Ферменты

Обмен веществ в организме можно определить как совокупность всех химических превращений, которым подвергаются соединения, поступающие извне. Эти превращения включают все известные виды химических реакций: межмолекулярный перенос функциональных групп, гидролитическое и негидролитическое расщепления химических связей, внутримолекулярная перестройка, новообразование химических связей и окислительно - восстановительные реакции. Такие реакции протекают в организме с чрезвычайно большой скоростью только в присутствии катализаторов. Все биологические катализаторы представляют собой вещества белковой природы и носят названия ферменты (далее Ф, F) или энзимы (E).

Ферменты не являются компонентами реакций, а лишь ускоряют достижение равновесия увеличивая скорость как прямого, так и обратного превращения. Ускорение реакции происходит за счет снижении энергии активации – того энергетического барьера, который отделяет одно состояние системы (исходное химическое соединение) от другого (продукт реакции).

Ферменты ускоряют самые различные реакции в организме. Так достаточно простая с точки зрения традиционной химии реакция отщепления воды от угольной кислоты с образованием CO_2 требует участия фермента, т.к. без него она протекает слишком медленно для регулирования pH крови. Благодаря каталитическому действию ферментов в организме становится возможным протекание таких реакций, которые без катализатора шли бы в сотни и тысячи раз медленнее.

Свойства ферментов

1. Влияние на скорость химической реакции: ферменты увеличивают скорость химической реакции, но сами при этом не расходуются.
Скорость реакции – это изменение концентрации компонентов реакции в единицу времени. Если она идет в прямом направлении, то пропорциональна концентрации реагирующих веществ, если в обратном – то пропорциональна концентрации продуктов реакции. Отношение скоростей прямой и обратной реакций называется константой равновесия. Ферменты не могут изменять величины константы равновесия, но состояние равновесия в присутствии ферментов наступает быстрее.

2. Специфичность действия ферментов. В клетках организма протекает 2-3 тыс. реакций, каждая из которые катализирутся определенным ферментом. *Специфичность действия фермента – это способность ускорять протекание одной определенной реакции, не влияя на скорость остальных, даже очень похожих.*

Различают:
<u>Абсолютную</u> – когда Ф катализирует только одну определенную реакцию (<u>аргиназа</u> – расщепление аргинина)
<u>Относительную</u> (групповую спец) – Ф катализирует определенный класс реакций (напр. гидролитическое расщепление) или реакции при участии определенного класса веществ.

Специфичность ферментов обусловлена их уникальной аминокислотной последовательностью, от которой зависит конформация активного центра, взаимодействующего с компонентами реакции.

Вещество, химическое превращение которого катализируется ферментом носит название *субстрат (S)*.

3. Активность ферментов – способность в разной степени ускорять скорость реакции. Активность выражают в:

1) Международных единицах активности – (МЕ) количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин.

2) Каталах (кат) – количество катализатора (фермента), способное превращать 1 моль субстрата за 1 с.

3) Удельной активности – число единиц активности (любых из вышеперечисленных) в исследуемом образце к общей массе белка в этом образце.

4) Реже используют молярную активность – количество молекул субстрата превращенных одной молекулой фермента за минуту.

Активность зависит в первую очередь ***от температуры***. Наибольшую активность тот или иной фермент проявляет при оптимальной температуре. Для Ф живого организма это значение находится в пределах +37,0 - +39,0 °С, в зависимости от вида животного. При понижении температуры, замедляется броуновское движение, уменьшается скорость диффузии и, следовательно, замедляется процесс образования комплекса между ферментом и компонентами реакции (субстратами). В случае повышения температуры выше +40 - +50 °С молекула фермента, которая является белком, подвергается процессу денатурации. При этом скорость химической реакции заметно падает (рис. 4.3.1.).

Рисунок 4.3.1.
Зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом от температуры. Максимальная скорость соответствует температуре тела человека (фермент человеческого организма).

Активность ферментов зависит также от ***pH среды***. Для большинства из них существует определенное оптимальное значение pH, при котором их активность максимальна. Поскольку в клетке содержатся сотни ферментов и для каждого из них существуют свои пределы опт pH, то изменение pH это один из важных факторов регуляции ферментативной активности. Так, в результате одной химреакции при участии определенного фермента pH опт которого лежит в перделах 7.0 – 7.2 образуется продукт, который является кислотой. При этом значение pH смещается в область 5,5 – 6.0. Активность фермента резко снижается, скорость образования продукта замедляется, но при этом активизируется другой фермент, для которого эти значения pH оптимальны и продукт первой реакции подвергается дальнейшему химическому превращению. (Еще пример про пепсин и трипсин).

