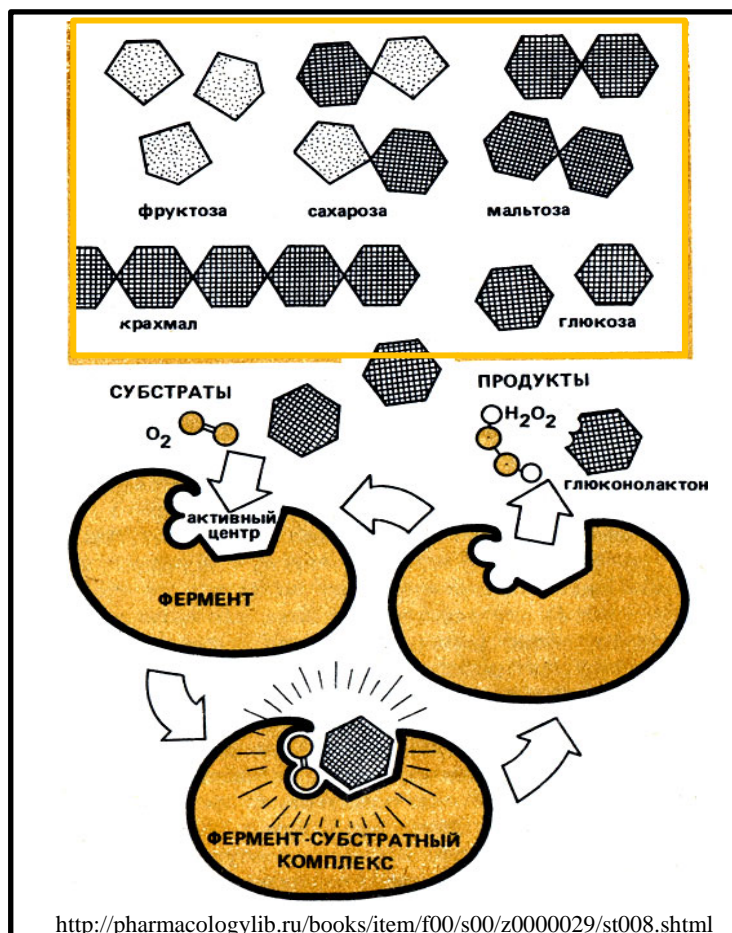


КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЬИ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ



Абрамова З.И.

Биохимия: ферменты и коферменты  
Сборник задач и упражнений

Казань-2021

УДК 577.151

Рекомендовано к публикации учебно-методической комиссией ИФМиБ,  
протокол №4 от 15.06.2021

Составитель:

д.б.н. профессор Абрамова З.И.

Рецензент:

Заведующий кафедрой биохимии и клинической лабораторной  
диагностики ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России: д.м.н. профессор  
Мустафин И.Г.

---

Биохимия: ферменты и коферменты. Сборник задач и упражнений /  
Учебное пособие. Часть 2- испр. и доп. / З.И. Абрамова. - Казань: КФУ, 2021.-  
\_\_\_с.

Сборник является частью учебного комплекса по курсу «Биохимия»,  
раздел «Энзимология» В сборнике содержатся теоретический материал,  
задачи, упражнения и вопросы, решение которых способствует закреплению  
материала в процессе самостоятельной работы студентов.

## Введение

Сборник «Биохимия: ферменты и коферменты». представляет собой 2 часть учебного комплекса по курсу «Биохимия». В нем содержатся задачи, упражнения и вопросы по структуре, свойствам и механизме действия ферментов.

В пособии представлены теоретический материал по 9 темам и методические указания для самостоятельной работы студентов по разделам: «Структура и свойства ферментов», «Регуляция активности и компартментализация ферментов», «Коферменты», «Классификация и номенклатура ферментов» и «Кинетика ферментов».

Задачи расположены в порядке возрастания сложности, начиная от простых и заканчивая задачами по обработке числовых данных.

Учебное пособие может помочь научить студентов вникать в смысл научного исследования, правильно интерпретировать результаты и использовать свои знания для практического решения задач биохимии, в частности раздела по Энзимологии.

## Теоретическая часть

### Тема 1 - Наука энзимология. Основные понятия и принципы механизма действия ферментов. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии. Значение энзимологии

План:

1. Наука энзимология, ее содержание и задачи.
2. Термин «энзим». Две главные задачи энзимологии в ее современном физико-химическом и молекулярном понимании.
3. Биологическая роль ферментов: Общие и специфические свойства ферментов
4. История развития энзимологии. Первое научное представление о ферментах.
5. Развитие учения о ферментах. А.Я. Данилевский и А.Н. Бах - основоположники отечественной биохимии, их роль в развитии энзимологии.
6. Вклад А.Е. Браунштейн в развитие энзимологии в России .
7. Последовательные этапы изучения химической природы ферментов, их физико-химических свойств и каталитического действия.
8. Значение работ отечественных учёных в развитии энзимологии
9. Современные достижения в изучении ферментов. Абзимы

Энзимология - раздел биохимии, который изучает ферменты. Ферменты - специфические катализаторы белковой природы, ускоряющие течение определенных химических реакций и играющие важнейшую роль в обмене веществ. Для того чтобы произошла химическая реакция, например, надо к молекуле присоединить или, наоборот, отнять группу атомов, для этого необходимо затратить энергию. Это дополнительное количество энергии, расходуемое для осуществления реакции между молекулами, называется энергией активации. Согласно законам химической кинетики, чем ниже энергия активации, тем быстрее протекают реакции. Механизм действия ферментов как раз и заключается в снижении энергии активации, необходимой для прохождения химической реакции.

Ферментативная реакция осуществляется в несколько этапов (см рисунок): сначала реагирующее вещество (субстрат, S) соединяется с ферментом (E) с образованием фермент-субстратного комплекса. В субстрате, соединённом с ферментом, происходит ослабление химических связей между определенными атомами, потому что фермент вызывает в нём поляризацию, смещение электронов, деформацию связей. Молекула субстрата при этом становится более реакционноспособной. Фермент-субстратный комплекс за счёт дополнительной энергии, называемой энергией активации, переходит в активированное состояние - активированный комплекс  $ES^*$ . Дополнительная

энергия (энергия активации) обеспечивает разрыв определенных химических связей в субстрате и образование комплекс продуктов реакции с ферментом (EP).

### Главные этапы ферментативной реакции:



Наконец, продукты реакции отделяются от фермента, и он снова может соединиться с новыми молекулами субстрата.

Так как при образовании фермент-субстратного комплекса химические связи в субстрате уже были ослаблены, дополнительной энергии, необходимой для разрыва этих связей, нужно затратить меньше. Поэтому энергия активации для комплекса субстрат-фермент будет меньше, чем энергия активации чистого субстрата.

Следовательно, роль фермента сводится к понижению энергии активации биохимической реакции.

От обычных функциональных белков ферменты отличает то, что на поверхности белковой глобулы имеется активный центр. Это участок, образованный из различных аминокислотных остатков, собранных из различных областей полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата. При этом субстратом называется химическое соединение, претерпевающее изменение в ходе каталитического процесса, с образованием продукта реакции.

Кроме активного центра, у некоторых ферментов имеется еще и регуляторный участок - аллостерический центр (АлЦ). В этом участке связываются молекулы, оказывающие влияние на превращение субстрата в химической ферментативной реакции. При этом сами ферменты не претерпевают изменений.

В активном центре фермента располагаются аминокислотные остатки, содержащие функциональные группы (-SH, -COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>), которые принимают участие в каталитическом процессе. Условно активный центр фермента можно разделить на два участка: сорбционный, отвечающий за связывание субстрата, и каталитический, в котором происходит превращение субстрата. Размер активного центра фермента определяется размером субстрата, реализуя в действии принцип индуцированного соответствия. Геометрия расположения функциональных групп активного центра соответствует природе субстрата, определяя эффективность его связывания и превращение в ходе химической ферментативной реакции.

Константа, характеризующая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента, называется каталитической константой (K<sub>к</sub>), а константа, определяющая сродство субстрата к ферменту - константой связывания (K<sub>с</sub>). Действие эффекторов (активаторов и ингибиторов) определяют с помощью констант активирования (K<sub>а</sub>) и ингибирования (K<sub>и</sub>).

Активность фермента зависит от природы фермента, субстрата, их концентраций, меж субъединичных взаимодействий белковых глобул, состава раствора, природы растворителя, ионной силы раствора, рН среды, присутствия ингибиторов и активаторов, температуры, давления, УФ-облучения и других физических факторов.

С повышением температуры среды активность ферментов возрастает, однако при температуре выше 50°C наблюдается снижение активности фермента из-за разрушения нативной структуры белковой глобулы. Возрастание температуры сопровождается увеличением подвижности функциональных групп в области активного центра и изменением нативной конформации белка.

Влияние рН на активность фермента может проявляться через ассоциативное поведение ионизирующих групп активного центра и функциональных групп субстрата. На активность фермента может также повлиять поведение групп, расположенных на поверхности белковой глобулы, ионизация которых может приводить к изменению конформации белка фермента.

*Возникновение понятия «Ферментация».*

Термин *фермент* предложен в XVII веке химиком Ван-Гельмонтом при обсуждении механизмов пищеварения. Более 100 лет назад термины *фермент* и *энзим* отражали различные точки зрения в теоретическом споре Д. Пастера с одной стороны, и М. Бертло и К. Либиха – с другой, о причине спиртового брожения. Собственно *ферментами* (от лат. *fermentum*-закваска) называли «организованные ферменты» (т.е. сами живые микроорганизмы), а термин предложен был в 1876 г. В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретлируемых клетками, например, в желудок пепсин.

Определение. Ферменты, или энзимы, представляют собой высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемый живыми организмами для осуществления с высокой скоростью тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение множества разнообразных химических соединений.

Жизнь и многообразие ее проявлений – сложная совокупность химических реакций, катализируемых специфическими ферментами.

Иван Петрович Павлов считал ферменты «возбудителями всех химических превращений» у живых существ.

Как известно, важнейшим свойством живого организма является обмен веществ, ускоряющим аппаратом, основой молекулярных механизмов интенсивности которого являются ферменты.

«Вся тайна животной жизни, – писал Д.И. Менделеев, – заключается в непрерывных химических превращениях веществ, входящих в состав животных тканей».

В настоящее время теоретические и практические достижения энзимологии используются в решении многих проблем биохимии и молекулярной биологии, включая их сравнительное и эволюционное рассмотрение.

«Под знаком молекулярной энзимологии, – говорил на III Всесоюзном биохимическом съезде (1974) Алексей Евсеевич Браунштейн, – развивается и встречное течение – реконструкция или интеграция, восходящая от молекулярного яруса к высшим уровням структурно-функциональной организации живого и пронизывающая весь комплекс актуальных проблем биологии и медицины».

Ферменты обеспечивают осуществление важнейших процессов жизнедеятельности, - экспрессия (реализация) наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биомолекул (обмен веществ).

Изучение их способствует проникновению в суть и сокровенные тайны того загадочного явления, которое мы называем жизнью. Этими обстоятельствами может быть объяснено пристальное внимание исследователей к проблемам структуры, функций и молекулярных механизмов действия ферментов.

От неорганических катализаторов ферменты отличаются рядом особенностей: ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют в миллионы и миллиарды раз более высокую каталитическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела), нормального давления и в области близких к нейтральным значениям рН среды.

Ферменты отличаются: высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата, так и типа реакции, т.е. каждый фермент катализирует в основном только определенную химическую реакцию.

Для каждого фермента характерны специфическая последовательность расположения аминокислотных остатков и пространственная конформация. Существенной особенностью является то, что в клетках их активность строго контролируется как на генетическом уровне, и посредством определенных низкомолекулярных соединений, в частности субстратов и продуктов их реакций, катализируемых этими же ферментами, -или ингибиторов.

Таким образом, молекула фермента характеризуется уникальностью структуры, которая и определяет уникальность ее функции.

Учение о ферментах выделено в самостоятельную науку – энзимологию. Термин «энзим» (от греч. en zyme – в дрожжах), так же как и «фермент» (от лат. fermentatio – брожение), означает процесс, связанный с выделением газов или брожение.

Явления брожения и переваривания известны с незапамятных времен, однако зарождение учения о ферментах (энзимология) относится к первой половине XIX в.

#### *История развития энзимологии.*

Первое научное представление о ферментах было дано еще в 1814 г. петербургским ученым К.С. Кирхгофом, который показал, что не только проросшие зерна ячменя, но и экстракты из солода способны осахаривать крахмал с превращением его в мальтозу.

В 1833 г. французские химики А. Пайен и Ж.-Ф. Персо получили из проросших зерен ячменя «вещество, разжижающее крахмал». При этом они тогда уже обнаружили у этого вещества свойства, которые по современным



представлениям, относят к определяющим универсальным свойствам ферментов. Например, от носительно небольшие количества препарата могли разжижать большое количество крахмала, но при нагревании препарат утрачивал эту способность. Активная субстанция могла быть получена в порошковообразном виде из раствора, а после повторного растворения в воде вновь становилась активной. Описанная субстанция, получившая название диастераза (от греч. *dia*-через и *stasis*-стояние, разделение), была первым, растительным ферментом, изученным в очищенном виде в лаборатории. Это был и первый энзим, полученный в концентрированной форме, хотя само это слово (нем. *enzym*) немецкий физиолог В. Кюне придумал только в 1878 г. Названия всех открытых с тех пор ферментов имеют суффикс «аз». В конечном итоге им оказалась амилаза.

В 1836 г. Т.Шванн обнаружил и описал пепсин, в том же году И. Пиркин и И. Папенгейм охарактеризовали трипсин.

Основатель кафедры медицинской химии в Казанском императорском университете Данилевский Александр Яковлевич Российский биохимик, физиолог, фармаколог, один из основоположников русской биохимии.

Многочисленные исследования А.Я. Данилевского посвящены преимущественно протеолитическим ферментам, химии белков и вопросам питания.

Он экспериментально доказал, что действие сока поджелудочной железы на белки представляет собой реакцию гидролиза; разработал адсорбционный метод разделения ферментов поджелудочной железы. Создал теорию строения белковой молекулы и предложил разделение белковых фракций на глобулиновую, строминовую и нуклеиновую. Им изучена устойчивость стенок желудка и кишечника к ферментам желудочно-кишечного тракта, описаны вещества «антипепсин» и «антитрипсин», препятствующие самоперевариванию.

А. Байера и один из корифеев органической химии своего времени Р.М. Вильштеттер вместе со своими студентами начал систематическую разработку по выделению и очистке ферментов. Хотя при этом удалось получить очищенные ферменты, обладающие высокой активностью, белки в этих препаратах не были обнаружены. Поэтому Вильштеттер сделал, получивший признание в научных кругах, вывод о том, что ферменты – это органические соединения небелковой природы, а белки служат лишь носителями этих соединений.

Ещё несколько выдающихся ученых и их открытия связаны со становлением науки *Энзимология*:

Новый толчок к развитию биохимии биохимии дали работы по изучению брожения, инициированные Л.Патером.

В 1897г. Э. Бухнер доказал, что ферментация сахара может происходить в присутствии бесклеточного дрожжевого экстракта и этот процесс не столько биологический, сколько химический.

На рубеже 19-20 веков Э. Фишер установил структуру и свойства почти всех аминокислот и предложил первую теорию специфичности ферментов.

В 1926 году (который считается официальным годом рождения энзимологии как науки) Самнер выделил кристаллическую уреазу и доказал ее белковую природу. В 1930 Дж. Нортроп выделил пепсин.

В начале 20 века 1913 Л. Михаэлис сформулировал общую теорию кинетики ферментативных реакций.

Впервые первичная структура (аминокислотная последовательность аминокислот) фермента была установлена У. Стейном и С. Муром в 1960 для рибонуклеазы А,

В 1969 Р. Меррифилдом осуществлен хим. синтез этого фермента

Пространственное строение (третичная структура) фермента впервые установлено Д. Филлипсом в 1965 для лизоцима.

Во 2-й половине 20 века каталитическая активность была открыта Томасом Р. Чеком. также у некоторых РНК (их называли рибозимы).

