскольку субстрат вытесняет ингибитор из субстратсвязывающего участка активного центра. При отравлении метанолом, введении больших доз этанола конкурентно тормозит реакцию окисления метанола в альдегидные производные вследствие более высокого сродства этанола к алкогольдегидрогеназе. Такой же принцип лежит в основе лечения при отравлении этиленгликолем.

На принципе конкурентного ингибирования основано действие многих фармакологических препаратов, авитаминов, боевых отравляющих веществ, ядохимикатов.

Конкурентными ингибиторами фермента холинэстеразы по отношению к его субстрату ацетилхолину являются такие препараты как прозерин, физостигмин и сефин, угнетающие фермент обратимо. В тоже время фосфорорганические препараты (армин, хлорофос, нибуфин, зарин, заман), фосфорилируя гидроксильную группу серина каталитического участка холинэстеразы, ингибируют фермент необратимо. В результате этого в синапсах накапливается ацетилхолин, что ведет к нервному перевозбуждению и отравлению организма накопившимся ацетилхолином.

Действие обратимых ингибиторов не столь токсично, как действие необратимых ингибиторов.

Неконкурентное ингибирование.

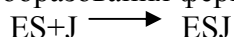
Неконкурентный ингибитор, не нарушая связывания фермента с субстратом, непосредственно связывается либо с каталитическими группами активного центра фермента, либо с ферментом вне активного центра, изменяя структуру каталитического участка и нарушая его взаимодействие с субстратом. Неконкурентный ингибитор, фермент и субстрат образуют тройной комплекс ESJ, не способный превращать субстрат в продукты реакции.

Неконкурентными ингибиторами являются цианиды, которые прочно соединяются с трёхвалентным железом, входящим в каталитический участок цитохромоксидазы, небольшие концентрации ионов тяжёлых металлов (ртути, свинца), мышьяка и их органические соединения, которые блокируют OH-, SH- группы каталитических участков фермента.

Снятие действия неконкурентных ингибиторов возможно реактиваторами или противоядиями, связывающими ингибитор. К ним относятся все SH- содержащие комплексы, лимонная кислота, этилендиаминтетраацетат(ЭДАТА).

Бесконкурентное ингибирование.

Наблюдается только в том случае, когда ингибитор обратимо взаимодействует с ферментом только после образования фермент-субстратного комплекса (ES).



Бесконкурентное ингибирование наиболее характерно для ферментов, каталитическое действие которых осуществляется по механизму, "пинг-понг"- ингибитор облегчает присоединение субстрата к субстрат-связывающему участку фермента, а затем присоединяется сам, ингибируя фермент-субстратное взаимодействие.

Тип ингибирования и кинетика ферментативной реакции.

Взаимодействие фермента с ингибитором часто в той же мере специфично, как и взаимодействие с субстратом или коферментом. На этом основано применение

ингибиторов для избирательного подавления активности того или иного фермента в сложной ферментативной системе организма. В частности многие лекарственные вещества являются ингибиторами. Так хлорамфикол – ингибитор пентидилтрансферазной реакции синтеза белков в 70S рибосомах бактерий. Однако на этот процесс он не действует в 80S рибосомах человека, и наоборот циклогексимид – ингибитор транслказы в 80S рибосомах не действуют на 70S рибосомы бактерий.

Тип ингибирования может быть определён с помощью кинетического анализа при изучении зависимости скорости (V) ферментативной реакции от концентрации субстрата $[S]$ в отсутствии и присутствии ингибитора и оценки его влияния на K_M и V_{max} . Определение K_M и V_{max} позволяет выяснить конкурентный и неконкурентный механизм ингибирования.

При графическом анализе скоростей ферментативных реакций и констант Михаэлиса в присутствии и отсутствии ингибитора использование уравнений Михаэлиса-Ментен и Лайнуивера-Бэрка для выяснения вопроса о типе ингибирования может быть получена информация не только о кинетике ферментативных реакций, но и о молекулярных механизмах ферментативного катализа.

Использование предложенного нами преобразованного графика гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата для графического определения K_M и V_{max} ферментативной реакции позволяет быстро получить достоверную информацию о типе ингибирования, о сродстве фермента к субстрату и других молекулярных механизмах ферментативного катализа.