Химическая природа ферментов. Строение фермента. Активный и аллостерический центры

Все ферменты это белки с молекулярной массой от 15 000 до нескольких млн Да. По химическому строению различают простые ферменты (состоят только из АК) и сложные ферменты (имеют небелковую часть или простетическую группу). Белковая часть носит название – *апофермент,* а небелковая, если она связана ковалентно с апоферментом, то называется *кофермент,* а если связь нековалентная (ионная, водородная) – *кофактор*. Функции простетической группы следующие: участие в акте катализа, осуществление контакта между ферментом и субстратом, стабилизация молекулы фермента в пространстве.

В роли кофактора обычно выступают неорганические вещества - ионы цинка, меди, калия, магния, кальция, железа, молибдена.

Коферменты можно рассматривать как составную часть молекулы фермента. Это органические вещества, среди которых различают: нуклеотиды (АТФ, УМФ, и пр), витамины или их производные (ТДФ – из тиамина (B_1), ФМН – из рибофлавина (B_2), коэнзим А – из пантотеновой кислоты (B_3), НАД и пр) и тетрапиррольные коферменты – гемы.

В процессе катализа реакции в контакт с субстратом вступает не вся молекула фермента, а определенный ее участок, который называется активным центром. Эта зона молекулы не состоит из последовательности аминокислот, а формируется при скручивании белковой молекулы в третичную структуру. Отдельные участки аминокислот сближаются между собой, образуя определенную конфигурацию активного центра. Важная особенность строения активного центра - его поверхность комплементарна поверхности субстрата, т.е. остатки АК этой зоны фермента способны вступать в химическое взаимодействие с определенными группами субстрата. Можно представить, что активный центр фермента совпадает со структурой субстрата как ключ и замок.

В активном центре различают две зоны: *центр связывания*, ответственный за присоединение субстрата, и *каталитический центр*, отвечающий за химическое превращение субстрата. В состав каталитического центра большинства ферментов входят такие АК, как Сер, Цис, Гис, Тир, Лиз. Сложные ферменты в каталитическом центре имеют кофактор или кофермент.

Помимо активного центра ряд ферментов снабжен регуляторным (аллостерическим) центром. С этой зоной фермента взаимодействуют вещества, влияющие на его каталитическую активность.

Механизм действия ферментов

Акт катализа складывается из трех последовательных этапов.

1. Образование фермент-субстратного комплекса при взаимодействии через активный центр.

2. Связывание субстрата происходит в нескольких точках активного центра, что приводит к изменению структуры субстрата, его деформации за счет изменения энергии связей в молекуле. Это вторая стадия и называется она активацией субстрата. При этом

происходит определенная химическая модификация субстрата и превращение его в новый продукт или продукты.

3. В результате такого превращения новое вещество (продукт) утрачивает способность удерживаться в активном центре фермента и фермент-субстратный, вернее уже фермент-продуктный комплекс диссоциирует (распадается).

Виды каталитических реакций:

А+Е = АЕ = БЕ = Е + Б
А+Б +Е = АЕ+Б = АБЕ = АБ + Е
АБ+Е = АБЕ = А+Б+Е, где Е - энзим, А и Б - субстраты, либо продукты реакции.

<u>Ферментативные эффекторы</u> - вещества, изменяющие скорость ферментативного катализа и регулирующие за счет этого метаболизм. Среди них различают ***ингибиторы*** - замедляющие скорость реакции и ***активаторы*** - ускоряющие ферментативную реакцию.

В зависимости от механизма торможения реакции различают конкурентные и неконкурентные ингибиторы. Строение молекулы конкурентного ингибитора сходно со структурой субстрата и совпадает с поверхностью активного центра как ключ с замком (или почти совпадает). Степень этого сходства может даже быть выше чем с субстратом.

Если А+Е = АЕ = БЕ = Е + Б , то И+Е = ИЕ ≠

Концентрация способного к катализу фермента при этом снижается и скорость образование продуктов реакции резко падает (рис. 4.3.2.).