С тех пор было обнаружено и выделено более 700 ферментов, но в живых организмах их существует гораздо больше.

Итак.

Наибольшее внимание исследователей привлекали процессы окисления в организме. Уже был известен феномен химического катализа, означающий, что многие реакции *in vitro* протекают быстро и энергично в присутствии ничтожных количеств примесей, как будто не участвующих в реакции. Так, была установлена большая каталитическая роль ряда неорганических веществ.

Горение глюкозы на воздухе, например, протекает очень медленно, а если добавить немного солей лития (или золы, также содержащей ничтожные количества лития), то горение идет весьма интенсивно:  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ .

Известно, что в живых организмах «горение» углеводов (а точнее, окисление) протекает быстро и до тех же конечных продуктов обмена, т.е.  $CO_2$  и  $H_2O$ , с выделением и накоплением энергии.

Однако это «горение» происходит при относительно низкой температуре, без пламени и, что особенно интересно, в присутствии воды. Разумеется, в этих необычных условиях без действия ферментов не было бы окисления углеводов. В процессе превращения, то есть окисления глюкозы в организме до  $CO_2$  и  $H_2O$

участвует последовательно около 15 различных ферментов (см. главу 10 Учебник-Березов, Коровкин).

### Ферменты

-не вызывают в отличие от неорганических катализаторов побочных реакций,

-не участвуют в реакциях, невозможных по термодинамическим условиям.

И те, и другие катализаторы только ускоряют химические реакции, обычно протекающие очень медленно. Примером может служить реакция расщепления перекиси водорода на кислород и воду, медленно протекающая в отсутствие катализатора. При добавлении мелкоизмельченной платины скорость этой реакции резко возрастает: 
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow[\text{(или каталаза)}]{\text{Платина}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2.$$

Эта же реакция будет протекать намного быстрее в присутствии фермента каталазы, содержащейся, в частности, в эритроцитах, причем образуются те же конечные продукты распада перекиси водорода.

Таким образом, можно считать установленным, что ферменты катализируют ряд химических реакций, аналогичных химическим реакциям, катализируемым неорганическими веществами.

Более того, считается установленным, что любую из протекающих в живых организмах (или клетках) химическую реакцию можно в принципе осуществить вне организма (или вне клетки), если экспериментатору удастся выделить соответствующий фермент (или систему ферментов), катализирующий данную реакцию, и создать оптимальные условия для его действия.

Общие свойства ферментов и неорганических катализаторов:

- катализаторы ускоряют только энергетически возможные реакции;
- никогда не меняют направления реакции;
- не изменяют равновесия обратимой реакции, а лишь ускоряют ее наступления;

- не входят в состав конечных продуктов реакции и выходят из реакции в первоначальном виде, хотя в последнее время доказано, что некоторые ферменты в конце химической реакции подвергаются модификации и даже распаду, а не освобождаются в неизменном виде;

- не расходуются в процессе катализа, поэтому фермент в клетке действует до тех пор, пока не разрушится.

Как всякие катализаторы, ферменты снижают энергию активации, необходимую для осуществления той или иной химической реакции, направляя её обходным путём – через промежуточные реакции, которые требуют значительно меньшей энергии активации.

Например, для осуществления реакции гидролиза дисахарида сахарозы, в результате которого образуются глюкоза и фруктоза, без участия катализатора требуется 32 000 кал (1 кал = 4,19 дж) на моль сахарозы. Если же реакция катализируется ферментом  $\beta$ -фруктофуранозидазой, то необходимая энергия активации составляет всего 9400 кал.

Подобное понижение энергии активации под влиянием фермента – следствие перераспределения электронных плотностей и некоторой деформации молекул субстрата, происходящей при образовании промежуточного соединения – фермент-субстратного комплекса.

Эта деформация, ослабляя внутримолекулярные связи, приводит к понижению необходимой энергии активации и, следовательно, ускоряет течение реакции.

Ферменты обладают специфическими свойствами, которые связаны с особенностями строения ферментов, и их белковой природой.

1. Эффективность ферментов выше, чем небелковых катализаторов (скорость протекания реакции при участии фермента на несколько порядков выше, чем с участием других катализаторов). Одна-единственная молекула фермента может катализировать при температуре (37<sup>0</sup>С) от тысячи до миллиона молекул вещества в минуту. Известно, например, что ионы железа каталитически ускоряют разложение пероксида водорода на воду и кислород. Однако атомы того же железа, но в составе фермента каталазы, действуют в 10 миллиардов раз энергичнее, и только 1 мг железа в ферменте способен заменить в этой реакции 10 тонн неорганического железа.

2. Ферменты обладают высокой специфичностью действия, т.е. избирательностью действия на субстраты, превращение которых они катализируют, чего не наблюдается для биологических катализаторов.

Каждый фермент каталитически ускоряет, как правило, одну-единственную химическую реакцию, или, в крайнем случае, группу реакций одного типа. Высокая специфичность позволяет ферментам участвовать в регуляции обмена веществ и направлять его в определенное русло.

3. Одной из важнейших свойств ферментов как является регулируемость их действия. Через регуляцию ферментного аппарата осуществляется скоординированность всех метаболических процессов во времени и пространстве, направленных на воспроизведение Живой материи, поддержание постоянства внутриклеточной среды, на приспособление к изменению условий.

4. Ферменты катализируют химические реакции в «мягких» условиях, то есть при невысокой температуре ~37- 40<sup>0</sup> С и рН среды 6-8, при нормальном давлении (1ат). Это отличает их от неферментных катализаторов, которые

действуют очень часто при высокой температуре, больших давлений, в сильноокислой или щелочной среде. Ферменты, благодаря белковому происхождению, очень чувствительны к изменениям температуры и к смещению рН среды, прекращая при этом свою активность.

5. При ферментативных реакциях, в отличие от не ферментативных, наблюдаются лишь незначительные побочные процессы. Для ферментативных реакций характерен почти 100% выход продуктов.

6. Выделенные из организма ферменты не утрачивают способности осуществлять каталитическую активность. На этом основывается их практическое использование в химической, фармацевтической, легкой промышленности и в медицине.

Особое значение для химического производства имеет специфичность ферментов: ведь до 80% затрат в производстве многих химических веществ идет на отделение примесей, образованных вследствие побочных реакций. Кроме того, ферменты позволяют осуществлять ряд процессов, выполнение которых обычными методами органического синтеза остается пока нерешенной проблемой.

7. Кооперативность и запрограммированность этапов действия - вот что отличает механизм биокатализа от действия катализаторов иной природы, т.е. процесс ферментативного катализа во многих случаях отличается серией последовательных реакций превращения веществ (цикличность).

В литературе появляются работы, в которых предлагаются основные направления исследований энзимологии будущего.

Направления исследований в области энзимологии:

1. Исследования более тонких деталей молекулярного механизма и принципов действия ферментов в соответствии с законами классической органической химии и квантовой механики, а также совершенствование теории ферментативного катализа;

2. Изучение ферментов на более высоких уровнях (надмолекулярном и клеточном) структурной организации живых систем, причем не столько отдельных ферментов, сколько ферментных комплексов в сложных системах;

3. Исследование механизмов регуляции активности и синтеза ферментов и вклада химической модификации в действие ферментов;

4. Развитие исследований в области создания искусственных низкомолекулярных ферментов - абзимов (синтетические аналоги ферментов), наделенных аналогично нативным ферментам высокой специфичностью действия и каталитической активностью, но лишенных побочных антигенных свойств;

5. Исследования в области инженерной энзимологии (белковая инженерия), создание «гибридных» катализаторов, сочетающих свойства ферментов, антител и рецепторов, а также создание биотехнологических реакторов с участием индивидуальных ферментов или полиферментных комплексов, обеспечивающих получение и производство наиболее ценных материалов и средств для народного хозяйства и медицины;

6. Исследования в области медицинской энзимологии, основной целью которых является выяснение молекулярных основ наследственных и соматических болезней человека, в основе развития, которых, лежат дефекты синтеза ферментов или нарушения регуляции активности ферментов в организме человека.

Таким образом, есть все основания для подтверждения положения, что не только современная биология, как отмечает акад. А.Е. Браунштейн, но и медицина «говорит на языке энзимологии».

Теперь ознакомимся с классификацией ферментов и 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. В виде проферментов образуются протеолитические ферменты (расщепляющие белки). Затем под воздействием рН 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:

- название субстрата, с которым он взаимодействует;
- характер катализируемой реакции;
- наименование класса ферментов (но это необязательно);
- суффикс - *аза*. Например, пируват - декарбоксилаза, сукцинат - дегидрогеназа.

Поскольку уже известно порядка пяти тысяч ферментов их классифицировали. Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 году в Москве.

Существуют три основных принципа классификации ферментов по:

- химической природе фермента;
- химической природе субстрата;
- типу катализируемой реакции.

Согласно Международной классификации, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых выделяют несколько подклассов, подподклассов и каждый фермент имеет свой порядковый номер:

- 1- оксидоредуктазы;
- 2- трансферазы;
- 3- гидролизы;
- 4- лиазы;
- 5- изомеразы;
- 6- лигазы (синтетазы).

*Оксидоредуктазы:* К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие окислительно - восстановительные реакции с участием двух субстратов, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза». Например, лактат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза для фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Различают следующие основные подклассы оксидоредуктаз:

- аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород;
- анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород;
- цитохромы, катализирующие перенос только электронов.

К этому классу относят также гемсодержащие ферменты-каталазу и пероксидазу, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

*Трансферазы:* К классу трансфераз относят ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и

радикалов. Наименование их составляется по форме «донор: транспортируемая группа - трансфераза».

Различают трансферазы, катализирующие перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Например, метил- и формил - трансферазы, ацетилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

*Гидролизы:* В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их составляют по форме «субстрат - гидролаза». К ним относятся:

- эстеразы - ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров;
- гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей;
- фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей;
- амидазы, ускоряющие разрыв амидных связей, отличных от пептидных, и др.

*Лиазы:* К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей С-О, С-С, С-N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту разрыва двойной связи. Ферменты обозначают термином «субстрат - лиазы». Например, фермент фумарат - гидратаза (систематическое название «L - малат - гидролаза») катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбокси - лиазы), амидин - лиазы и др.

*Изомеразы:* К классу изомераз относят ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических и геометрических изомеров. Систематическое название их составляют с учетом типа реакции: «субстрат - цис - транс - изомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название «мутаза».

К этому же классу относят рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты, углеводы и их производные; внутримолекулярные оксидоредуктазы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз; внутримолекулярные трансферазы, переносящие ацильные, фосфорильные и другие группы, и т. д.

*Лигазы (синтетазы):* К классу лигаз относят ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ (или другого нуклеозидтрифосфата). Систематическое



название их составляют по форме «X : Y лигаза», где X и Y обозначают исходные вещества. В качестве примера можно назвать L-глутамат: аммиак лигазу (рекомендуемое сокращенное название «глутаминсинтетаза»), при участии которой из глутаминовой кислоты и аммиака в присутствии АТФ синтезируется глутамин.

*Мономеры и олигомеры.* По своей структуре все белки - ферменты делятся на:

- мономеры (однокомпонентные) простые белки, состоящие из одной глобулы;
- олигомеры (двухкомпонентные) - состоящие из двух и более субъединиц и содержащие наряду с белковой частью (апофермент) и небелковую часть (кофактор).

Мономерные ферменты обладают первичной структурой.

Это строгая последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями.

Вторичная структура мономерного белка фермента - это способ укладки полипептидной цепи в определенную конформацию. Среди конформаций наиболее часто встречаются:

- $\alpha$  - спираль;
- $\beta$  - складчатый лист;
- статический клубок (неупорядоченная структура);
- петле - и пальцеобразные структуры.

Но основной функциональной активности белка - фермента является третичная структура. Третичная или нативная структура - это трехмерная конформация полипептидной цепи в пространстве или способ укладки вторичной структуры в компактную структуру определённого объема. При сворачивании вторичной структуры в третичную образуются домены.

Домен - это участок в третичной структуре белка, который обладает структурной и функциональной автономией. В молекулах фермента может быть один или несколько доменов, их функции могут быть одинаковыми или разными. Домен одного и того же типа строения может входить в состав разных белков ферментов, это даёт схожесть их биологических и химических функций. К таким схожим доменам относится NAD - связывающий домен дегидрогеназ. Ферменты сконструированы по модульному принципу, где модулем является домен.

Структура олигомерных ферментов. Олигомер - молекула в виде цепочки из небольшого числа одинаковых составных звеньев.

Этим олигомеры отличаются от полимеров, в которых число звеньев теоретически не ограничено. Верхний предел молекулярной массы олигомера зависит от его химических свойств. Свойства олигомеров сильно зависят от

изменения количества повторяющихся звеньев в молекуле и природы концевых групп; с момента, когда химические свойства перестают изменяться с увеличением длины цепочки, вещество называется полимером.

Олигомерами также называются белковые комплексы, состоящие из двух и более субъединиц. При этом, комплексы из одинаковых субъединиц называются гомо - олигомерами, а из разных - гетеро - олигомерами.

В биохимии термин олигомер также используется для обозначения коротких фрагментов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Такие олигомеры, размещенные на стеклянной подложке или нейлоновой мембране, используются в экспериментах с гибридизацией ДНК.

Белковые олигомеры относятся к четвертичной структуре белка и состоят из 2 и более глобул (субъединиц). Субъединицу называют протомером.

Если субъединицы:

- одинаковые - гомогенный олигомер;
- разные - гетерогенный олигомер.

Как правило, количество субъединиц чётное. Если субъединицы в составе олигомера разные, то они выполняют разные функции - каталитическую и регуляторную (аллостерическую).

В пределах одного организма могут встречаться изоферменты - это множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по физическим и химическим свойствам, в частности по сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции (активности), электрофоретической подвижности или регуляторным свойствам. В основе номенклатуры и нумерации изоферментов лежит их электрофоретическая активность (подвижность к аноду) в катализе. Наиболее подвижным изоферментам присваивается первый номер. Биологическая роль изоферментов состоит в регуляции обмена веществ и адаптации.

Например, фермент лактатдегидрогеназа существует в виде двух субъединиц: сердечной (Н) и мышечной (М). Молекула фермента в организме может быть представлена пятью изоферментами с конформациями, состоящими из четырех субъединиц: НННН, НННМ, ННММ, НМММ, ММММ.

Таким образом, есть все основания для подтверждения положения, что не только современная биология, как отмечает акад. А.Е. Браунштейн, но и медицина «говорит на языке энзимологии».

### **Контрольные вопросы по изучаемой теме:**

1. Наука энзимология, ее содержание и задачи.
2. Термин «энзим». Две главные задачи энзимология в ее современном физико-химическом и молекулярном понимании решает.

3. Биологическая роль ферментов: Общие и специфические свойства ферментов
4. История развития энзимологии. Первое научное представление о ферментах.
5. Развитие учения о ферментах. А.Я. Данилевский и А.Н. Бах - основоположники отечественной биохимии, их роль в развитии энзимологии.
6. Вклад А.Е. Браунштейн в развитие энзимологии в России .
7. Работы Э. Фишера, Р. Вильштеттера, Л. Михаэлиса, Д. Самнера, Д. Нортропа.
9. Современное состояние и перспективы развития энзимологии.
10. Значение энзимологических исследований для медицины, промышленности, сельского хозяйства, биотехнологии и физико-химической биологии.
11. Эволюция биологических катализаторов: биологические катализаторы белковой и небелковой природы.
12. Рибозимы. Абзимы.
13. Дайте характеристику шести основным классам ферментов.
14. Дайте цифровое обозначение фермента алкогольдегидрогеназы. К какому классу и подклассу относится данный фермент?
15. Что такое мономерные и олигомерные ферменты?
16. Что такое гомогенный олигомер?
17. Что такое гетерогенный олигомер?
18. Что такое изоферменты?
19. Что такое домен?
20. Как определить номер изофермента?
21. Что такое третичная конформация белка фермента?