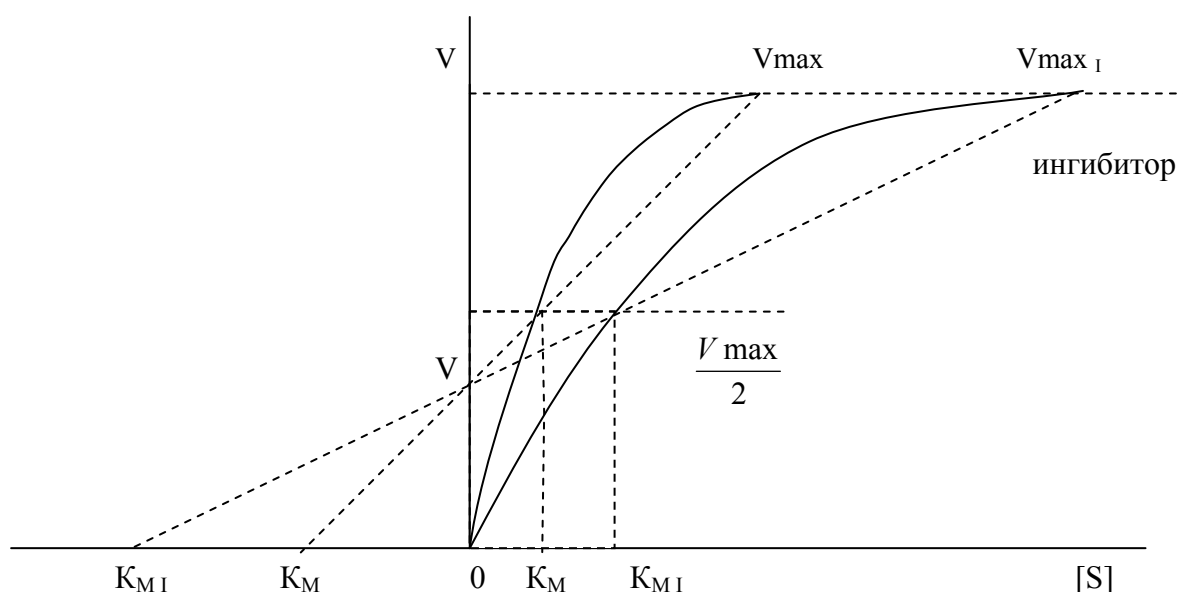


Рис.13 Графическое определение K_M и V_{max} на основе преобразованного графика гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии или в отсутствие конкурентного ингибитора.

**K_M и V_{max} при отсутствии конкурентного ингибитора
 K_{M1} и V_{max1} в присутствии конкурентного ингибитора**

При конкурентном типе ингибирования для полного насыщения фермента требуется большее количество субстрата, что и ведёт к увеличению K_M . Когда система достигает насыщения, величина V_{max} остаётся неизменной, что является следствием вытеснения ингибитора из комплекса EI и образования комплекса ES

При неконкурентном ингибировании ингибитор снижает величину максимальной скорости, не оказывая влияние на K_M , что свидетельствует об образовании неактивных труднодиссоциирующих комплексов EI и EIS .