Рисунок. 4.3.2. Влияние ингибитора на скорость образования продукта реакции, катализируемой ферментом.

В качестве конкурентных ингибиторов выступает большое число химических веществ эндогенного и экзогенного происхождения (т.е. образующихся в организме и

поступающих извне – ксенобиотики, соответственно). Эндогенные вещества являются регуляторами метаболизма и называются антиметаболитами. Многие из них используют при лечении онкологических и микробных заболеваний, тк. они ингибируют ключевые метаболичекие реакции микроорганизмов (сульфаниламиды) и опухолевых клеток. Но при избытке субстрата и малой концентрации конкурентного ингибитора его действие отменяется.

Второй вид ингибиторов - неконкурентные. Они взаимодействую с ферментом вне активного центра и избыток субстрата не влияет на их ингибирующую способность, как в случае с конкурентными ингибиторами. Эти ингибиторы взаимодействуют или с определенными группами фермента (тяжелые металлы связываются с тиоловыми группами Цис) или чаще всего регуляторным центром, что снижает связывающую способность активного центра. Собственно процесс ингибирования - это полное или частичное подавление активности фермента при сохранении его первичной и пространственной структуры.

Различают также обратимое и необратимое ингибирование. Необратимые ингибиторы инактивируют фермент, образуя с его АК или другими компонентами структуры химическую связь. Обычно это ковалентная связь с одним из участков активного центра. Такой комплекс практически недиссоциирует в физиологических условиях. В другом случае ингибитор нарушает конформационную структуру молекулы фермента - вызывает его денатурацию.

Действие обратимых ингибиторов может быть снято при переизбытке субстрата или под действием веществ, изменяющих химическую структуру ингибитора. Конкурентные и неконкурентные ингибиторы относятся в большинстве случаев к обратимым.

Помимо ингибиторов известны еще активаторы ферментативного катализа. Они:

1) защищают молекулу фермента от инактивирующих воздействий,
2) образуют с субстратом комплекс, который более активно связывается с активным центром Ф,
3) взаимодействуя с ферментом, имеющим четвертичную структуру, разъединяют его субъединицы и тем самым открывают доступ субстрату к активному центру.

Распределение ферментов в организме

Ферменты, участвующие в синтезе белков, нуклеиновых кислот и ферменты энергетического обмена присутствуют во всех клетках организма. Но клетки, которые выполняют специальные функции содержат и специальные ферменты. Так клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе содержат ферменты, катализирующие синтез гормонов инсулина и глюкагона. Ферменты, свойственные только клеткам определенных органов называют органоспецифическими: аргиназа и урокиназа - печень, кислая фосфатаза - простата. По изменению концентрации таких ферментов в крови судят о наличии патологий в данных органах.

В клетке отдельные ферменты распределены по всей цитоплазме, другие встроены в мембраны митохондрий и эндоплазматического ретикулума, такие ферменты образуют ***компартменты,*** в которых происходят определенные, тесно связанные между собой этапы метаболизма.

Многие ферменты образуются в клетках и секретируются в анатомические полости в неактивном состоянии - это проферменты. Часто в виде проферментов образуются

протеолитические ферменты (расщепляющие белки). Затем под воздействием pH или других ферментов и субстратов происходит их химическая модификация и активный центр становится доступным для субстратов.

Существуют также ***изоферменты*** - ферменты, отличающиеся по молекулярной структуре, но выполняющие одинаковую функцию.

Номенклатура и классификация ферментов

Название фермента формируется из следующих частей:

1. название субстрата с которым он взаимодействует
2. характер катализируемой реакции
3. наименование класса ферментов (но это необязательно)
4. суффикс -аза-

пируват - декарбоксил - аза, сукцинат - дегидроген - аза

Поскольку уже известно порядка 3 тыс. ферментов их необходимо классифицировать. В настоящее время принята международная классификация ферментов, в основу которой положен тип катализируемой реакции. Выделяют 6 классов, которые в свою очередь делятся на ряд подклассов (в данной книге представлены только выборочно):

1. Оксидоредуктазы. Катализируют окислительно-восстановительные реакции. Делятся на 17 подклассов. Все ферменты содержат небелковую часть в виде гема или производных витаминов B_2, B_5. Субстрат, подвергающийся окислению выступает как донор водорода.