**Тема 2 - Организация ферментов в клетках и тканях.  
Основные свойства ферментов, лежащие в основе методов  
исследования ферментов. Методы изучения ферментов.**

План:

1. Главные физико-химические свойства белков-ферментов:
  - молекулярная масса,
  - электрический заряд.
  - растворимость в воде.
2. Выделение ферментов:
  - высаливание,
  - тепловая денатурация,
  - осаждение.
3. Фракционирование и очистка:
  - хроматографические,
  - электрофоретические методы разделения белков.
4. Методы разделения белков по молекулярной массе:
  - гель-фильтрация – метод,
  - аффинная ультрафильтрация,
  - гельтрацентрифугирование,

-диализ.

5. Методы разделения белков по электрическому заряду:

ионообменная хроматография.

электрофорез,

изоэлектрофокусирование.

6. Методы разделения белков по биологической активности:

-аффинная хроматография.

7. Принципы и методы определения активности ферментов:

-фотоэлектро-колориметрические методы,

-спектрофотометрические методы,

-флюорометрические методы.

8. Единицы активности ферментов, их применение:

-общая активность фермента

-удельная активность фермента

-молекулярная активность фермента

9. Основные условия работы с ферментами

Методы выделения и очистки ферментов связаны с их локализацией и физико-химическими свойствами, которые определяются их белковой природой. Рассмотрим некоторые примеры зависимости локализации и функциональной зависимости. Ферменты и коферменты образуются в организме в процессе его жизнедеятельности. Локализуются они в клетках либо в протоплазме, либо фиксированы на тех или иных субклеточных структурах. Кроме того, ферменты содержатся в крови и межклеточных тканевых жидкостях.

Пищеварительные ферменты находятся в клетках соответствующих желез (слюнных, железистых клетках эпителия желудка и тонких кишок, поджелудочной) в форме неактивных проферментов и проявляют свою активность лишь будучи выделены в просвет желудочно-кишечного тракта. Здесь они претерпевают биохимические изменения, сводящиеся к отщеплению веществ, блокирующих активные центры этих ферментов.

Как было сказано, свойства ферментов определяются их белковой природой. *Главными физико-химическими свойствами белков-ферментов являются молекулярная масса, электрический заряд и растворимость* в воде.

*Молекулярная масса* может значительно варьировать. Например, лизоцим имеет молекулярную массу около 14 тыс. Да, а пепсин 35 тыс. Да. Молекулярная масса белка зависит от количества аминокислотных остатков, входящих в его состав, а также массы не аминокислотных компонентов. Масса одного остатка аминокислоты в среднем составляет 110 Да. Таким образом,

зная количество остатков аминокислот в белке, можно оценить его молекулярную массу и наоборот (Н.Н. Мушкамбаров, 1995).

*Электрический заряд* белка определяется соотношением положительно и отрицательно заряженных групп на поверхности его молекулы. Заряд белковой частицы зависит от рН среды. Для характеристики белка используют понятие «изоэлектрическая точка».

Изоэлектрическая точка (рI) — значение рН среды, при котором суммарный заряд белковой частицы равен нулю. В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок. Величина рI зависит от соотношения кислых и основных аминокислот в белке. Для белков-ферментов и пептидов с преобладанием кислых аминокислот (отрицательно заряженных при рН 7,0) значение рI находится в кислой среде; для белков-ферментов или пептидов с преобладанием основных аминокислот (положительно заряженных при рН 7,0) значение рI находится в щелочной среде.

Изоэлектрическая точка — характерная константа белков, её значение для большинства белков-ферментов животных тканей лежит в пределах от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о преобладании в их составе кислых аминокислот. Однако в природе имеются белки-ферменты, у которых значение изоэлектрической точки лежит при крайних значениях рН среды.

В частности, величина рI пепсина (фермента желудочного сока) равна 1, лизоцима (фермента, расщепляющего клеточную стенку микроорганизмов) — около 11.

*Растворимость* ферментов в воде. Из курса биофизической химии известно, что белки как высокомолекулярные соединения образуют коллоидные растворы. Стабильность растворов белков в воде определяется следующими факторами:

-величиной коллоидных частиц — чем они меньше, тем устойчивей раствор;

-величиной заряда частиц — чем больше заряд частицы, тем стабильнее раствор;

-величиной гидратной (сольватной) оболочки — чем больше сольватационной воды содержит коллоид, тем он устойчивее.

Надо иметь в виду, что под действием различных физических и химических факторов может происходить осаждение белков из коллоидных растворов.

Различают:

-обратимые реакции осаждения (высаливание), когда осадок белка можно вновь растворить в воде с восстановлением его исходных физико-химических и биологических свойств;

-необратимые реакции осаждения под действием факторов, вызывающих грубые нарушения структурной организации белковой молекулы (денатурацию).

Обратите внимание, что в основе реакций осаждения белков могут лежать следующие механизмы:

-нейтрализация электрического заряда при добавлении электролитов (кислот, щелочей, солей);

-разрушение гидратной оболочки при добавлении водоотнимающих веществ (спирта, ацетона, концентрированных растворов электролитов) и при нагревании;

-увеличение размеров коллоидных частиц под действием факторов денатурации белка.

Денатурация белков – это изменение нативных (природных) физико-химических и, главное, биологических свойств белка вследствие нарушения его четвертичной, третичной и даже вторичной структуры. Денатурацию белка могут вызвать:

-температура выше 60°C;

-ионизирующая радиация;

-концентрированные кислоты и щёлочи;

-соли тяжёлых металлов (ртути, свинца, кадмия);

-органические соединения (спирты, фенолы, кетоны).

Для денатурированных белков характерно:

-изменение конформации молекулы;

-уменьшение растворимости в воде;

-изменение заряда молекулы;

-меньшая устойчивость к действию протеолитических ферментов;

-потеря биологической активности.

Это можно объяснить разрушением нативной третичной структуры белка, на уровне которой формируется центр связывания лигандов.

Обратите внимание, что при определённых условиях возможно восстановление исходной (нативной) конформации белка после удаления фактора, вызвавшего денатурацию. Этот процесс получил название реактивации.

Некоторые примеры использования процесса денатурации белков в медицине:

-для осаждения белков плазмы крови при определении содержания небелковых веществ в крови, например 33% раствором сульфата аммония;

-при проведении дезинфекции и санитарной обработки;

-при лечении и профилактике отравлений солями тяжёлых металлов (в качестве противоядия применяют молоко (молочный белок) или яичный белок);

-для получения лекарственных веществ белковой природы (используется денатурация в мягких условиях с последующей ренативацией).

*Биологическая активность.* В основе функционирования любого белка лежит его способность к избирательному взаимодействию со строго определёнными молекулами или ионами — лигандами.

Например, для ферментов, катализирующих химические реакции, лигандами будут вещества, участвующие в этих реакциях (субстраты), а также ко-факторы, активаторы и ингибиторы.

Лиганд способен взаимодействовать с определённым участком белковой молекулы — активным центром, который формируется пространственно сближенными радикалами аминокислот на уровне третичной структуры белка.

Способность субстрата взаимодействовать с центром связывания обусловлена их комплементарностью, то есть взаимным дополнением их пространственных структур (подобно взаимодействию «ключ — замок» или по механизму индуцированного соответствия). Между функциональными группами лиганда и центра связывания образуются нековалентные (водородные, ионные, гидрофобные) связи. Комплементарностью лиганда и центра связывания объясняют высокую специфичность (избирательность) взаимодействия белок — лиганд.

Итак, различные белки отличаются друг от друга по своим физико-химическим свойствам и биологической активности.

На этих различиях основаны методы разделения белковых смесей на фракции и выделения отдельных ферментных белков. Данные методы широко используются в медицинской биохимии и биотехнологии.

Почему выделяют ферменты? Потому что вся информация об отдельных метаболических реакциях, о промежуточных соединениях, которые образуются на последовательных этапах метаболических путей, информация о механизме регуляции работы катализаторов получена, главным образом, с использованием очищенных препаратов ферментов.

Высокоочищенные препараты ферментов необходимо иметь и для того, чтобы получить надёжные данные о кинетике, кофакторах, активных центрах, о структуре и механизме действия ферментов.

Процесс очистки состоит в выделении данного фермента из грубого клеточного экстракта, содержащего множество других компонентов. Основная проблема — отделить нужный фермент от сотен химически и физически сходных белков.

Первым этапом выделения и очистки ферментов является разрушение клеток и экстракция белковых молекул. Для разрушения клеток используют осмотический шок, растирание кусочков ткани с кварцевым песком или стеклянными шариками, размельчение гомогенизаторами различных типов. Метод разрушения клеток и время обработки выбирают в зависимости от типа ткани. Эритроциты обычно подвергают осмотическому шоку. Мягкие ткани (печень, мозг) разрушают с помощью гомогенизатора Поттера. Выбор раствора для экстракции зависит от особенностей белка. Для растворимого белка используют буферные растворы. Для выделения белков, связанных с мембраной, используют детергенты. После экстракции белка гомогенат центрифугируют при 10000-20000 об/мин для удаления нерастворимого осадка. Полученная надосадочная жидкость (супернатант) называется экстрактом.

После получения экстракта, содержащего исследуемый фермент, его подвергают очистке. Все методы разделения смесей основаны на том, что разделяемые компоненты в результате каких-либо манипуляций оказываются в разных участках системы и могут быть механически отделены друг от друга. Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, т.к. на первых этапах очистки фракции содержат множество примесей. На каждой ступени разделения должна получаться фракция более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют фракционированием. На каждой стадии разделения белок находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

*Фракционирование и очистка.* После достижения полной экстракции белков, т.е. перевода белков в растворенное состояние, приступают к разделению – фракционированию смеси белков на индивидуальные белки. Для этого применяют разнообразные методы: высаливание, тепловую денатурацию, осаждение неорганическими или органическими солями, хроматографию, электрофорез, распределение в двухфазных системах, препаративный электрофорез, кристаллизацию и др.

Растворение белков в воде связано с гидратацией каждой молекулы, что приводит к образованию вокруг белковой глобулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных в определенной форме в пространстве молекул воды. По химическим и физическим свойствам вода, входящая в состав гидратной оболочки, отличается от чистого растворителя. В частности, температура замерзания ее составляет  $-40^{\circ}\text{C}$ . В этой воде хуже растворяются сахара, соли и другие вещества. Растворы белков-ферментов отличаются и крайней неустойчивостью, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок.



Поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (спирт, ацетон, концентрированные растворы нейтральных солей щелочных металлов), и под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.) наблюдаются дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок.

*Высаливание.* При добавлении растворов солей щелочных и щелочноземельных металлов происходит осаждение белков из раствора. Обычно белок не теряет способности растворяться вновь в воде после удаления солей методами диализа или гель-хроматографии.

Высаливание белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония. Поэтому метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50% насыщении) и альбуминов (выпадают при 100% насыщении). Чем больше величина заряда белка, тем более высокая концентрация соли требуется для его осаждения. На величину высаливания белков оказывают влияние не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура.

Считают, что главную роль при этом играет валентность ионов. Действие разных ионов принято сравнивать не по молярной концентрации соли, а по так называемой ионной силе ( $\mu$ ), которая равна половине суммы произведений

концентрации каждого иона ( $c$ ) на квадрат его валентности ( $V$ ):

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c \cdot V^2.$$

Более тонкое разделение белков плазмы крови человека на фракции достигается при использовании различных концентраций этанола при низкой температуре (от  $-3$  до  $-5^\circ\text{C}$ ) по методу Кона. В этих условиях белки сохраняют свои нативные свойства. Указанным методом часто пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей.

*Хроматография.* Наибольшее распространение в биохимии получили хроматографические и электрофоретические методы разделения белков.

Принцип хроматографии, разработан русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом. Цвет окончил Женевский университет, в котором получил степень доктора ботаники (1896). Приехав в Россию, он был вынужден заново защитить магистерскую диссертацию в 1899г в Казанском императорском университете. Метод основан на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте, заключенном в колонке. Михаил Семенович

Цвет писал, «если взять стеклянную трубку, наполненную толченым мелом, налить сверху спиртовой экстракт зеленого листа, а потом добавлять по капле растворитель, произойдет чудо. На меловом столбике появится зеленая полоска, потом желтая, оранжевая. Как будто в стеклянной пробирке за считанные минуты расцветут и весна, и лето, и осень». Этот метод разделения близких по свойствам веществ, основанный на явлении адсорбции, ученый назвал "хроматографией" - в переводе с греческого означает "цветопись". 30 декабря 1901 года в Санкт-Петербурге Цвет рассказал о своем открытии на съезде естествоиспытателей.

При выделении и очистке белков используют четыре основных типа хроматографии: распределительную (гель-фильтрация), адсорбционную, ионообменную и аффинную (хроматография по сродству) в соответствии с разными физическими и химическими механизмами, лежащими в основе каждого из них.

#### *Методы разделения белков по молекулярной массе.*

С помощью метода гель-фильтрации можно быстро разделить белки в соответствии с их размерами. Носителем для хроматографии является гель, который состоит из поперечносшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде гранул. Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий.

Гель играет роль молекулярного сита. При пропускании раствора через колонку, наполненную гранулами сефадекса, крупные частицы, размер которых превышает размер пор сефадекса, будут двигаться быстро. Мелкие молекулы будут двигаться медленно, поскольку в процессе движения будут проникать внутрь гранул.

Итак, *гель-фильтрация* – метод, основанный на различной способности молекул разных размеров проходить через своеобразные «молекулярные сита» – инертные гидратированные полисахаридные материалы, представляющие собой пористые гранулы.

Сефадексы получатся при обработке полисахарида декстрана эпихлоргидрином, в результате образуются поперечные связи между молекулами, приводящие к формированию крупных гидрофильных зерен, нерастворимых в воде.

Благодаря большому сродству к воде зерна сильно набухают в водной среде с образованием геля, которым заполняют хроматографическую колонку.

Разделение веществ этим методом основано на том, что большие молекулы не проникают во внутреннюю водную фазу геля, являющуюся стационарной, и остаются снаружи, двигаясь вместе с подвижной фазой вниз вдоль колонки; небольшие молекулы, напротив, свободно диффундируют

внутри зерен, образуя равновесную систему между подвижной и стационарной фазами, и соответственно с меньшей скоростью двигаются вдоль колонки.

Обычно момент появления веществ в вытекающем из колонки с сефадексом элюенте выражают формулой:  $V = V_0 + K \cdot V_i$ , где  $V$  – объем элюирующей жидкости в мл;  $V_0$  – свободный объем колонки или общий объем внешнего растворителя (вне зерен геля), мл;  $V_i$  – объем растворителя внутри геля, мл;  $K$  – коэффициент распределения для растворенного вещества между растворителем внутри зерен геля и окружающим растворителем.

Поскольку молекулы белков, обладающие большими молекулярной массой и размерами, не диффундируют внутрь зерен сефадекса, они первыми вымываются из колонки после выхода свободного объема колонки  $V_0$ , в то время как все остальные вещества (включая низкомолекулярные примеси) вымываются после выхода объема колонки.

Отличительной особенностью метода *высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)* является наличие в аппаратуре специальных насосов, позволяющих с высокой скоростью продавливать жидкую фазу через колонку, имеющую диаметр частиц от 3 до 15 мкм, а также наличие высокочувствительных детекторов для обнаружения разделенных веществ.

Хроматографы для ВЭЖХ включают несколько блоков: дегазатор (для удаления растворенного кислорода из растворителей), насос, термостат, детектор (УФ, рефрактометр и др.).

На хроматограф могут быть установлены различные колонки: ионообменные, гель-фильтрационные, гидрофобные и др.

При разделении высоколабильных белков высокое давление нежелательно, поэтому применяют хроматографию при среднем давлении.

Метод нашел широкое применение в препаративной энзимологии, т.к. с помощью сефадекса можно разделить белки с разной молекулярной массой. Метод гель-фильтрации эффективно используется и при очистке ферментов от низкомолекулярных примесей. Применение в определенной последовательности ряда перечисленных методов позволяет получить белок в очищенном состоянии, не лишенный, однако, некоторых примесей солей.

*Ультрацентрифугирование.* Метод ультрацентрифугирования основан на измерении скорости седиментации (осаждения) белковых частиц под действием центробежной силы, создаваемой в ультрацентрифуге. Скорость седиментации частиц пропорциональна их молекулярной массе.