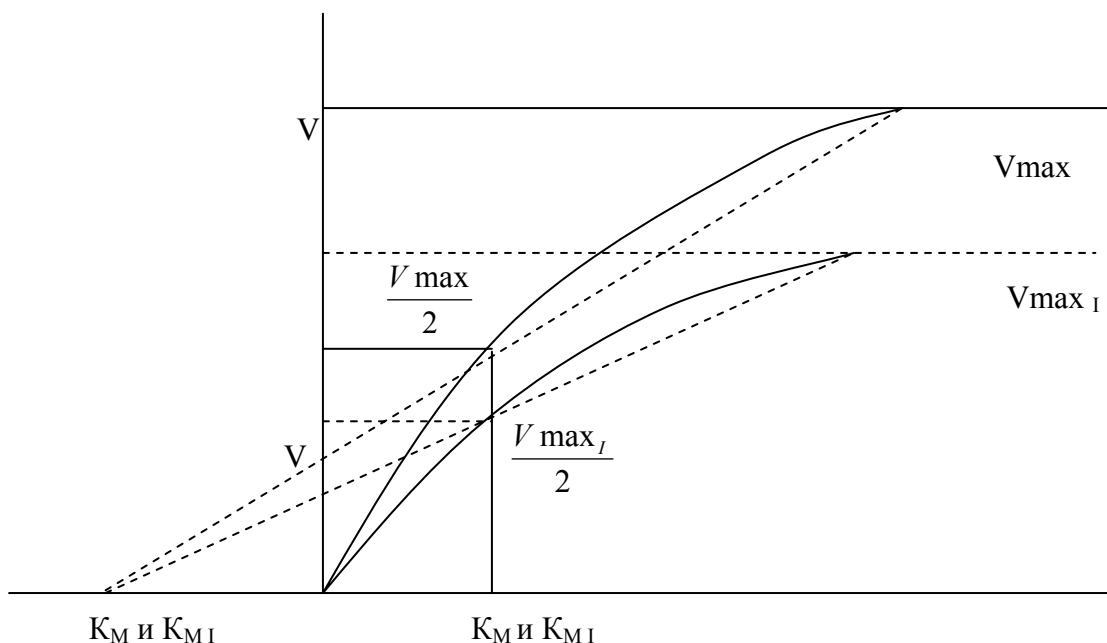


Рис.14 Кинетика ферментативной реакции на преобразованном графике гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии или в отсутствии неконкурентного ингибитора
 K_M и V_{max} при отсутствии неконкурентного ингибитора
 K_{M_I} и V_{max_I} в присутствии неконкурентного ингибитора

Определение константы Михаэлиса имеет практическую значимость - позволяет ориентироваться, какое количество субстрата следует добавить для определения V_{max} , позволяет оценить влияние активаторов и ингибиторов на ферментативную активность, а также позволяет выяснить механизм действия лекарственных веществ на отдельные биохимические реакции.

Регуляция активности ферментов.

Живая клетка - это динамическая стационарная система, в которой регуляция скорости ферментативных реакций является основным механизмом координации метаболических путей в процессе взаимосвязи клетки с окружающей средой. Точная регуляция потока метаболитов по анаболическим и катаболическим путям, генерация АТФ, трансмембранный перенос веществ, секреция и другие процессы должны быть скоординированы и отвечать как на изменение во внешней среде (например, поступление питательных веществ в клетку и удаление из неё продуктов обмена), так и на внутриклеточные события (синтез ДНК, РНК и белков). Скорость и направленность ферментативных реакций в клетке регулируется следующими параметрами:

1. Упорядоченностью структурной организации клетки – её компартментацией, а именно строгой локализацией взаимосвязанных ферментных комплексов определённых биохимических циклов в каждом компартменте и механизма координированного потока метаболитов из одного компартмента в другой.
2. Абсолютным количеством молекул фермента в компартменте, что определяется соотношением скорости синтеза и распада фермента в клетке.
3. Изменением каталитической активности фермента, что определяется чёткостью химической модификации фермента, в процессе чего формируется активный центр фермента и повышается его сродство к молекуле субстрата.

Компартментация ферментов, закон действующих масс и обратимость ферментативных реакций.

Пространственное разделение (компартментация) метаболических процессов в клетках высших форм организмов позволяет осуществлять более тонкую регуляцию обмена веществ, является основой механизма интеграции ферментативных реакций.

Компартментация клетки обусловлена высокоорганизованной структурой биологических мембран, которые формируют обособленные внутриклеточные участки или отсеки – ядро, митохондрии, лизосомы, эндоплазматическую сеть, рибосомы, аппарат Гольджи и другие. В мембранах каждой из этих структур локализованы высокоспецифические ферментные системы, которые, регулируя скорость и направление метаболических реакций, обеспечивают как разделение, так и интеграцию внутриклеточных процессов. Пути биосинтеза и распада веществ в этих структурах почти всегда разобщены по энергетическим причинам, в чём и состоит важнейший общий принцип компартментации метаболизма.

В механизме активирования фермента важное значение имеет эффективное концентрирование субстрата в непосредственном окружении рассматриваемого фермента. Мембраны обеспечивают прохождение метаболитов из одного компартмента в другой, что осуществляется с помощью "челночных механизмов", переводящих метаболиты в форму, которая способна проходить через мембрану. С другой стороны, в связи с наличием мембран между компартментами, например митохондриями и цитозолем, а также изменением первоначальных форм молекул метаболитов в процессе их трансмембранного переноса, возникает потребность в наличии и функционировании цитозольных форм некоторых ферментов. Независимая регуляция этих ферментов облегчается регулируемым потоком поступающих или убывающих молекул субстрата и продуктов реакции.