1.1. Дегидрогеназы отщепляют от одного субстрата водород и переносят на другие субстраты. Коферменты НАД, НАДФ, ФАД, ФМН. Они акцептируют на себе отщепленный ферментом водород превращаясь при этом в восстановленную форму (НАДН, НАДФН, ФАДН) и переносят к другому фермент-субстратному комплексу, где его и отдают.

1.2. Оксидазы - катализирует перенос водорода на кислород с образованием воды или H_2O_2. Ф. <u>Цитохромокисдаза</u> дыхательной цепи.

$$RH + NAD\ H + O_2 = ROH + NAD + H_2O$$

1.3. Монооксидазы - <u>цитохром Р450</u>. По своему строению одновременно гемо- и флавопротеид. Он гидроксилирует липофильные ксенобиотики (по вышеописанному механизму).

1.4. <u>Пероксидазы</u> и <u>каталазы</u> - катализируют разложение перекиси водорода, которая образуется в ходе метаболических реакций.

1.5. Оксигеназы - катализируют реакции присоединения кислорода к субстрату.

2. Трансферазы - катализируют перенос различных радикалов от молекулы донора к молекуле акцептору.

$$A\mathbf{a} + E + B = E\mathbf{a} + A + B = E + B\mathbf{a} + A$$

2.1. Метилтрансферазы (CH_3-).

Карбоксил- и карбамоилтрансферазы.

2.2. Ацилтрансферазы – Кофермент А (перенос ацильной группы -R-C=O).
Пример: синтез нейромедиатора ацетилхолина (см. главу "Обмен белков").

2.3. Гексозилтрансферазы - катализируют перенос гликозильных остатков.
Пример: отщепление молекулы глюкозы от гликогена под действием фосфорилазы.

2.4. Аминотрансферазы - перенос аминогрупп

$$R1\text{-}CO\text{-}R2 + R1\text{-}CH\text{-}\mathbf{NH_3}\text{-}R2 = R1\text{-}CH\text{-}\mathbf{NH_3}\text{-}R2 + R1\text{-}CO\text{-}R2$$

Играют важную роль в превращении АК. Общим коферментом являнтся пиридоксальфосфат.
Пример: аланинаминотрансфераза (АлАТ): пируват + глутамат = аланин + альфа-кетоглутарат (см. главу "Обмен белков").

2.5. Фосфотрансфереза (киназа) - катализируют перенос остатка фосфорной кислоты. В большинстве случает донором фосфата является АТФ. В процессе расщепления глюкозы в основном принимают участие ферменты этого класса.
Пример: Гексо (глюко)киназа**.**

3. Гидролазы - катализируют реакции гидролиза, т.е. расщепление веществ с присоединением по месту разрыва связи воды. К этому классу относятся преимущественно пищеварительные ферменты, они однокомпонентные (не содержат небелковой части)

$$R1\text{-}R2 + H_2O = R1H + R2OH$$

3.1. Эстеразы - расщепляют эфирные связи. Это большой подкласс ферментов, катализирующих гидролиз тиоловых эфиров, фосфоэфиров.
Пример: липаза.

3.2. Гликозидазы - расщепляют гликозидные связи в молекулах поли- и олигосахаридов.
Пример: амилаза, сахараза, мальтаза.

3.3. Пептидазы - катализируют гидролиз пептидных связей.
Пример: карбоксипептидаза, химотрипсин, трипсин.

3.5. Амидазы - расщепляют амидные связи ($CO\text{-}NH_2$).
Пример: аргиназа (цикл мочевины).

4. Лиазы *- катализируют реакции расщепления молекул без присоединения воды. Эти* ферменты имеют небелковую часть в виде тиаминпирофосфата (B_1) и пиридоксальфосфата (B_6).

4.1. Лиазы связи C-C. Их обычно называют декарбоксилазами.
Пример: пируватдекарбоксилаза.

4.2. Лиазы связи (гидратазы-дегидратазы) C-O.
Пример: енолаза.

4.3. Лиазы связи C-N.

4.4. Лиазы связи C-S.

5. Изомеразы - катализируют реакции изомеризации.

Пример: фосфопентозоизомераза, пентозофосфатизомераза (ферменты неокислительной ветви пентозофосфатного пути).

6. Лигазы катализируют реакции синтеза более сложных веществ из простых. Такие реакции идут с затратой энергии АТФ. К названию таких ферментов прибавляют "синтетаза".