*Диализ* – процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ при помощи полупроницаемой мембраны. Белки не способны

проходить через такую мембрану, поэтому данный метод применяется для очистки белков от неорганических соединений.

*Методы разделения белков по электрическому заряду.*

На различии белков по электрическому заряду основаны методы ионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования, Электрофореза.

Как выше говорили, белки обладают способностью избирательно адсорбироваться на твердых фазах. Поэтому для разделения белков широко используются адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Важнейшими адсорбентами белков являются *ионообменники*. Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике. При разделении белков и их анализе используется жидкостная хроматография.

В жидкостной хроматографии зона разделяемых веществ с помощью тока элюирующей (вымывающей) жидкости перемещается относительно неподвижной фазы, которая обладает разным сродством к разделяемым компонентам.

Зоны с помощью тока элюента каждый из разделяемых компонентов проводит некоторую часть времени на неподвижной фазе. Чем больше это время, тем медленнее перемещается зона с разделяемой смесью.

*Выбор ионообменника определяется изоэлектрической точкой выделяемого белка.* При значениях рН буфера ниже изоэлектрической точки белок имеет положительный заряд и адсорбируется на катионообменнике и, наоборот. Обычно условия адсорбции выбирают эмпирически, так как чаще всего изоэлектрическая точка белка неизвестна, хотя ее можно определить путем изоэлектрического фокусирования.

Элюцию белков с колонки можно осуществить изменением рН буфера до величины, при которой связывание белков с адсорбентом ослабевает, кроме того, повышением ионной силы буфера, что вызывает ослабление электростатического взаимодействия между белком и адсорбентом.

Таким образом *ионообменная хроматография* – метод, основанный на взаимодействии заряженных групп белка с ионными группами полимеров-ионообменников. При разделении смеси белков на анионите (например, диэтиламиноэтилцеллюлозе) в первую очередь элюируются положительно заряженные белки, затем – нейтральные и, наконец, отрицательно заряженные белки. При разделении смеси белков на катионообменнике (например, карбоксиметилцеллюлозе) элюция происходит в обратном порядке.

Ионообменные смолы являются полимерными органическими соединениями, содержащими функциональные группы, способные вовлекаться в ионный обмен. Различают положительно заряженные *анионообменники*, представленные органическими основаниями и аминами, и отрицательно заряженные *катионообменники*, содержащие фенольные, сульфо- или карбоксильные группы. Из сильно- и слабоосновных анионообменников чаще используют производные полистирола и целлюлозы, несущие функциональные группы:

Аналогичные функциональные группы содержат триэтиламиноэтил (ТЭАЭ)- и аминоэтил (АЭ)-целлюлозы.

Катионообменники представлены сульфонированными полистиролами (производные винилбензола или дивинилбензола) и карбоксиметилцеллюлозой, имеющими следующие функциональные группы:

В зависимости от заряда разделяемых белков используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается и задерживается на колонке часть белков, в то время как другие белки беспрепятственно элюируются с колонки. «Осажденные» на колонке белки снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменяя рН элюента.

*Электрофорез* – считается очень эффективным способом разделения белков. Принцип разделения белков методом электрофореза заключается в том, что молекула белка в растворе при любом рН, отличающемся от ее изоэлектрической точки, имеет заряд. Это приводит к тому, что белок движется в электрическом поле.

Движущая сила определяется величиной напряженности электрического поля ( $E$ ) умноженной на суммарный заряд частицы ( $z$ ). Этой силе противостоят силы вязкости среды, пропорциональные коэффициенту вязкости ( $\eta$ ), радиусу частицы (стоксовскому радиусу-  $r$ ) и скорости ( $v$ ):  $E \cdot z = 6\pi\eta r v$

Удельная подвижность:  $u = z / 6\pi\eta r v$ . Таким образом, молекулы приобретают разные скорости в зависимости от величины заряда и размеров.

После отключения тока гель помещают в специальный раствор, где интересующие исследователя белки окрашиваются. Существует электрофорез в растворе, но он имеет ограниченное применение, т.к. исследуемые белки часто подвергаются значительному диффузионному размыванию. Однако сейчас стало возможным применять этот метод в условиях невесомости в космосе, что устраняет конвекционные токи, обуславливающие диффузионную размывку. Метод свободного электрофореза, детально разработанный лауреатом Нобелевской премии А. Тизелиусом, основан на

различии в скорости движения (подвижности) белков в электрическом поле, которая определяется величиной заряда белка при определенных значениях рН и ионной силы раствора.

Следует отметить высокую разрешающую способность гель-электрофореза. Если при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге открываются всего 6 фракций, при электрофорезе в крахмальном геле – 10, а в полиакриламидном геле – до 18 разных белковых фракций. Самым распространенным методом является электрофорез в денатурирующих условиях, т.е. в ПААГ в присутствии додецилсульфата- $\text{Na}$ .

Додецилсульфат натрия (ДСН), маскирует заряд ионогенных групп в молекуле белка. Поэтому электрофоретическая подвижность белков, связанных с ДСН, будет пропорциональна их молекулярной массе (сл.16).

*Капиллярный электрофорез.* В настоящее время одним из наиболее перспективных методов анализа становится капиллярный электрофорез. Система капиллярного электрофореза включает кварцевый капилляр, источник высокого напряжения, устройство ввода пробы, детектор и устройство вывода информации. В капилляре компоненты пробы, имеющие заряды, перемещаются в соответствии с их электрофоретическими подвижностями. Таким образом, происходит разделение исходной смеси, и на выходе капилляра вблизи анода формируются зоны, содержащие индивидуальные компоненты. Появление компонентов регистрируется с помощью детектора. Полученная запись называется электрофореграммой.

*Двумерные системы электрофореза.* Все описанные выше методы зонального разделения являются одномерными, разделение в них происходит в одной координате. Наряду с этим применяются Двумерные системы разделения на пластинах. При этом разделяемую смесь в виде пятна наносят на один из углов и разделяют в одном направлении. Затем какие-либо параметры, определяющие разделяющую способность системы, изменяют и проводят разделение в перпендикулярном направлении. При удачном подборе системы и условий разделения удастся разделить те компоненты, которые не разделились при первой процедуре. Комбинации методов могут быть довольно разнообразны: двумерная хроматография с использованием в разных направлениях разных элюентов, хроматография в одном, а электрофорез – в другом направлении.

Для сложных смесей белков используется разделение в направлении, перпендикулярном первому. Таким образом, в первом направлении белки разделяются в соответствии с их изоэлектрическими точками, а во втором – в соответствии с размерами субъединиц. Этот метод позволяет разделить одновременно до 5000 белков.

*Изоэлектрическое фокусирование.* Метод изоэлектрического фокусирования заключается в создании системы с градиентом рН. Белки, движущиеся в электрическом поле, достигают в этой системе такой области, в которой значение рН равно их изоэлектрической точке. При этом значении суммарный заряд белка равен нулю, и он не способен перемещаться в электрическом поле. Изоэлектрическое фокусирование обладает наивысшей разрешающей способностью при разделении смеси белков, хотя этот метод не позволяет разделить белки по величине их молекул. При изоэлектрическом фокусировании диффузия ограничена. Как только белковая молекула диффундирует и попадает в зону, отличающуюся по значению рН от ее изоэлектрической точки, она получает заряд и мигрирует в обратном направлении.

По сути, *изоэлектрическое фокусирование* – это проведение электрофореза на колонке или в тонком слое с градиентом рН, создаваемом при помощи синтетических полиаминокарбоновых кислот – амфолинов. Каждый белок разделяемой смеси будет располагаться на колонке в участке со значением рН, соответствующем его изоэлектрической точке.

*Методы разделения белков по гидрофобным свойствам.*

*Адсорбционная хроматография.* Разделение компонентов смеси (образца) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте, т.е. метод *гидрофобной хроматографии* основан на связывании гидрофобного участка на поверхности белковой глобулы с алифатической цепью адсорбента.

Гидрофобные взаимодействия усиливаются с повышением концентрации соли. При высаливании основной причиной агрегации является усиление гидрофобных взаимодействий между белками – при высоких концентрациях соли большинство белков будут адсорбироваться на гидрофобных группах, связанных с матрицей.

Элюцию белков проводят с понижающимся градиентом концентрации соли. Белки, которые прочно адсорбируются, обычно удаляют с колонки добавлением в элюирующий раствор этиленгликоля.

В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния. Адсорбент в виде суспензии с растворителем (чаще всего буферным раствором) вносят в стеклянную вертикальную трубку (колонку).

Образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку – компоненты разделяемой смеси адсорбируются на адсорбенте. Затем приступают к стадии освобождения – десорбции компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты. Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций.

*Методы разделения белков по биологической активности.* Способность белков избирательно взаимодействовать с определёнными лигандами составляет основу метода аффинной или биоспецифической хроматографии.

Достоинством метода очистки является то, что он позволяет избирательно извлекать из сложной смеси белков один конкретный белок или по крайней мере небольшое их число. Метод основан на использовании иммобилизованного лиганда, который специфически взаимодействует с тем белком, который требуется получить в очищенном виде.

Из всех белков, присутствующих в смеси, с этим иммобилизованным лигандом связываются только те белки, которые способны вступать с ним в сильное взаимодействие. После удаления всех прочих не связавшихся белков нужный фермент элюируют с иммобилизованного лиганда либо концентрированными солевыми растворами, либо раствором, содержащим растворимую форму лиганда.

Применение метода аффинной хроматографии позволяет добиться в ходе очистки результатов, обычно превосходящих результаты последовательного применения многочисленных классических методов.

Снятие с колонки искомого белка осуществляют элюированием буферными смесями с изменённым рН или изменённой ионной силой, а также введением в состав элюента детергентов, ослабляющих связи между белками и лигандами.

Несомненным достоинством метода является возможность одноэтапно выделить заданный белок или другой биополимер высокой степени чистоты. При помощи аффинной хроматографии, например, удалось сравнительно легко выделить очищенные препараты аминоксил-тРНК-синтетаз на полиакрилгидразидагаровом геле, к которому в качестве лигандов были присоединены определённые тРНК (транспортные РНК).

Как известно, ферменты обладают высокой специфичностью по отношению к своим субстратам и коферментам, поэтому наиболее подходящими лигандами служат производные субстратов и коферментов, ковалентно связанные с носителем, например с сефадексом. Они могут быть присоединены к носителю либо непосредственно, либо через связующую «ножку» (линкер) из 3—8 атомов углерода.

Примером успешного применения аффинной хроматографии может служить очистка множества различных дегидрогеназ на аффинных носителях с НАД<sup>+</sup> в качестве лиганда. При этом с лигандом могут связываться несколько дегидрогеназ, которые при элюировании их раствором НАД<sup>+</sup> выходят вместе, и их дальнейшее разделение проводят, используя уже не коферментные, а субстратные аффинные носители.



С аффинной хроматографией во многом сходна хроматография, при которой в качестве лигандов используются красители (голубая, зеленая или красная сефароза), а также хроматография на гидрофобных лигандах, где носителем является октил- или фенилсефароза. В первом случае в качестве иммобилизованного лиганда используют органический краситель, являющийся аналогом субстрата, кофермента или аллостерического эффектора. Элюирование обычно осуществляют солевым раствором увеличивающейся концентрации.

*Металлохелатная аффинная хроматография* является наиболее распространенным методом очистки рекомбинантных белков. Один из приемов металлохелатной аффинной хроматографии основан на том, что некоторые аминокислоты, в частности, гистидин, способны формировать комплексы с ионами металлов. После иммобилизации на хроматографической фазе хелатирующих групп, целевой рекомбинантный белок, содержащий блок из нескольких остатков гистидина связывается с хроматографической фазой, после чего сопутствующие белки отделяются, и проводится элюция целевого белка. Кроме блока из остатков гистидина, целевой рекомбинантный белок может содержать последовательности глутатион-S-трансферазы, S-белка и других, при этом принципы хроматографического выделения целевого рекомбинантного белка остаются теми же. Недостатком метода является то, что создание соответствующего сорбента для этого вида хроматографии требует значительных усилий и сопряжено с серьезными методическими трудностями. В процессе эксплуатации сорбента происходит "вымывание" ионов металла из активных центров носителя, что сопровождается ухудшением его сорбционных характеристик.

Мы говорили о физико-химических свойствах белков-ферментов, которые лежат в основе очистки ферментов. Но есть *уникальное свойство ферментов-ускорять химические реакции*, т.е. характеристикой активности ферментов является скорость, с которой они катализируют реакцию. Она измеряется скоростью превращения субстрата или скоростью накопления продукта реакции. Измерять нужно начальную скорость превращения, которая графически выражается линейной прямой, а не количество субстрата, превращенного за определенный отрезок времени реакции.

Итак, *принципы и методы определения активности ферментов* в биологическом материале.

Свойство ускорять химические реакции может быть использовано для количественного определения содержания ферментов в биологическом материале (тканевом экстракте, сыворотке крови и т.д.).

При правильно подобранных экспериментальных условиях почти всегда существует пропорциональность между количеством фермента и скоростью катализируемой реакции, поэтому по активности фермента можно судить о количественном содержании его в исследуемой пробе. Измерение ферментативной активности основывается на сравнении скорости химической реакции в присутствии активного биокатализатора со скоростью реакции в контрольном растворе, в котором фермент отсутствует или инактивирован. Исследуемый материал помещают в инкубационную среду, где созданы оптимальные условия: температура, рН среды, концентрации активаторов и субстратов. Одновременно осуществляют постановку контрольной пробы, в которую фермент не добавляют. Спустя некоторое время реакцию останавливают путём добавления различных реагентов (изменяющих рН среды, вызывающих денатурацию белков и т.д.) и проводят анализ проб. Для того чтобы определить скорость ферментативной реакции, необходимо знать: 1- разность концентраций субстрата или продукта реакции до и после инкубации; 2- время инкубации; 3- количество материала, взятое для анализа.

Наиболее часто активность фермента оценивают по количеству образовавшегося продукта реакции. Так поступают, например, при определении активности аланинаминотрансферазы, катализирующей следующую реакцию: определяя содержание одного из продуктов реакции – пировиноградной кислоты – в пробе после инкубации и вычитая из этого значения количество пировиноградной кислоты в контрольной пробе (в неё исследуемый материал добавляется после инкубации), находят количество продукта реакции, образовавшегося за время инкубации.

Активность ДНКаз определяют по приросту кислоторастворимых продуктов (олигонуклеотидов) в результате гидролиза ДНК ДНКазой. После центрифугирования в кислой среде высокополимерная ДНК осаждается, а олионуклеотиды (продукты реакции гидролиза) - нет. По поглощению УФ-света ( $\lambda_{260\text{нм}}$ ) олигонуклеотидами в надосадочной жидкости определяют активность ДНКаз, т.е. способность ДНКазы гидролизовать субстрат (ДНК).

*Методы определения активности ферментов.* Существует большое количество методических приёмов для определения активности ферментов, различающихся по технике исполнения, специфичности, чувствительности.

Чаще всего для определения применяются *фотоэлектроколориметрические методы*. В основе этих методов лежат цветные реакции с одним из продуктов действия ферментов. При этом интенсивность окраски получаемых растворов (измеренная на фотоэлектроколориметре) пропорциональна количеству образовавшегося продукта. Например, в

процессе реакций, катализируемых аминотрансферазами, накапливаются  $\alpha$ -кетокислоты, которые дают с 2,4-динитрофенилгидразином соединения красно-бурого цвета: если исследуемый биокатализатор обладает низкой специфичностью действия, то можно подобрать такой субстрат, в результате реакции с которым образуется окрашенный продукт.