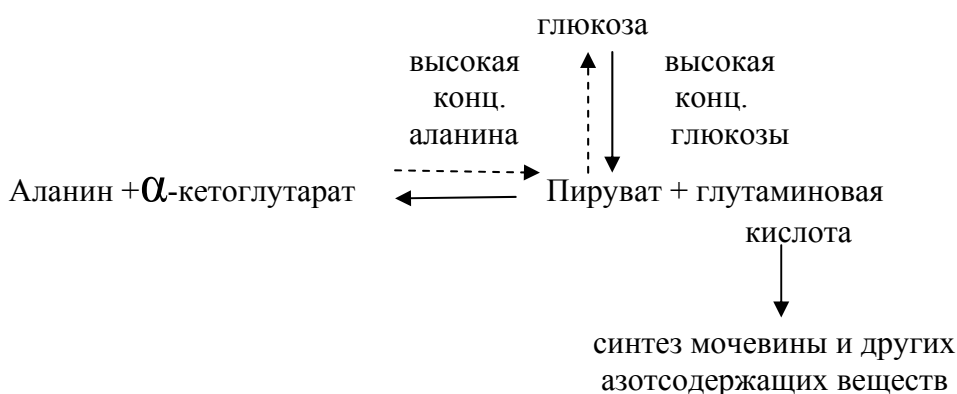
В каждом компартменте локализованы специализированные структурно функционально взаимосвязанные ферментные системы. Так, например, в матриксе митохондрий клеток печени локализованы ферментные системы биологического окисления пируватдегидрогеназного комплекса, цикла трикарбоновых кислот, β -окисления жирных кислот, трансдезаминирования аминокислот, ферменты начальных реакций синтеза мочевины и глюконеогенеза, а во внутренней мембране митохондрий расположены ферментные ансамбли дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования.

В эндоплазматической сети локализованы ферменты гликолиза, гексозомонофосфатного окисления глюкозо-6-фосфата, ферментные системы микросомального окисления, ферментные системы синтеза жирных кислот, глюконеогенеза, синтеза гликогена и другие. Все клеточные компартменты структурно и функционально взаимосвязаны между собой. В мембранах каждого компартмента локализованы комплексы ферментов, катализирующих многоступенчатую последовательность метаболических реакций. Эти макромолекулярные ферментные комплексы позволяют координировать работу ферментов и регулируют перемещение интермедиатов по метаболическому пути. Мультиферментные системы в мембранах локализованы таким образом, что каждый фермент располагается в непосредственной близости от следующего фермента данной последовательности реакций. Благодаря этому сокращается время, необходимое для переноса промежуточных продуктов реакции от одного фермента к другому и вся последовательность реакций оказывается строго скоординированной во времени и пространстве. Это обеспечивает более эффективный метаболический контроль, чем в том случае, когда компоненты комплекса изолированы друг от друга. Кроме того, конформационные изменения в одном из протомеров комплекса ферментов могут вызвать кооперативные изменения других компонентов системы, что позволяет усиливать регуляторные эффекты.

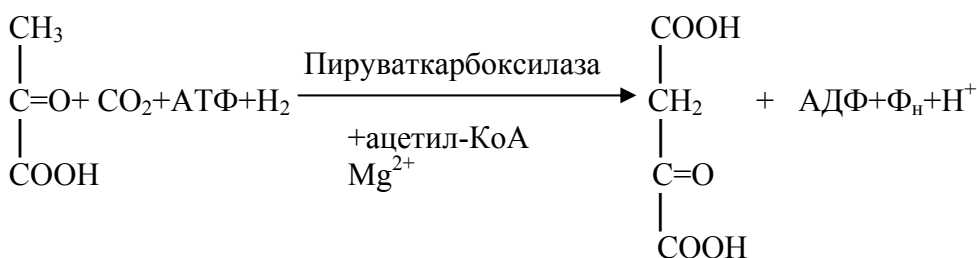
Локальное увеличение концентрации молекул субстрата в компартменте приводит

к активации ферментов соответствующего цикла, ускорению реакции и увеличению количества молекул продуктов реакции, что, однако, не приводит к обратимости реакции (как вследствие проявления закона действующих масс) поскольку в реальных условиях реакция обычно протекает в одном направлении, так как образовавшиеся продукты являются субстратами для действия других ферментов в других отсеках, куда они переносятся с помощью "челночных механизмов". Это создаёт условия оптимизации активности ферментов обоих компартментов за счёт удаления продуктов реакции из одних и поступления этих продуктов уже в качестве специфических субстратов в другие компартменты. Вследствие этого в клетке устанавливается устойчивое динамическое состояние, но не химическое равновесие.

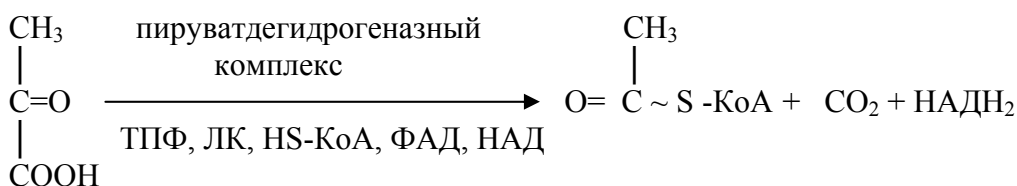
Приуроченность ферментных систем к определённым структурам (компартментам) клетки обеспечивает интеграцию внутриклеточных функций и соответствующий контроль. Так, например, при снижении содержания глюкозы в крови активируются ферменты глюконеогенеза. В биосинтезе глюкозы из аминокислот, лактата, пирувата участвует ряд ферментов, часть из которых локализована в митохондриях, а часть в цитозоле (семь из десяти ферментов гликолиза являются общими и для глюконеогенеза). В катализируемых этими ферментами обратимых химических реакциях концентрация реагентов реакции и соответственно направление реакции регулируется влиянием закона действующих масс. Например, это может быть показано в обратимой реакции трансаминирования, катализируемой ферментом аланинаминотрансферазой:



В пируватдегидрогеназной реакции, где активатором фермента является избыток ацетил-КоА, пируват преобразуется в оксалоацетат:



Однако, в условиях дефицита ацетил-КоА активируется пируватдегидрогеназный комплекс и продуктом декарбоксилирования пирувата является ацетил -КоА



Регуляция количества молекул фермента в клетке путём индукции и репрессии его синтеза.

Индукцированный (адаптивный) и конституитивный синтез.

Количество и разнообразие ферментов, синтезируемых в клетке, определяется степенью их участия в метаболизме.

Обычно клетки содержат небольшое, но измеримое количество фермента. Это - базовый уровень. В ответ на присутствие специфических низкомолекулярных индукторов клетки синтезируют специфические ферменты. Так в клетках *Escherichia Coli*, выращенных в среде содержащей глюкозу (источник углерода и энергии), при замене в среде глюкозы на лактозу индуцируется синтез фермента В-галактозидаза. Культура клеток приобретает способность расщеплять лактозу на глюкозу и галактозу.

Индукция ферментов наблюдается и у млекопитающих. Так, содержание ферментов в клетках может изменяться в результате действия различных физиологических и гормональных факторов, а также под влиянием диеты. Примерами индуцируемых ферментов у млекопитающих является тирозинтрансминаза, серин - и треониндегидрогеназа, триптофанпиринолаза, ферменты цикла синтеза мочевины, инвертаза и др.

Под действием лекарственных соединений, некоторых ядов, алколоидов повышается активность микросомальных оксидаз – индуцируется синтез цР₄₅₀ и других ферментов микросомальной окислительной системы – гидроксилаз(монооксигеназ) эндоплазматической сети клеток печени.

При индукции синтеза наблюдается повышение содержания ферментов, варьирующее от двукратного до четырёхкратного, что определяется характером и величиной отклика ответной реакции генетической информации на введение индуктора.

В прокариотических и эукариотических клетках имеются ферменты, концентрация которых в клетке не зависит от добавления индукторов - это так называемые конституитивные ферменты. Конституитивные ферменты обеспечивают стационарность структурной организации, ее функциональное состояние и базальный уровень энергетического обеспечения функций клетки.

Так как содержащаяся в клетке наследственная информация определяет и характер, и величину реакции на введение индуктора, понятие «индуцируемый» и "конституитивный» относительны: они характеризуют лишь крайние точки всего спектра возможных реакций.

Репрессия и дерепрессия синтеза ферментов. Концентрация ряда ферментов в клетках резко снижается при повышении содержания конечных продуктов, образующихся в процессе катализа. Такой эффект получил название репрессии ферментов. Так добавление гистидина в среду, на которой выращиваются бактерии *Salmonella typhimurium*, репрессируется синтез всех ферментов участвующих в биосинтезе гистидина, а добавление в среду лейцина подавляет синтез первых трёх ферментов участвующих в биосинтезе лейцина. Таким образом, конечный продукт выступает в качестве корепрессора. После удаления из среды корепрессора или же при истощении его запасов биосинтез соответствующих ферментов возобновляется. Это явление называется дерепрессией.

Регуляция синтеза и распада ферментов. В животных клетках синтез ферментов детерминирован информацией, содержащейся в ДНК, и регулируется индуктором или корепрессором белкового синтеза – гормоном, биологически активным соединением, метаболитами. Абсолютное количество фермента в клетке определяется скоростью его синтеза и распада. Распад ферментов происходит в результате их гидролиза протеолитическими ферментами и сопряжены с изменением конформации молекул фермента и с изменением концентрации АТФ. Присутствие или отсутствие субстратов, коферментов, ионов металлов способно влиять на конформацию белка и его

чувствительность к протеолизу, от чего может зависеть скорость распада специфических ферментов.