Примером может служить определение щелочной фосфатазы – фермента, широко распространённого в тканях человека, его активность в плазме крови существенно меняется при заболеваниях печени и костной системы. Этот фермент в щелочной среде гидролизует большую группу фосфорнокислых эфиров, как природных, так и синтетических. Одним из синтетических субстратов является паранитрофенилфосфат (бесцветный), который в щелочной среде расщепляется на ортофосфат и паранитрофенол (жёлтого цвета). За ходом реакции можно наблюдать, измеряя постепенно нарастающую интенсивность окраски раствора:

*Спектрофотометрические методы* основаны на изменении ультрафиолетового спектра химических веществ, принимающих участие в реакции. Большинство соединений поглощает ультрафиолетовые лучи, а поглощаемые длины волн характерны для присутствующих в молекулах этих веществ определённых групп атомов. Ферментативные реакции вызывают внутримолекулярные перегруппировки, в результате которых меняется ультрафиолетовый спектр. Эти изменения можно зарегистрировать на спектрофотометре. Спектрофотометрическими методами, например, определяют активность окислительно-восстановительных ферментов, содержащих в качестве коферментов НАД или НАДФ. Эти коферменты действуют как акцепторы или доноры атомов водорода и, таким образом, либо восстанавливаются, либо окисляются в процессах метаболизма. Восстановленные формы этих коферментов имеют ультрафиолетовый спектр с максимумом поглощения при 340 нм, окисленные формы этого максимума не имеют. Так, при действии лактатдегидрогеназы на молочную кислоту происходит перенос водорода на НАД, что приводит к увеличению поглощения НАДН при 340 нм. Величина этого поглощения в оптических единицах пропорциональна количеству образовавшейся восстановленной формы кофермента. По изменению содержания восстановленной формы кофермента можно определить активность фермента.

*Флюорометрические методы.* В основе этих методов лежит явление флюоресценции, которое заключается в том, что исследуемый объект под влиянием облучения излучает свет с более короткой длиной волны. Флюориметрические методы определения активности ферментов более чувствительны, чем спектрофотометрические. Сравнительно новыми и ещё

более чувствительными являются *хемилюминесцентные методы* с применением люциферин-люциферазной системы. Такие методы позволяют определять скорость реакций, протекающих с образованием АТФ. При взаимодействии люциферина (карбоновой кислоты сложного строения) с АТФ образуется люцифериладенилат. Это соединение окисляется при участии фермента люциферазы, что сопровождается световой вспышкой. Измеряя интенсивность световых вспышек, удаётся определять количества АТФ порядка нескольких пикомолей (10–12 моль).

*Единицы активности ферментов, их применение.* Международная комиссия по ферментам предложила за единицу активности любого фермента принимать такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля (10<sup>-6</sup> моль) субстрата в единицу времени (1 мин, 1 час) или одного микроэквивалента затронутой группы в тех случаях, когда атакуется более одной группы в каждой молекуле субстрата (белки, полисахариды и другие). Должна быть указана температура, при которой проводится реакция. Результаты измерений активности ферментов могут быть выражены в единицах общей, удельной и молекулярной активности.

*Общая активность фермента.* За единицу общей активности фермента принимают такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в единицу времени в расчёте на количество материала, взятого для исследования.

Так, активность аланинаминотрансферазы в печени крыс равна 1670 мкмоль пирувата в час на 1 г ткани; активность холинэстеразы в сыворотке крови человека составляет 250 мкмоль уксусной кислоты в час на 1 мл сыворотки при 37°C.

Особого внимания исследователя требуют высокие значения активности фермента как в норме, так и в патологии. Рекомендуется работать с небольшими показателями активности фермента. Для этого источник фермента берут в меньшем количестве (сыворотку разводят в несколько раз физиологическим раствором, а для ткани готовят меньший процентный гомогенат). По отношению к ферменту в таком случае создаются условия насыщения субстратом, что способствует проявлению его истинной активности. *Общая активность фермента* рассчитывается с помощью

формулы: 
$$a = \frac{\Delta C}{V \times t} \times n$$
, где *a* – активность фермента (общая), ΔC – разность концентраций субстрата до и после инкубации; V – количество материала, взятого на анализ, t – время инкубации; n – разведение.

Следует иметь в виду, что показатели активности ферментов сыворотки крови и мочи, исследуемых в диагностических целях, выражают в единицах общей активности.

*Удельная активность фермента.* Поскольку ферменты являются белками, важно знать не только общую активность фермента в исследуемом материале, но и ферментативную активность белка, находящегося в данной пробе. За единицу удельной активности принимают такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в единицу времени в расчёте на 1 мг белка пробы. Для вычисления удельной активности фермента необходимо общую активность разделить на содержание белка в пробе:

Например, содержание белка в ткани печени составляет 160 мг/г. Разделив общую активность аланинаминотрансферазы (1670 мкмоль пирувата в час на 1 г ткани) на это значение, получаем 10,4 мкмоль пирувата/мг белка × час.

Чем хуже очищен фермент, тем больше в пробе находится посторонних балластных белков, тем ниже удельная активность. В ходе очистки количество таких белков уменьшается, и соответственно удельная активность фермента повышается. Предположим, в исходном биологическом материале, являющемся источником фермента (измельчённая печень, кашлица из растительной ткани), удельная активность была равна 0,5 мкмоль/ (мг белка × мин). После дробного осаждения сульфатом аммония и гель-фильтрации через сефадекс она повысилась до 25 мкмоль/ (мг белка × мин), т.е. увеличилась в 50 раз.

К оценке эффективности очистки ферментных препаратов прибегают при производстве лекарственных средств энзиматической природы. Удельную активность определяют в том случае, когда нужно сопоставить активность разных препаратов одного и того же фермента. Если требуется сравнить активность разных ферментов, рассчитывают молекулярную активность.

*Молекулярная активность фермента.* Молекулярная активность (или число оборотов фермента) – это количество моль субстрата, подвергающееся превращению под действием 1 моль фермента в единицу времени (обычно в 1 минуту). Разным ферментам присуща неодинаковая молекулярная активность. Уменьшение числа оборотов ферментов происходит под действием неконкурентных ингибиторов. Изменяя конформацию каталитического центра фермента, эти вещества понижают сродство фермента к субстрату, что приводит к уменьшению числа молекул субстрата, реагирующих с одной молекулой фермента в единицу времени.

*Особенности методов выделения и очистки ферментов.* Существует три основные проблемы при выделении ферментов:

1. Исходный материал состоит из множества различных соединений, разделение которых сложно вследствие того, что они построены однотипно и мало различаются между собой по физико-химическим характеристикам (растворимости или способности к сорбции на определенном типе сорбента).

2. Работа с биологическим материалом зачастую сопровождается необходимостью работать с очень небольшими количествами исходного вещества, поэтому методы детекции должны быть высокочувствительными.

3. Многие белки обладают очень низкой устойчивостью, несмотря на это необходимо выделение фермента в нативном состоянии с сохранением его биологической активности. Многие ферменты при умеренных температурах и незначительных изменениях рН среды подвержены денатурации, которая обычно сопровождается их инактивацией. Кроме того, в клетках имеются ферменты, способные разрушить те или иные вещества, в первую очередь белки.

*Выбор исходного материала* для выделения чистых препаратов фермента определяется целью исследования. Для изучения свойств определенных ферментов, безотносительно источника, выбирают наиболее доступный биологический материал, содержащий большие количества фермента. При исследовании специфических ферментов из конкретных источников используют определенный биологический материал независимо от количества в нем исследуемого фермента, что усложняет процесс его выделения и очистки. Непосредственно перед очисткой ферментов белковые растворы концентрируют. Это можно осуществить методами: а) осаждения с последующим растворением в меньшем объеме; б) адсорбции на ионообменнике с последующей элюцией; в) ультрафильтрации.

После проведения первых этапов очистки белки в экстракте отличаются друг от друга растворимостью, молекулярной массой, величиной суммарного заряда молекулы, относительной стабильностью и т.д. Эти различия используют для дальнейшего разделения белков.

*Доказательства гомогенности белка.* Исследование особенностей строения и свойств фермента начинают после доказательства гомогенности белкового препарата. Для доказательства гомогенности белка используют: электрофорез; определение молекулярной массы с помощью масс-спектрометрии; ультрацентрифугирование; аминокислотный анализ; метод изоэлектрофокусирования; кристаллизацию: кристаллизация белков используется 1) как завершающая стадия очистки белков; 2) для доказательства гомогенности белков; 3) как метод стабилизации белков при хранении; 4) для определения третичной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа.

Кристаллы растут из пересыщенных растворов вследствие агрегации высокоупорядоченным способом, кроме того, могут образовываться и в очень разнородных смесях белков. Если примеси не находятся в пересыщенном состоянии, то агрегировать будет тот белок, который присутствует в этом состоянии, и будут образовываться его кристаллы. Чтобы началась кристаллизация, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для этого используют осадители (вещества, уменьшающие растворимость): сульфат аммония, полиэтиленгликоль, органические растворители.

*Основные условия работы с ферментами.* Ферменты, как все белки, являются относительно неустойчивыми веществами. Они легко подвергаются денатурации и инактивации. Поэтому при работе с ними необходимо выполнять определенные требования.

1. При хранении объекта изучения свыше нескольких часов при комнатной температуре фермент почти полностью инактивируется. Поэтому анализ определения активности фермента следует проводить в возможно короткие сроки. При необходимости длительное хранение возможно, если раствор фермента высушивают из замороженного состояния в высоком вакууме (лиофильная сушка). В этом случае фермент почти полностью сохраняет активность при дальнейшем его хранении при комнатной температуре. Некоторые ферменты хорошо сохраняются в концентрированных растворах солей, например, в насыщенном сульфате аммония (процесс высаливания). При надобности осадок фермента можно отцентрифугировать и растворить в физиологическом растворе или соответствующем буфере. Если необходимо, от избытка соли можно избавиться диализом.

2. Необходимо помнить о чувствительности ферментов к колебаниям pH среды. За небольшим исключением большинство ферментов инактивируется в растворах с pH ниже 5 или выше 9, а оптимум действия ферментов появляется в зоне нескольких единиц или десятых долей единицы значения pH. Определение pH буферных растворов, используемых при работе с ферментами, рекомендуется проводить очень точно с помощью pH-метра.

3. Ферменты легко разрушаются сильнодействующими реагентами: кислотами, щелочами, окислителями, солями тяжелых металлов. Необходимо работать с химически чистыми реактивами и бидистиллированной водой, т. к. даже небольшое загрязнение реактивов, особенно примесью металлов, которые могут действовать как модуляторы, приводит к изменению активности фермента.

4. При работе с ферментами как нигде обязательно строгое соблюдение стандартизации условий исследования: точное выдерживание температурного и временного режимов, использование реактивов из одной партии, а при смене реактивов надо снова откалибровать получаемые данные. Если развивающаяся окраска в цветной реакции неустойчива во времени, необходимо строго соблюдать сроки фотометрирования.

5. Рекомендуется работать в условиях достаточной степени насыщения фермента субстратом, так как это обстоятельство существенно сказывается на конечном результате, недостаток субстрата нивелирует различия между вариантами.

6. При работе с ферментами необходимо учитывать органоспецифичный изоферментный спектр. Часто такая специфичность затрагивает условия действия энзима. На ход реакции может повлиять различное сродство к субстрату, иная чувствительность к рН, свойственные изоэнзимам того или иного органа или ткани. Переносить метод исследования активности фермента с одного объекта на другой (например, с сыворотки на ткань или с одного органа на другой) нужно крайне осторожно, с учетом всех известных данных о ферменте и его множественных формах, а также с тщательной проверкой результатов. Для широкого внедрения различных биохимических (ферментативных) реакций вводится автоматизация наиболее общепризнанных и необходимых анализов, а также унификация и стандартизация лабораторных тестов. Это рационально и необходимо как для повышения точности, качества проведения проб, так и для сравнения данных, которые получены в разных лабораториях.

Общепринятым является и обязательное параллельное исследование, наряду с изучаемой патологией, физиологического контроля — группы практически здоровых для установления нормальных, физиологических колебаний. Понимая относительность понятия «нормальная величина», следует принять, что для выявления различий в патологии и оценки патологического признака, за «норму», как правило, принимается средняя арифметическая  $M \pm 1\sigma$  или  $2\sigma$  (при нормальном Гауссовом распределении) в зависимости от степени колебания показателя.

### **Контрольные вопросы**

1. Значение очистки ферментов.
2. Выбор источника для выделения ферментов. Общие правила работы с ферментами.
3. Физико-химические свойства ферментов, лежащие в основе выделения очистки ферментов: Относительная молекулярная масса. Растворимость,



гидратация, амфотерность ферментов, их изоэлектрическая точка (ИЭТ). Термостабильность. Оптические свойства ферментов

4. Методы выделения ферментов. Разрушение клеток и экстракция:

4.1. Способы гомогенизации объектов, компоненты среды гомогенизации, стабилизирующие ферменты.

4.2. Экстракция: осаждение путем изменения температуры, рН, концентрации нейтральных солей (высаливание), органическими растворителями. Причины и степень обратимости осаждения.

5. Фракционирование и очистка. Принципы методов. Краткая характеристика.

5.1. Методы очистки: диализ, тепловая денатурация, высаливание.

5.2. Хроматография: адсорбционная, распределительная и ионообменная хроматография, афинная хроматография, фильтрация через гели.

5.3. Электрофорез.

5.4. Современные технологии выделения, очистки и модификации ферментов: технологии модульного типа с применением сорбционно-хроматографических и мембранных технологий

6. Контроль за ходом очистки ферментов, критерии чистоты ферментативного препарата.

7. Методы исследования ферментативного действия в живой клетке и в её отдельных структурных элементах.

8. Способы количественного выражения активности ферментов?

9. Определение активности ферментов: Характеристика стационарных методов определения активности ферментов?

10. Определение активности ферментов: Характеристика кинетических методов определения активности ферментов?

11. Какие детекторы используются в ВЭЖХ? На чем основан принцип их действия?

12. Опишите методы протеомики.

13. Что такое функциональная и структурная протеомика?

14. Как осуществляется протеомный анализ молекулярных взаимодействий?

15. В чем заключается принцип определения белков с помощью масс-спектрометрии?

### **Тема 3 - Природа ферментов. Ферменты-сложные белки. Форма и динамика молекулы белка.**

План:

1. Простые и сложные ферменты.

2. Холофермент, апофермент, коферменты: кофакторы и простетические группы.

3. Функции белковой и небелковой частей.

4. Первичная, вторичная, третичная, четвертичная структуры ферментов и методы исследования этих уровней структурной организации.

5. Сверхвторичная структура и домены.

6. Роль четвертичной структуры в регуляции ферментативной активности.

7. Фолдинг белка:

- принципы пространственной организации молекулы фермента;
- проблемы сворачивания полипептидной цепочки в нативную конформацию, ее важность для энзимологии;
- современные представления о механизмах формирования пространственной структуры белка;
- иерархический принцип сворачивания;
- промежуточные состояния в процессе организации нативной конформации;
- современное состояние знаний о белках теплового шока и структуре шаперонов.

В настоящее время получены неопровержимые экспериментальные доказательства белковой природы ферментов.

А попытки выделить ферменты в индивидуальном состоянии предпринимали многие исследователи, среди которых следует упомянуть одного из основоположников отечественной биохимии и основателя кафедры медицинской химии в Казанском императорском университете А. Я. Данилевского.

Исследуя строение белков, Александр Яковлевич Данилевский сформулировал ряд положений, которые в дальнейшем легли в основу полипептидной теории структуры белков. Им впервые высказана идея об обратимости действия ферментов и на основании этого осуществлен ферментативный синтез белковоподобных веществ (пластеины). Он разработал оригинальную методику разделения и очистки ферментов путем адсорбции и элюции (десорбция), которую широко используют и в наши дни. А в 1862 г. Данилевскому впервые удалось разделить трипсин и панкреатическую амилазу. Эти работы заложили основы современных методов получения белков.

Напомню, что белковая природа ферментов была доказана в 1926 г. американским биохимиком Джеймсом Бетчеллером Самнером (1887-1955), выделившим в кристаллическом виде фермент уреазу из семян канавалии. И сейчас трудно представить, что не только Р. Вильштеттер в том же 1926 г. отрицал принадлежность ферментов к белкам или к какому-либо известному классу органических веществ, но и еще относительно недавно ( в конце 20 века) высказывались сомнения на этот счет.

Поводом для сомнений являлись опыты, в которых хотя и были получены ферментативно-активные растворы, но белок при помощи качественных цветных реакций не обнаруживался. Сейчас это объясняется тем, что

концентрация фермента даже при высокой удельной активности оказалась ниже пороговой чувствительности химического теста на белок.