В механизме синтеза и распада ферментов ведущее место занимает антагонизм и синергизм действия гормонов, которые являются не только индукторами или репрессорами синтеза ферментов, но и ингибиторами активности определённых ферментов. Так инсулин активирует гексокиназу, гликогенсинтазу, фосфодиэстеразу и тормозит активность фосфорилазы гликогена. Глюкокортикоиды активируют синтез и активность ферментов глюконеогенеза.

Постсинтетическая химическая модификация ферментов и их каталитическая активность.

Постсинтетическая химическая модификация имеет решающее значение при формировании третичной структуры молекулы фермента и в образовании его активного центра. При этом изменение первичной структуры фермента, включение в молекулу специфических модулирующих компонентов небелковой природы обеспечивается одним или несколькими из ниже перечисленных механизмов:

1. частичный (избирательный) протеолиз проферментов
2. взаимодействие апофермента с эффективной концентрацией кофакторов
3. взаимодействие фермента с определёнными веществами – реагентами (активаторы, ингибиторы)
4. достройка фермента путём метилирования, гликолизирования, уридилирования, аденилирования, АДФ-риболизирования и другие
5. белок-белкового взаимодействия при участии вторичных посредников
6. фосфорилирование и дефосфорилирование
7. аллостерическое модулирование каталитической активности фермента низкомолекулярными эффекторами

Ферментативная активность многих протеолитических ферментов пищеварительного тракта, поджелудочной железы, ферментов системы свёртывания крови, системы фибринолиза и ряда других ферментов реализуется путём превращения неактивного профермента в каталитически активную форму. Под влиянием специфических ферментов протеаз проферменты подвергаются избирательному протеолизу, в результате отщепляется часть пептидной цепи, происходит перестройка пространственной структуры молекулы фермента, формируется активный центр. Например, протеолитический фермент трипсин образуется из профермента трипсиногена, синтезируемого в клетках поджелудочной железы. Трипсиноген секретируется в панкреатический сок, который выводится в 12-перстную кишку, где под действием фермента кишечного сока энтерокиназы от N-конца трипсиногена отщепляется гексапептид – ингибитор, в результате чего неактивный предшественник превращается в фермент трипсин. Свёртывание крови осуществляется рядом ферментов протеиназ. Активация этих ферментов происходит в результате каскада последовательных реакций частичного протеолиза проферментов, когда активированный предыдущий фермент активирует следующий. Активирование ферментов путём частичного протеолиза наиболее характерно для протеолитических ферментов внеклеточного катализа. Это связано с тем, что активация протеолитических ферментов в клетках их секретирующих может привести к протеолизу белков структурно-функционального аппарата клетки. Этот механизм защиты выработался в ходе эволюции, и заключается в том, что протеолитические ферменты образуются и хранятся в клетке в неактивной и безопасной форме профермента, а активируется вне секретирующей их клетки.

Внутриклеточная активация этих ферментов может привести к развитию патологического процесса, что, например, наблюдается при остром панкреатите.

К химической постсинтетической модификации ферментов относятся также реакции взаимодействия апофермента с кофактором, достройка фермента путём метилирования, гликолизирования, уридилирования, аденилирования, АДФ-рибозилирования, взаимодействие фермента с активаторами и ингибиторами.

В механизме химической модификации многих ключевых и регуляторных ферментов центральная роль принадлежит гормонрегулируемым системам: аденилатциклазной, гуанилатциклазной, инсулин-рецепторной и Ca^{2+} мессенджерной.

Направленность и тонкая регуляция биохимических процессов обеспечивается трансформацией гормонального сигнала через рецепторы плазматической мембраны, путём изменения в премембранной области концентрации вторичных посредников, уровень которых определяется активностью ферментов, катализирующих их биосинтез и распад.

В каждой из гормонрегулируемых систем посредники гормонального эффекта соответствуют определённому классу протеинкиназ – А, G, C, Ca^{2+} - кальмодулинзависимой. Активность протеинкиназ типа А регулируется ц-АМФ, протеинкиназы G- цГМФ, Ca^{2+} - кальмодулин зависимая протеинкиназа находится под контролем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , а протеинкиназа C регулируется диацилглицеролом в синергизме со свободным Ca^{2+} и кислыми фосфолипидами.

Повышение уровня определённых вторичных посредников приводит к активации соответствующего класса протеинкиназ и последующему фосфорилированию белков – ферментов определённого цикла реакций. В результате меняется не только активность, но и регуляторные и каталитические свойства многих ферментных систем клетки: структурных внутриклеточных элементов, ионных каналов и генетического аппарата.

Общим фундаментальным механизмом, посредством которого реализуются биологические эффекты "вторичных посредников" внутри клетки, является изменение третичной и четвертичной структуры различных протеинкиназ и протеинфосфатаз, катализирующих фосфорилирование и дефосфорилирование ферментов и других белков, что коренным образом изменяет как структуру, так и их функцию.

Протеинкиназа - ключевой внутриклеточный фермент, через который вторичные посредники реализуют свой эффект. Протеинкиназа может функционировать в двух формах. В отсутствие вторичных посредников протеинкиназы существуют в неактивной форме ди- и тетрамерных комплексов, состоящих из регуляторных (R) и каталитических (C) субъединиц.

Решающее значение в механизме активации протеинкиназ имеет изменение их четвертичной структуры, когда в присутствии вторичных посредников, в частности циклических нуклеотидов, протеинкиназный комплекс обратимо диссоциирует на R_2 - субъединицы и активные каталитические субъединицы C (механизм белок-белкового взаимодействия).

В клетках различных органов и тканей открыт большой класс ц-АМФ и ц-ГМФ-зависимых протеинкиназ (серин- и треонин-киназы), катализирующих фосфорилирование ОН-групп серина и треонина на разных внутриклеточных белках и оказывающих тем самым разные биологические эффекты.

Другой класс протеинкиназ, активируемых инсулиновыми рецепторами, действует только на ОН-группы тирозина. Фосфорилирование вызывает конформационные изменения соответствующих ферментов, что изменяет их активность или их кинетические свойства.

Уровень ц-АМФ и ц-ГМФ в клетках контролируется соответствующими фосфодиэстеразами, которые различаются по своему сродству к ц-АМФ и ц-ГМФ и катализируют их гидролиз до 5-нуклеозидмонофосфатов. Вследствие этого прекращается фосфорилирование белков-ферментов, меняется их активность, усиливается процесс их дефосфорилирования (реципрокный механизм регуляции).

Энзимодиагностика.

В плазме крови здоровых людей постоянно циркулируют ферменты, выполняющие физиологические функции (*секреторные ферменты*) – это липопротеинлипаза, сывороточная холинэстераза, проферменты свёртывающей системы крови, которые синтезируются в печени и концентрация их в крови намного выше, чем в клетках, где они синтезируются.

Вторая группа – нефункциональные ферменты плазмы крови (*индикаторные*) попадают в кровь из клеток тканей, где они выполняют определённые внутриклеточные функции. Увеличение количества индикаторных ферментов в плазме указывает на повышенную скорость деструкции клеток тканей, где ферменты образуются и функционируют.

Группа *эксcretорных ферментов* синтезируется главным образом в печени (щелочная фосфатаза, лейцинаминопептидаза др.) и выделяются в основном с жёлчью. При ряде заболеваний выделение эксcretорных ферментов с жёлчью нарушается, а активность их в плазме крови повышается.

Многие ферменты благодаря их строгому расположению в клетках определённых органов и тканей используются как маркёры тех или иных клеток и внутриклеточных структур.

Так кислая фосфатаза клеток печени локализована в лизосомах, каталаза, оксидаза Д-аминокислот – в пероксиомах, мембранные структуры микросом богаты цитохромом P₄₅₀, который катализирует реакции микросомального окисления. В плазматической мембране клеток локализованы аденилатциклаза и гуанилатциклаза, в цитоплазме – лактатдегидрогеназа, НАДФ·Н-цитохром с-редуктаза – в эндоплазматическом ретикуломе, ферменты орнитинового цикла мочевинообразования присутствуют в митохондриях и цитоплазме, причём одни из них (карбомиилфосфатсинтетаза I и орнитинкарбомиилфосфатаза) локализованы в митохондриях, а другие (аргининосукцинат-лиаза аргининосукцинат-синтетаза) – в цитоплазме.

Появление изоферментов или органоспецифических ферментов в сыворотке крови может представить интерес для дифференциальной диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей. По изменению содержания и спектра органоспецифических ферментов и изоферментов в сыворотке крови можно судить о топографии патологического процесса и степени поражения органов и тканей.