О белковой природе ферментов свидетельствует факт инактивации (т.е. потеря активности) ферментов брожения при кипячении, установленный еще Л. Пастером. При кипячении наступает необратимая денатурация белка-фермента. Фермент при этом теряет присущее ему свойство катализировать химическую реакцию. Точно так же белки при кипячении денатурируются и теряют свои биологические свойства (антигенные, гормональные, защитные и др.).

Под влиянием различных физических и химических факторов (воздействие УФ- и рентгеновского излучения, ультразвука, осаждение минеральными кислотами, щелочами, алкалоидными реактивами, солями тяжелых металлов и др.) происходит денатурация ферментов, так же как и белков.

Ферменты при гидролизе, как и белки, распадаются на аминокислоты, что, бесспорно, служит веским доказательством белковой природы ферментов.

Интересные данные, указывающие на белковую природу ферментов, были получены в лаборатории И.П. Павлова. При определении переваривающей способности желудочного сока была обнаружена прямая зависимость между этой способностью и количеством белка в соке. В связи с этим было сделано заключение, что пепсин желудочного сока является белком.

Вескими доказательствами белковой природы фермента являются его получение в чистом виде и выделение в форме кристаллов белка.

К настоящему времени получено более 1000 кристаллических ферментов.

Структура многих из них изучена детально при помощи современных методов химии белка и молекулярной физики [методами рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и др.].

Прямым доказательством белковой природы ферментов является лабораторный синтез фермента рибонуклеазы, осуществленный в 1969г в лаборатории Меррифилда в Нью-Йорке. Этот автоматический синтез на твердой фазе состоял из последовательного включения всех 124 аминокислотных остатков в строгом соответствии с последовательностью аминокислот первичной структуры естественного фермента рибонуклеазы поджелудочной железы.

Метод Меррифилда предусматривал осуществление 369 химических реакций и 11931 отдельной стадии, для чего требовалось несколько недель непрерывной работы твердофазного синтезатора. В 1984г. ему вручили

Нобелевскую премию по химии за предложенную им методологию химического синтеза на твердых матрицах.

«Совершенно новый подход [Меррифилда] к органическому синтезу создал новые возможности в области пептидно-белковой химии и химии нуклеиновых кислот» – сказал Бендт Линдберг во вступительной речи от имени Шведской королевской академии наук. Он в значительной мере стимулирует развитие биохимии, молекулярной биологии, медицины и фармакологии, а также имеет большое практическое значение для разработки новых лекарственных препаратов и для генной инженерии».

Все ферменты являются белками, но не все белки являются ферментами. В одних случаях – это простые белки, в других – сложные белки.

*Ферменты – простые белки* носят название однокомпонентных ферментов. При их гидролизе обнаруживаются только аминокислоты. Представителями однокомпонентных ферментов являются рибонуклеаза, лизоцим, уреазы, такие протеолитические ферменты, как пепсин, трипсин, химотрипсин и другие ферменты.

В однокомпонентных ферментах роль активной группы выполняют определенные химические группировки.

*Ферменты – сложные белки* – называются двухкомпонентными ферментами. Краут предложил назвать двухкомпонентные ферменты *симплексами*, белковый компонент в них – *фероном* (от лат. Fero - несу), небелковый компонент – активную группу – *агоном* (от лат. ago-действую).

Позднее предложены и другие названия:

двухкомпонентные ферменты (автор Эйлер) называли *холоферментами* (от греч. холос - целый), их белковая часть – *апофермент*.

Небелковый компонент имеет разное название в зависимости от характера связи его с белковым компонентом. Если у некоторых ферментов *небелковый компонент легко отделяется от белка* и устраним при диализе, в этом случае небелковый компонент, по предложению Бертрана, называется *коферментом* (лат. ко-добавляется).

Примером очень нестойкой связи между апоферментом и небелковым компонентом могут служить *дегидрогеназы*, содержащие NAD или NADP. Они самопроизвольно диссоциируют на составляющие компоненты, и их кофермент может быть удален диализом.

Реакции изомеризации, окисления-восстановления, переноса, и реакции, сопровождающиеся образованием ковалентных связей, катализируются сложными ферментами,

Реакции гидролиза – простыми, т.е. однокомпонентными ферментами.

*Строение фермента.* Число пептидных цепей. В настоящее время еще недостаточно данных о том, сколько пептидных цепей со свободными концевыми группами содержится в молекулах различных ферментов. Но оказалось, что у большинства исследованных ферментов молекула состоит из одной пептидной цепи.

Так одна пептидная цепь обнаружена у пепсина, трипсина, папаина, карбоксипептидазы, лизоцима, панкреатической  $\alpha$ -амилазы и рибонуклеазы.

Пептидные цепи обнаружили у  $\alpha$ -химотрипсина и альдолазы. По-видимому, когда молекулы ферментов обратимо диссоциируют на 2 или больше частей, то более крупная молекула должна состоять по крайней мере из двух или более пептидных цепей.

*Аминокислотный состав.* Аминокислотный состав ферментов стало возможным анализировать только тогда, когда были разработаны микрометоды для определения аминокислотного состава белков, поскольку чистые ферменты, как правило, получают лишь в относительно малых количествах.

*Первичная структура* ферментов, в основе которой лежит аминокислотный состав и последовательность размещения аминокислот в белковой молекуле, имеет важное значение для проявления ферментативных свойств. Ферменты при своем действии *связываются с субстратами* и, следовательно, обладают *химическим сродством* к ним. Это сродство осуществляется наличием в молекулах ферментов специфических аминокислот при определенном сочетании.

Не только каталитические свойства ферментов, но и специфичность их действия неразрывно связаны с их первичной структурой. На специфичность ферментных белков влияет и порядок чередования в них аминокислот. Специфичность фермента зависит не только от того, как расположены аминокислоты во всей его молекуле.

В каждом ферменте есть *активный центр* – небольшой участок пептидной цепи с характерным для него составом и порядком чередования в нем аминокислот.

В тех случаях, где имеется  *$\alpha$ -спираль* у ферментов, *нарушение спиралеобразной структуры* пептидных цепей (например, при воздействии высоких концентраций мочевины, разрушающих водородные связи) *приводит к инактивации ферментов*; так что для проявления действия ферментов важна и вторичная структура.

*Структура и конфигурация ферментного белка.* Физические измерения показывают, что ферменты – это в большей части глобулярные белки, форма их молекулы близка к сферической.

Вторичная структура ( $\alpha$ -спираль) характерна для ферментных белков, но не обязательна. Так, рентгеноструктурный анализ рибонуклеазы не дает никаких указаний на то, что в структуре этого фермента существенную роль играют участки, построенные по типу  $\alpha$ -спирали. Обнаружено всего 15% спирализованной полипептидной цепи, а остальная часть не спирализованная.

*$\alpha$ -спираль* более характерна для миоглобина и гемоглобина, когда в виде  $\alpha$ -спирали оказывается структурированным до 70% всех аминокислотных остатков.

Препятствовать образованию  $\alpha$ -спирали могут разные причины:

- наличие в цепях пролина или глицина,
- большое количество заряженных аминокислот аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты или
- слишком большие боковые радикалы, как у триптофана.

Для формирования  $\alpha$ -спирали необходимо последовательное расположение не менее 4-х аминокислотных остатков с «удобными» для спирализации свойствами.

Более распространена в ферментах оказалась структура типа  *$\beta$ -слоя*. Эта структура теоретически предсказанная, как и  $\alpha$ -спираль Л. Полингом, формируется за счет водородных связей пептидной группы, но пространственно она более рыхлая и возникает чаще всего между параллельно или антипараллельно расположенными полипептидными цепями.

$\beta$ -слой может играть роль ядра, опорной структуры для располагающихся в пространстве полипептидных цепей. Наибольшее количество аминокислотных остатков, включенных в состав  $\beta$ -структуры, из изученных к настоящему времени ферментов имеет карбоксипептидаза.

Большое значение для ферментативной активности имеет *третичная структура* ферментных белков, т.е. свертывание спирализованной, не спирализованной, или частично спирализованной полипептидной цепи в трехмерную фигуру. Третичная структура очень лабильна, что очень важно для регуляции активности ферментов.

*Силы, стабилизирующие третичную структуру белка-фермента.* Для больших групп эволюционно родственных белков, иногда значительно отличающихся по первичной структуре, способ укладки полипептидной цепи остается (в главных чертах) неизменным.

Стабильность третичной структуры зависит от системы *не ковалентных* взаимодействий внутри белковой глобулы.

Некоторые белки дополнительно стабилизируются ковалентными – дисульфидными, связями; однако немало белков, в том числе достаточно стабильных, вовсе их лишены.

Среди не ковалентных взаимодействий, реализующихся при образовании пространственной структуры белка, наибольшую точность в фиксировании межатомных расстояний и углов обеспечивают водородные связи.

Попытаемся выяснить насколько выгодно (и выгодно-ли) сворачивание развернутой цепи в компактную глобулу. Самопроизвольность протекания любого процесса оценивают с помощью изменения *свободной энергии Гиббса*  $\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S$ .

Для самопроизвольно протекающих процессов  $\Delta G < 0$ . Следовательно, процесс выгоден, если он протекает с *уменьшением энтальпии* или *увеличением энтропии*.

При *образовании связей энтальпия системы понижается*, при *разрыве* - возрастает. При свертывании белковой глобулы из цепи *никакого выигрыша в числе водородных связей* произойти не может, т. к. одновременно утрачиваются водородные связи *цепь - вода*.

Этим диктуется необходимость образовать максимально высокое их число внутри глобулы, что реализуется при формировании регулярных элементов вторичной структуры. При свертывании глобулы *убывает энтропия* пептидной цепи, но одновременно происходит *возрастание энтропии* растворителя, т.е. воды, что и играет решающую роль в стабилизации третичной структуры белка.

Пример. Вода структурированный растворитель. Каждая ее молекула способна участвовать в образовании четырех водородных связей с другими молекулами воды. В результате протяженные *квазикристаллические льдоподобные* структуры в воде находятся в динамическом равновесии со свободными молекулами воды. *Полярные группы белка*, относительно легко включаются в такие структуры, устанавливая *водородные связи с водой*, окружающей белок. *Неполярные группы* включаются в своеобразные «пустоты» в динамической структуре воды.

Сближение неполярных групп влечет за собой формирование ван-дер-ваальсовых контактов между ними.

Термодинамика свертывания белковой глобулы характеризуется тем, что факторы, способствующие образованию компактной нативной структуры, и факторы, действующие в противоположном направлении, почти сбалансированы.

Изменение свободной энергии при свертывании белка, содержащего примерно 100 аминокислотных остатков (АКО), составляет около 10 ккал/моль, или всего лишь 0,1 ккал/моль АКО. Для сравнения - энергия водородной связи составляет около 3 ккал/моль.

В нативном белке *неполярные АКО* формируют *гидрофобное ядро*, оно окружено наружной оболочкой, состоящей из *полярных аминокислот*.

Нередко на поверхности белка образуются *гидрофобные «пятна»*, которые имеют *функциональное значение* - участие в связывании субстрата в белок-белковых взаимодействиях, в частности в стабилизации четвертичной структуры.

*Полярные остатки*, находятся *внутри глобулы*, где они формируют электростатические или водородные связи. Иногда это также необходимо для выполнения белком своих функций. В *стабилизации третичной* структуры белка участвуют *дисульфидные связи*. Стабилизация белковой структуры объясняется тем, что они, сохраняясь в денатурированном белке, резко сокращают число возможных конфигураций развернутой полипептидной цепи, понижая тем самым ее энтропию.

*Образование дисульфидных связей* в ходе биосинтеза идет параллельно свертыванию полипептида.

В биотехнологических системах для увеличения стабильности белков-ферментов активно применяются искусственно введенные дисульфидные мостики. Суть подхода - в поиске ослабленных участков полипептидной цепи белка, которые закрепляются дисульфидной связью.

Таким образом стабилизация ферментов ведет к уменьшению скорости инактивации.

*Форма и динамика молекулы белка*. Геометрическая форма глобулярных белков в первом приближении представляет собой эллипсоид вращения, у которого отношение полуосей, как правило, не превышает 2:1. При этом поверхность глобулярных белков как бы «изрыта» содержит впадины, щели которые существенны для функционирования белка (*активный центр*). Для пространственной структуры белка характерна определенная динамика.

Система *нековалентных связей* в белке допускает локальные флуктуации, например частичное и обратимое «расстегивание»  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -структур.

- Аминокислотные остатки, расположенные *на концах* элементов вторичной структуры, обладают большей подвижностью по сравнению с «внутренними» остатками.

- Аминокислотные остатки, расположенные *на поверхности* белка, еще более динамичны. Например, длинные, хорошо гидратированные боковые цепи лизина описывают окружности.

Многие элементы структуры белка, содержащие компоненты каталитического центра оказываются менее подвижными, чем наружные петли. Этим, как считают, обеспечивается точность их взаимодействия с субстратами и другими лигандами.



Атомные флуктуации могут выполнять роль «смазки» при *перемещениях крупных участков структуры*, а также помогать взаимной подгонке поверхностей белковых глобул при образовании ими четвертичной структуры или формировании комплексов ферментов с субстратами и ингибиторами. Источником

-первых двух типов движений могут быть тепловые колебания,  
-движения третьего типа (крупные перестройки) как правило, происходят за счет энергии взаимодействия белка с лигандами.

При изменении внешних условий (например, при повышении температуры) твердый белок ведет себя как кристалл, то есть он «терпит» до каких-то пор, а потом разом плавится, а не теряет своей формы и твердости постепенно, как стекло.

Это *фундаментальное свойство белков* тесно связано с надежностью их работы: как электрическая лампочка, белки ломаются по принципу «все или ничего», а не постепенно (последнее привело бы к ненадежности их действия, т.е. к расплыванию специфичности и т.д.).

Говоря о твердости, надо различать сравнительно:

-небольшие и действительно твердые однодоменные белки (они состоят из одной компактной глобулы) и

- более крупные белки, имеющие либо доменную, либо четвертичную структуру: слагающие их субглобулы могут сдвигаться и раздвигаться, и слегка, как твердое тело, деформироваться (*но не полностью перестраиваться!*) при функционировании белка.

*Четвертичная структура* - последний уровень в организации белковой молекулы, способна выполнять одну или несколько функций.

1.Объединение нескольких взаимосвязанных функций в единой структуре.

Например, *протеинкиназа* состоит из *двух субъединиц*, одна из которых катализирует перенос фосфата АТФ на белок, а другая является регуляторной.

2.*Архитектурная функция*. Например, в триозофосфатизомеразе зона связывания субстрата образована *двумя субъединицами*, которые при взаимодействии с фосфатной группой субстрата *сближаются, закрывая субстрат от окружающего растворителя*, так что реакция протекает при полном его отсутствии.

3.Регуляторная функция. Главная функциональная особенность четвертичной структуры, в том, что *относительно слабые взаимодействия между субъединицами*, характер которых зависит от третичной структуры, особенно удобны для регуляторных воздействий, т.е. управления активностью белков.

Ввиду относительной слабости меж субъединичных контактов изменения в третичной структуре одной субъединицы, передаются на зону ее контакта с другой субъединицей, изменяя характер этой зоны. Такое изменение приводит к перестройке всей четвертичной структуры и обеспечивает передачу эффекта от одной субъединицы к другим.

Зона контакта между субъединицами легко воспринимает изменения, происходящие при посттрансляционной модификации белка, например, при включении или отщеплении фосфатного остатка, что используется как регуляторный механизм.

Примером белка, четвертичная структура которого обеспечивает очень сложную регуляцию, является *аспартат* карбамоил-трансфераза *E.coli*. Это ключевой фермент в биосинтезе пиримидинов. Шесть каталитических субъединиц объединяются в два тримера, которые в ответ на присоединение субстратов могут в большей или меньшей степени взаимодействовать между собой. Конечный продукт пути биосинтеза пиримидинов (ЦТФ) связывается с регуляторными субъединицами и изменяет их конформацию, которое через перестройку четвертичной структуры передается на каталитические субъединицы.