Так при инфаркте миокарда в сыворотке крови резко повышается активность креатинкиназы (изоформа ВМ), оксибутиратдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ₁ и ЛДГ₂), аминотрансфераз (АсАТ и в меньшей степени АлАТ). При злокачественных поражениях поджелудочной железы, при сахарном диабете в сыворотке крови повышена активность амилазы, липазы, трипсина и химотрипсина. При заболеваниях печени (вирусные гепатиты) в сыворотке крови увеличивается активность ферментов глутаматдегидрогеназы, сорбитолдегидрогеназы, лактатдегидрогеназ (ЛДГ₅ и ЛДГ₄), аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ).

Исследование ферментного состава плазмы крови при различных заболеваниях используется как метод диагностики болезней и метод контроля эффективности лечения.

Применение ферментов в медицине

Основные разделы	Ферменты	Примеры использования
Диагностика	Лактатдегидрогеназа (изофермент ЛДГ ₁)	Инфаркт миокарда
	Аспартатаминотрансфераза (АСТ)	Инфаркт миокарда
	Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	Заболевания печени (инфекц.гепатит), инфаркт миокарда
	Креатинфосфокиназа (КК) (изофермент МВ-сердечный тип изофермент ММ- мышечный тип ВВ- мозговой сосудистый тип)	Инфаркт миокарда Прогрессирующая дистрофия мышц Инсульт
	Кислая фосфатаза (КФ)	Рак предстательной железы
	α -Амилаза Липаза	Заболевания поджелудочной железы
Лечение	Пепсин	Нарушение переваривания белков в желудке, нарушение синтеза или секреции пепсина
	Трипсин, химотрипсин	Лечение гнойных ран
	Стрептокиназа, урокиназа	Предотвращение тромбообразования при пересадке органов и других операциях
	Гиалуронидаза	Рассасывание рубцов
	Аспарагиназа	Лечение некоторых злокачественных образований
	Нуклеазы(ДНК-азы)	Вирусный конъюнктивит, ринит, гнойный бронхит
	Уреазы	Удаление мочевины из организма в аппаратах "Искусственная почка"
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов	Глюкозооксидаза	Определение концентрации глюкозы в крови
	Холестеролоксидаза	Определение холестерина в крови
	Липаза	Определение триацилглицеринов в крови
	Уреаза	Определение мочевины в крови

Литература

1. А.А.Анисимов, А.Н.Леонтьева, И.Ф.Александрова, М.С.Каманина, Л.М.Бронштейн *Основы биохимии. Москва. Высшая школа 1986г.*
2. Т.Т.Берёзов, Б.Ф. Коровкин *Биологическая химия. Москва. Медицина. 1998г*
3. Л.Ленинджер *Основы биохимии. Часть I. Москва. "Мир" 1985г.*
4. Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Радуэлл *Биохимия человека. Москва. "Мир" 1993г.*
5. А.Я.Николаев *Биологическая химия. Москва. Высшая школа. 1989г.*
6. Е.С.Северин, А.Я.Николаев *Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Москва. "ГЭОТАР-Мед". 2001г.*
7. Л.Страйер *Биохимия. Том I Москва. "Мир". 1984г.*
8. Е.А.Строев *Биологическая химия. Москва. Высшая школа 1986г.*

Содержание

Предисловие	3
Раздел: Молекулярные основы жизнедеятельности и патологии.....	4
Тема: Ферменты: строение, свойства, механизм действия.....	4
Ферментативный катализ как механизм биологической регуляции.....	4
Общие и специфические свойства ферментов.....	5
Строение ферментов.....	6
Активный центр фермента.....	7
Аллостерический (регуляторный) центр фермента.....	9
Распределение ферментов в клетках организма. Полиферментные системы.....	9
Множественные молекулярные формы ферментов. Изоферменты.....	10
Специфичность ферментов как проявление конформационной и электростатической комплементарности между молекулами фермента и субстрата.....	11
Механизм действия ферментов.....	12
Тема: Свойства ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Регуляция активности ферментов.....	16
Основы кинетики ферментативных реакций.....	16
1. Температура среды и ферментативная активность.....	17
2. Зависимость ферментативной активности от pH.....	18
3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента.....	19
4. Зависимость скорости ферментативной реакции от времени.....	19
5. Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции. Кинетика реакции Уравнение Михаэлиса-Ментен.....	20
Активность фермента. Единицы активности.....	24
Активаторы ферментов.....	25
Ингибиторы ферментов.....	26
Конкурентное ингибирование.....	27
Неконкурентное ингибирование.....	28
Бесконкурентное ингибирование.....	28
Тип ингибирования и кинетика ферментативной реакции.....	28
Регуляция активности ферментов.....	30
Энзимодиагностика.....	36
Применение ферментов в медицине.....	37
Литература.....	38
Содержание.....	38