4. Обеспечение множественных взаимодействий белка с протяженными структурами. За счет существования четвертичной структуры иммуноглобулины G объединяют в одной молекуле два идентичных центра связывания антигена. Кооперативность взаимодействия таких центров с макромолекулярными антигенами, например, бактериальными стенками, делает комплексы антиген-иммуноглобулин гораздо более прочными, чем это наблюдалось бы для мономерного белка.

### **Механизмы формирования пространственной структуры белка**

Как подсчитали ученые, перебор всех возможных вариантов укладки белковой цепи может занять время, превышающее время жизни Вселенной. Однако белок успевает найти верный вариант в течение считанных минут.

Все свойства белковых молекул (в том числе *способность изумительно точно катализировать превращения других молекул в клетке*) зависят от пространственной структуры белка. Пространственная структура образуется уникальной укладкой полипептида.

А последовательность аминокислот в цепи определяется его геномом и синтезируется рибосомой, после чего пространственная структура цепи формируется «сама собой» в ходе сворачивания белковой цепи. Разнообразие возможных укладок одной и той же цепи (как говорилось) невообразимо велико. Но у заданной последовательности аминокислот есть, как правило,

только одна стабильная/«правильная» структура, которая придает белку его уникальные свойства.

Стабильна она потому, что именно она обладает минимальной энергией.

Как же белковая цепь может спонтанно «найти» свою единственную стабильную структуру". Эта загадочность самоорганизации белков суммируется "парадоксом Левинталь»

Загадка состоит в том, что у белковой цепи есть бездна возможных конформаций (каждый аминокислотный остаток имеет около 10 возможных конформаций, а цепь, состоящая из 100 ака будет иметь, порядка,  $10^{100}$  возможных конформаций).

Если переход из одной конформации в другую занимает  $10^{-13}$  секунды, то «тупой» перебор всех  $10^{100}$  структур должен был бы занять порядка  $10^{80}$  лет, на фоне которых время жизни нашей Вселенной ( $10^{10}$  лет) - величина бесконечно малая.

Парадокс же заключается в следующем:

-с одной стороны, нативная пространственная структура по всем тестам ведет себя как самая стабильная из всех существующих структур цепи: белковая цепь попадает в нее при разных кинетических процессах.

-с другой стороны, нет никаких гарантий, что эта структура - самая стабильная из всех возможных: у белковой цепи просто нет времени на то, чтобы убедиться в этом!

«Как же белок выбирает свою нативную структуру среди бесчисленного множества возможных?» - спросил Сайрус Левинталь, и ответил: «По-видимому, самоорганизующийся белок следует по какому-то специальному «пути сворачивания», и та структура, где этот путь заканчивается, и является его нативной структурой».

Иными словами, Левинталь предположил, что нативная структура белка определяется не стабильностью, не термодинамикой, а кинетикой, т.е. она соответствует не глобальному, а просто быстро достижимому минимуму свободной энергии цепи. Решение "парадокса Левинталь" состоит в том, что к стабильной структуре цепи автоматически ведет сеть быстрых путей сворачивания. Для этого необходимо только, чтобы между нативной укладкой цепи и прочими ее глобулярными укладками существовала бы заметная энергетическая щель.

Итак, образование пространственной структуры - процесс спонтанный, не требующий ни дополнительной информации, ни источника энергии.

Структуру белка определяет его аминокислотная последовательность (а значит генетический код), а не работа сложных синтезирующих машин в клетке.

Основная задача всех внутриклеточных приспособлений и помощников - оберегать сворачивающийся белок от нежелательных контактов, которых было бы не избежать без строгого ока 'воспитателей'.

Строго говоря, белок способен к спонтанной самоорганизации и ренатурации, только если он не подвергся сильной пост-трансляционной модификации, т.е. если его химическая структура не была сильно нарушена после биосинтеза.

Пост-трансляционные модификации бывают самые разные. Как правило, химические модификации контролируются специальными ферментами, а не "самоорганизуются" в самом белке.

Кроме расщепления белковой цепи, наблюдается модификация концов цепи, ацетилирование, гликозилирование, пришивание липидов в определенные точки цепи, фосфорилирование определенных боковых групп.

Недавно был обнаружен даже "сплайсинг" белковых цепей (спонтанное вырезание куска цепи и склейка образовавшихся при этом концов). Изредка наблюдается и спонтанная циклизация кусочков белковой цепи.

*Процесс сворачивания белка в клетке.* Полипептидная цепь строится путем последовательного роста на рибосоме от N-конца к C-концу. Факторы, определяющие сворачивание N-концевой части растущего пептида различны в зависимости от того насколько удален этот участок от фиксированного C-конца.

Рассматривают 3 ситуации, в которых оказываются аминокислотные остатки растущего пептида.

1. В пептидилтрансферазном центре рибосомы 2 аминокислотных остатка всегда находятся в однотипной ориентации по отношению друг к другу, соответствующей альфа-спиральной конформации.

2. Участок растущего пептида длиной 30 - 40 остатков все еще оказывается закрытым рибосомой. Наиболее вероятной его конформацией при этом является  $\alpha$ -спираль.

3. Пептидная цепь, удаленная от пептидилтрансферазного центра далее чем на 30 - 40 аминокислотных остатков погружается в цитоплазму или мембрану эндоплазматического ретикулума.

В этом случае ситуация отлична от спонтанной ренатурации *in vitro*:

Во-первых, сворачивание начинается со стартовой конформации, поддерживаемой рибосомой.

Во-вторых, поиск путей сворачивания идет последовательно с растущего N-концевого участка.

В-третьих, в процессе сворачивания C-конец фиксирован.

*Сворачивание пептида ко-трансляционно на примере синтеза бета-галактозидазы.* Ферментативная активность белка бета-галактозидазы требует формирования четвертичной структуры. Установлено, что растущая цепь фермента, еще присоединенная к рибосоме, уже способна ассоциировать со свободными субъединицами белка, и комплекс на рибосоме проявляет ферментативную активность.

Рибосомы, несущие растущие цепи  $\beta$ -галактозидазы, реагируют с антителами против готового фермента еще задолго до завершения трансляции мРНК. Другими словами, *рибосома может способствовать определенному пути сворачивания.*

Благодаря существующей внутри клеток высоко координированной системы регуляции, полипептидная цепь с момента своего "рождения", сходя с рибосомы, попадает под контроль факторов, которые обеспечивают оптимальные условия для реализации быстрого и эффективного образования нативной пространственной структуры.

*Стадии сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию.* Согласно современным представлениям, процесс сворачивания имеет иерархическую природу.

1. Очень быстрое формирование элементов вторичной структуры, служащих как бы "затравками" для образования более сложных архитектурных мотивов (за десятую долю микросекунды альфа-спираль охватывает пептид из 20-30 остатков)

2. Специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры: сочетания нескольких  $\alpha$ -спиралей, нескольких  $\beta$ -цепей либо смешанные ассоциаты данных элементов (тоже очень быстрая стадия)

3. Формирование 'расплавленной глобулы' (создание основных элементов третичной структуры - сочетание  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -тяжей, соединяющих петель и образование гидрофобного ядра молекулы)

4. Формирование нативной структуры белка. Таким образом,  $\alpha$ -спираль рассматривают как стартовую структуру при сворачивании полипептидной цепи в нативную конформацию. В развернутой цепи белка  $\alpha$ -спираль термодинамически является наиболее вероятной структурой.

Дальнейшее формирование элементов третичной структуры осуществляется плавлением концов  $\alpha$ -спиралей и контролируется первичной структурой как расплавленного участка, так и, по крайней мере, концевой витка спирали. Другими словами, пространственная структура белка закодирована распределением аминокислотных боковых цепей на поверхности  $\alpha$ -спирали.

В отличие от  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структура в развернутой цепи формируется крайне медленно. Время ее формирования составляет секунды и более.

*На первом этапе* движущей силой процесса является образование водородных связей. Основной движущей силой *второй и третьей стадий* является возрастание энтропии за счет гидрофобных взаимодействий.

Гидрофобный эффект берет на себя, примерно, три четверти работы по созданию белковой глобулы. Он создает лишь расплавленную белковую глобулу. Отвердевает белок, как и все органические жидкости, под действием Ван-дер-ваальсовых сил, а также водородных и ионных связей.

Но это - окончательная огранка, а большая часть работы, вся черновая работа падает на гидрофобный эффект.

Интересна третья стадия формирования пространственной структуры молекулы белка.

Молекула приобретает пространственную структуру, близкую к структуре нативного белка. Вместе с тем, она еще не обладает присущей данному белку функциональной активностью. Это состояние, получившее название "*расплавленная глобула*", отличается от нативного *меньшей степенью упорядоченности структуры*.

Установлено, что размер спиральных участков (схематично цилиндры) в расплавленной глобуле несколько меньше, и неполярные группы, формирующие гидрофобное ядро молекулы, "упакованы" недостаточно плотно. В глобуле возникают поры, куда вода проникает, не разваливая расплавленную глобулу. Отсутствие ряда специфических взаимодействий приводит к изменению ориентации подвижных петель; в целом молекула более лабильна и склонна к "слипанию" с другими такими же молекулами с образованием агрегатов.

Таким образом, неспецифическая агрегация может уменьшать число молекул белка, находящихся на правильном пути сворачивания, то есть снижать эффективность этого процесса.

Как показали модельные эксперименты, проведенные *in vitro*, образование "*расплавленной глобулы*" происходит значительно *быстрее*, чем ее переход в нативную структуру. Эта реакция, связанная с перебором разных конформаций, является, *самой медленной* стадией процесса сворачивания (от секунд до десятков минут).

Вероятность агрегации сильно возрастает при повышении температуры (подумайте: почему?) и концентрации белка, поэтому эффективное спонтанное сворачивание полипептидной цепи происходит в разбавленных растворах и при низких температурах.

Условия, существующие в клетке, сильно отличаются по этим параметрам. И вместе с тем, в физиологических условиях вновь синтезируемые полипептидные цепи сворачиваются достаточно быстро и эффективно.

Следовательно, в клетке должны существовать *специальные механизмы регуляции процесса сворачивания*.

*Внутриклеточная регуляция формирования пространственной структуры белка.* Согласно современным представлениям, клетка располагает, по крайней мере, двумя типами механизмов регуляции формирования пространственной структуры белка:

-основан на регуляции скорости превращения «расплавленной глобулы» в нативную структуру;

-обеспечивает защиту частично свернутого белка от неспецифической агрегации.

*Ферменты, ускоряющие процесс сворачивания.* Сворачивание полипептида в клетке сопровождается ферментативными модификациями цепи. В реакциях принимают участие:

-Деформилаза отщепляет формильную группу концевого метионина вскоре после выхода N-конца растущей цепи из рибосомы.

- Аминопептидаза способна отщеплять N-концевой метионин.

- Мембранная сигнальная пептидаза отщепляет сигнальный пептид.

- Несколько ферментов принимают участие в гликозилировании белка.

Стадия превращения «расплавленной глобулы» в нативный белок является самой медленной, ограничивающей скорость всего процесса. Обусловлено это тем, что установление «оптимального набора» специфических взаимодействий, стабилизирующих нативную конформацию, связано с необходимостью структурных перестроек, происходящих относительно медленно. К их числу относится цис-транс-изомеризация пептидной связи, предшествующей остатку пролина.

Поскольку транс-конформация более стабильна, она преобладает во вновь синтезированной полипептидной цепи. Но для образования нативной структуры белка необходимо, чтобы около 7% связей, образованных остатками пролина, изомеризовались в цис-конформацию. Эта реакция, приводящая к повороту цепи на 180° вокруг C-N связи, идет чрезвычайно медленно. *In vivo* она ускоряется благодаря действию специального фермента - *пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы*.

При этом второй фермент, ускоряющий процесс сворачивания, катализирует образование и изомеризацию дисульфидных связей. Он локализуется в просвете эндоплазматического ретикула и способствует сворачиванию секреторируемых клетками белков, содержащих дисульфидные

мостики (например, инсулин, рибонуклеаза, иммуноглобулины). В образовании дисульфидных связей, стабилизирующих нативную структуру белка, и расщепление «неправильных» S-S-мостиков принимает участие *протеиндисульфидизомераза*. Характерная особенность выше названных ферментов состоит в том, что они:

- не способны связываться с нативными белками;
- их субстраты имеют частично развернутую структуру, близкую к состоянию «расплавленной глобулы».

*Ускоряя стадии, лимитирующие скорость сворачивания, ферменты способствуют удержанию белка на правильном пути приобретения нативной структуры, снижая риск протеолитической дегградации и агрегации лабильных промежуточных форм.*

*Шапероны и шаперонины.* Не подлежит сомнению, что важнейшую роль в регуляции сворачивания белков *in vivo* играют белок-белковые взаимодействия третьего уровня, возникающие между отдельными белками-шаперонами. Скорее всего, клетка располагает высокоорганизованными ансамблями белков, действующих согласованно. В состав таких ансамблей, вероятно, образующихся в цитозоле эукариотической клетки, входят, помимо hsp70, шапероны других типов (например, hsp90 и связанные с ним низкомолекулярные шапероны, не требующие АТФ для своего функционирования), ферменты, ускоряющие процесс сворачивания, а также ряд других белков, роль которых пока остается неясной. Расшифровка молекулярных механизмов функционирования таких «машин сворачивания» - одна из актуальных проблем современной науки.

В середине 80-х годов началась исследование механизмов регуляции сворачивания белков *in vivo*. Было обнаружено, что в клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение правильного характера сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру. Эти белки, связываясь с развернутой или частично развернутой конформацией полипептидной цепи, не дают ей «запутаться», образовать неправильные структуры. *Они удерживают частично развернутый белок, способствуют его переносу в разные субклеточные образования, а также создают условия для его эффективного сворачивания.* Эти белки получили название «молекулярные шапероны», образно отражающее их функцию (chaperon - пожилая дама, сопровождающая молодую девушку на балы и пр., наставник, сопровождающий группу молодежи). К настоящему времени описано несколько классов шаперонов, различающихся по структуре и специфическим функциям. Все шапероны являются так называемыми «белками теплового шока», синтез которых резко увеличивается в стрессовых



для клетки ситуациях. Поэтому сокращенное название этих белков - hsp (heat shock proteins). Однако и в нормальных условиях каждая клетка содержит определенный набор шаперонов, необходимых для ее жизнедеятельности.

*Классификация шаперонов* основана на величине молекулярной массы составляющих их субъединиц, которая варьирует от 10 кДа (hsp10) до 90 кДа (hsp90) и выше. По характеру выполняемых этими белками функций их можно разделить на два больших семейства - шапероны, или hsp70, и шаперонины, к которым относятся hsp60 и hsp10

*Шапероны удерживают белки в развернутом состоянии. Взаимодействие шаперонов с синтезируемым белком начинается еще до схождения полипептидной цепи с рибосомы.*

Связываясь с отдельными участками «опекаемой» ими полипептидной цепи, молекулы hsp70 образуют прочные комплексы, удерживающие цепь в развернутом состоянии. Взаимодействие не является специфическим и в основном реализуется благодаря силам гидрофобного характера. Прочно фиксированная на шаперонах полипептидная цепь не способна к сворачиванию в нативную структуру, так как не обладает необходимой для этого подвижностью. Главная функция hsp70 состоит в удержании вновь синтезируемых белков от неспецифической агрегации и в их передаче другому «белку-помощнику», *шаперонину*, роль которого - обеспечить оптимальные условия для эффективного сворачивания.

В клетках эукариот шапероны выполняют важную роль в транспорте белков через мембраны митохондрий, хлоропластов и эндоплазматического ретикулума. Такой транспорт необходим, так как многие белки клеточных органелл синтезируются в цитоплазме, а окончательно сворачиваются в месте своей постоянной локализации. Роль hsp70, «подносящего» к мембране частично развернутый белок, становится понятной, если учесть, что разворачивание - обязательное условие проникновения белковой молекулы через мембрану. Интересно, что митохондриальный матрикс содержит собственные шапероны, «подхватывающие» пересекающий мембрану белок и способствующие его «втягиванию» в митохондрию. Аналогичный механизм реализуется и при проникновении синтезированных в цитоплазме белков в просвет эндоплазматического ретикулума.

Возникает вопрос: *от чего же зависит прочность связывания шаперона с полипептидной цепью?*

*Каков механизм, позволяющий развернутому белку освободиться от hsp70 и перейти на шаперонин (hsp60)?* Детальные исследования, проведенные на системах белков, выделенных из клеток бактерий, показали, что *главным фактором является способность шаперона связывать АТФ, в определенных*

условиях осуществлять его гидролиз и изменять прочность взаимодействия с полипептидной цепью в зависимости от природы связанного нуклеотида (АТФ или АДФ). С многодоменными белками в клетке работают «большие» шапероны, или шаперонины типа GroEL и GroES или TriC.

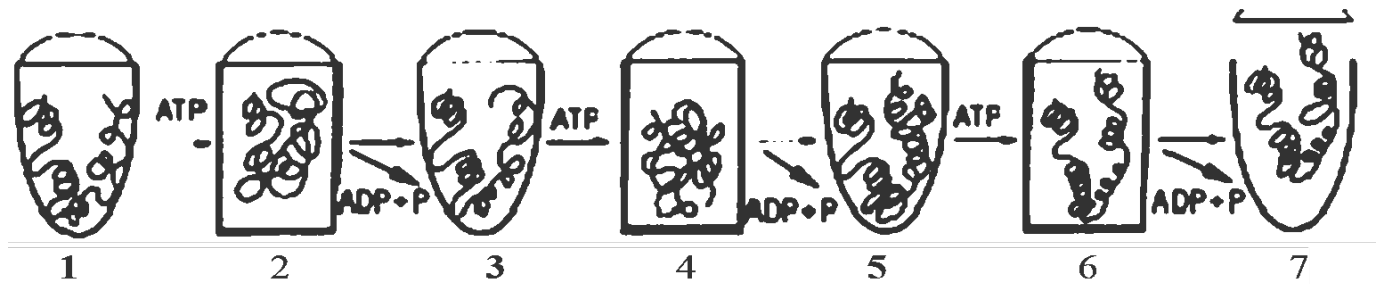
В отличие от довольно просто построенных шаперонов (состоящих из одной-двух полипептидных цепей), шаперонины представляют собой сложные олигомерные структуры.

Наиболее изученные hsp60 митохондрий, а также клеток *E. coli*, построены из 14 субъединиц, организованных в два семичленных кольца, лежащих одно под другим. В центре построенного таким образом цилиндра имеется полость - канал (диаметром 45 ангстрем), в котором и происходит сворачивание полипептидной цепи, перешедшей на шаперонин с шаперона hsp70. Иногда такую «пробирку» называют «ячейкой Анфинсена». После того как в канал молекулы шаперонина попадает полипептидная цепь, вход прикрывает hsp10 - белковое кольцо, построенное из 7 субъединиц. Создав шаперонины, природа нашла элегантный способ обеспечить сворачивание белка в условиях, исключающих его агрегацию с другими белками внутри клетки. Действительно, попадая в центральный канал молекулы шаперонина, единичная полипептидная цепь оказывается полностью изолированной и получает возможность реализовывать медленные стадии сворачивания с очень высоким выходом нативного белка.

Как и в случае hsp70, связывание развернутого белка с шаперонином и его отщепление регулируются АТФ-азной активностью шаперонина. В связывании сворачивающегося белка (находящегося в состоянии «расплавленной глобулы») может принимать участие каждая из 14 субъединиц олигомерной молекулы шаперонина. Количество мест связывания зависит от стадии сворачивания: чем ближе структура к нативной, тем меньше участков, «распознаваемых» шаперонином. Роль маленького шаперонина hsp10, называемого ко-шаперонином, закрывающего вход в центральный канал, состоит в том, чтобы предотвращать «преждевременный» выход во внешнюю среду белка, не завершившего окончательное сворачивание в нативную структуру.

*Модель сворачивания белков с участием шаперонинов.* Белок в состоянии «расплавленной глобулы» связывает гидрофобные участки «стенок» центрального канала молекулы шаперонина. Это взаимодействие стимулирует присоединение АТФ, в результате которого структура шаперонина меняется (гидрофобные участки «стенок» экранируются), и белок освобождается, переходя в центральный канал (2 стадия). Спонтанное сворачивание будет продолжаться до тех пор, пока не произойдет гидролиз АТФ и переход

шаперонина в состояние, способное связывать частично развернутый белок (3 стадия). Стадии 1, 3, 5 различаются количеством «развернутых» участков структуры белка, взаимодействующих со «стенками» центрального канала. Стадия 7- нативный белок, не способный связываться с шаперонином, выходит наружу.



Данная модель дает лишь самое общее представление о механизмах функционирования шаперонинов.

Она основана на изучении этих белков, изолированных из митохондрий или бактериальных клеток. Между тем, недавно было выяснено, что цитоплазматический шаперонин клеток эукариот весьма существенно отличается по своим свойствам: он построен из неодинаковых субъединиц и, по-видимому, не взаимодействует с ко-шаперонином. Вероятно, что общие принципы функционирования, установленные для hsr60, распространяются и на этот шаперонин, однако конкретные механизмы, вовлеченные в регуляцию эффективности сворачивания белков в разных компартментах клетки, могут существенно различаться.

*Роль белок-белковых взаимодействий в формировании пространственной структуры.* Итак, накопленная к настоящему времени информация позволяет заключить, что определяющую роль в регуляции формирования пространственной структуры белка играют *белок-белковые взаимодействия*. Они реализуются, во-первых, между выставленными на поверхность участками полипептидной цепи и специальными белками, имеющими две функции:

- предотвращать неспецифическую агрегацию вновь синтезируемых белков и

- обеспечивать транспорт этих белков в те внутриклеточные компартменты, где они постоянно локализуются и функционируют. Такая, диспетчерская роль шаперонов дополняется их участием в проникновении белков через мембраны. Способность шаперонов (и шаперонинов) распознавать ненативные участки структуры белков лежит также в основе элегантного механизма, обеспечивающего чрезвычайно высокую эффективность сворачивания.).

Второй уровень белок-белковых взаимодействий, вовлеченных в регуляцию сворачивания белка *in vivo* это взаимодействия между

субъединицами в сложных молекулах шаперонинов, обеспечивающие согласованное изменение их конформации в каждом цикле сворачивания. Эта очень интересная область остается пока почти не разработанной.

Таким образом, не подлежит сомнению, что важнейшую роль в регуляции сворачивания белков *in vivo* играют *белок-белковые взаимодействия третьего уровня*, возникающие между отдельными белками-шаперонами. Скорее всего, клетка располагает высокоорганизованными ансамблями белков, действующих согласованно. В состав таких ансамблей, вероятно, образующихся в цитозоле эукариотической клетки, входят, помимо hsp70, шапероны других типов (например, hsp90 и связанные с ним низкомолекулярные шапероны, не требующие АТФ для своего функционирования), ферменты, ускоряющие процесс сворачивания, а также ряд других белков, роль которых пока остается неясной. Расшифровка молекулярных механизмов функционирования таких «машин сворачивания» - одна из актуальных проблем современной науки.

### **Заключение**

Таким образом мы рассмотрели общие принципы работы с белками и ферментами. Выяснили, что работа ферментов основана на высоко специфическом взаимодействии белков с молекулой-лигандом, для которого необходима устойчивая пространственная структура. Влияние внешних факторов, различных лигандов, эффекторов на активность фермента можно лучше понять, имея представление о механизме формирования пространственной структуры фермента.

Мы рассмотрели механизмы формирования пространственной структуры, потому что невозможно понять, как функционирует фермент, не зная как он устроен. Работа ферментов основана на высоко специфическом взаимодействии белков с молекулой-лигандом, для которого необходима устойчивая пространственная структура. Влияние внешних факторов, различных лигандов, эффекторов на активность фермента можно лучше понять, имея представление о механизме формирования пространственной структуры фермента.

Далее мы рассмотрим структуру белка на уровне доменов, узнаем какую роль играет доменная организация молекулы фермента в катализе.

### **Контрольные вопросы по изучаемой теме**

1. Строение ферментов.
2. Химическая природа ферментов.
3. Молекулярные массы ферментов-белков.
4. Одно- и двухкомпонентные ферменты.

5. Коферменты и простетические группы, их важнейшие представители.

6. Первичная, вторичная, третичная, четвертичная структура ферментов.

7. Принципы пространственной организации молекулы фермента, проблема сворачивания полипептидной цепочки в нативную конформацию, её важность для функционирования ферментов.

1. В чем состоит парадокс Левенталя?

2. Назовите стадии сворачивания белка.

3. В чем состоит иерархический принцип сворачивания белка.

4. Решение парадокса Левинталя.

5. Термодинамическая характеристика процесса сворачивания.

6. Какая существует внутриклеточная регуляция пространственной структуры белка?

7. Какие ферменты регулируют процесс сворачивания белка.

8. Что такое шапероны. Какую функцию они выполняют в клетках?

9. Что такое шаперонины. Какова их функция?

10. Роль мультидоменной организации молекулы фермента, значение подвижности доменов в катализе.

#### **Тема 4 -Строение фермента. Домены. Активный центр фермента**

План

1. Домены и формирование пространственной структуры белка-фермента.

2. Корреляции между доменной организацией и размером белка.

3. Структурная автономия и функциональная автономия активного центра.

4. Активный центр фермента. Строение.

5. Общие закономерности формирования активных центров.

6. Взаимодействие активного центра с субстратом: модели жёсткого и индуцированного соответствия.

7. Роль методов ингибиторного анализа в установлении закономерности состава и структуры активных центров у ферментов.

8. Аллостерический центр. Отличительные особенности.

9. Число активных центров. Доказательства наличия активного центра в ферментах.

10. Олигомерные ферменты. Изоферменты.

1. Домены и формирование пространственной структуры белка.

Итак, вспомним, что такое домен и его роль в каталитической активности белка. Свойственный белкам способ организации пространственной структуры - формирование гидрофобного ядра и мозаичной поверхности, ограничивает размеры глобулы, т.к. с увеличением ее объема труднее сформировать строго

гидрофобное ядро. Кроме того, ограничение по размеру связано с невозможностью формирования хорошо развитой системы не ковалентных взаимодействий в коротких пептидах. Начиная, примерно, с молекулярной массы 14-16 кДа полипептидная цепь формирует домены.

Домены составляют подуровень структурной организации белка на пути от вторичной к третичной структуре. Свертывание крупных белковых глобул при биосинтезе белка проходит через стадию формирования доменов. Выделяют домены с помощью ограниченного протеолиза.

Представление о пространственной организации белковой цепи в форме нескольких слабо связанных между собой глобулярных областей высказывалось рядом авторов при анализе кристаллографических структур отдельных белков. Впервые это было сделано Д. Филлипсом в 1996 г. при описании структуры лизоцима в виде нескольких 'компактных глобулярных блоков'.

В 1971 г. Каннингхэм Б. и сотр. была сформулирована гипотеза доменов в предположении о независимости генетического контроля каждой структурно-автономной области для характеристики трехмерных структур белков. В 1972 г. доменная организация трехмерной структуры была отмечена у альфа-химотрипсина Бирктофтом Дж. и Блоу Д.: структура белка включает 2 домена, каждый из которых имеет цилиндрическую форму, образованную шестицепочечной антипараллельной бета-структурой у *альфа-химотрипсин*.

Трехмерные структуры имеют эластазы, трипсин, пепсин и нативная конформация папаина. Они обладают такой же топологией как альфа-хемотрипсин, но домены имеют разную структуру: одни содержат только альфа-спирали, а другие преимущественно бета-структуры.

Уетлауфер Д. объяснял существование доменов спецификой механизма самопроизвольной сборки аминокислотной последовательности в нативную конформацию. Он различал 2 вида доменов: с непрерывной и разрывной полипептидной цепью. Элементом, цементирующим структуру домена, считается ядро (нуклеация) из 8 - 18 остатков. Ядро служит матрицей для укладки полипептидной цепи домена размером в 40 - 150 аминокислотных остатков. Такая организация домена обеспечивает быструю спонтанную сборку всей структуры белка. Отдельные домены сложных белков кодируются разными экзонами. Парвис и соавт. идентифицировали в составе гена трехдоменной пируваткиназы участок, отвечающий продолжительной паузе в трансляции аминокислотной последовательности. Авторы предполагали, что подобные паузы необходимы для обеспечения правильной сборки мультидоменных белков.

Четкой корреляции между доменной организацией и размером белка не существует. Например, молекулы бактериохлорофилла (330 а.к.о) и карбоксипептидазы (307 а.к.о) представляют собой цельные глобулы. А лизоцим Т4 (164 а.к.о) и протеиназа 13 (186 а.к.о) состоят из двух доменов.

Отсутствует связь между доменной организацией и содержанием в белке вторичных структур. Известны домены, в которых альфа-спирали и бета-структуры составляют около 50% (термолизин). Однако в ряде случаев для доменов нельзя указать отдельной функциональной роли.

Например, в структуре папаина хорошо различимы два домена. Во впадине, разделяющей домены, расположен каталитический центр, причем образующие его функциональные группы размещены в обоих доменах (cys-25, his-159, asp-175). Наличие доменов создает структурные предпосылки для большей внутренней гибкости, динамики белковых молекул, достигаемой смещением доменов относительно друг друга.

Часто Структурная автономия дополняется функциональной. Функциональный домен - это минимальная часть полипептидной цепи, которая достаточна для сохранения одной из активностей целого белка и может автономно свернуться в правильную нативную структуру. Например, нуклеотид-связывающий домен дегидрогеназ, ответствен за взаимодействие с одним из субстратов реакции - коферментом NAD или NADH.

Предполагают, что домены соответствуют раннему этапу эволюции пространственной структуры многих белков, образовавшихся из глобул существенно меньшего размера. Тот факт, что границы доменов соответствуют границам экзонов, позволяет предполагать, что они могли выступать как своеобразные блоки в процессе эволюции белков. Иногда один и тот же домен встречается более одного раза в мономерном белке, что придает структуре элементы квазисимметрии.

Такого рода связки однотипных доменов могли образоваться за счет дубликации генов, тогда как соединение различных доменов, как считают, произошло в результате слияния генов.

Видимо, Ферменты, как и другие глобулярные белки, сконструированы по модульному принципу: различные элементы, необходимые для выполнения биологических функций, объединены в одной полипептидной цепи.

#### *Активный центр фермента. Строение*

Каким же образом ферменты повышают скорость химических реакций?

Если есть смесь двух веществ, то реакция между ними возможна, но она не пойдёт без затраты некоторого количества энергии. Энергия, необходимая для того, чтобы заставить вещества вступить в реакцию, называется энергией

активации [Ea]. Чем больше необходимая энергия активации, тем ниже скорость реакции при данной температуре.

В любой совокупности молекул вещества *индивидуальные молекулы при постоянной температуре сильно различаются по количеству содержащейся в них энергии*. Фермент, соединяясь с субстратом, образует короткоживущий *фермент-субстратный комплекс, которому соответствует более низкая энергия активация*. После завершения реакции фермент-субстратный комплекс распадается на продукт и фермент. Фермент по окончании реакции может взаимодействовать с новой молекулой субстрата.

*Именно таким образом ферменты снижают энергетический барьер реакции: в их присутствии гораздо большее число молекул вступает в реакцию за единицу времени.*

#### *Активный центр фермента*

При изучении механизма химической реакции, которая катализируется ферментами, необходимо точное знание:

- геометрии третичной структуры фермента,
- химической природы участка молекулы фермента, который обеспечивает высокую скорость каталитической реакции.

Участвующие в реакциях *молекулы субстратов* часто имеют *небольшие размеры* по сравнению с молекулами ферментов, поэтому было высказано предположение, что *при образовании фермент-субстратных комплексов в непосредственный контакт с молекулой субстрата, вступает ограниченная часть аминокислот пептидной цепи*. Отсюда возникло представление об *активном центре фермента*.

Активный центр – это уникальная комбинация аминокислотных остатков в молекуле фермента, которая обеспечивает непосредственное связывание ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа. У простых ферментов в связывании и превращении субстрата принимают участие следующие группировки аминокислотных радикалов: у *сложных ферментов* в состав активного центра входят *простетические группы*.

В *активном центре* условно различают *каталитический центр*, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и *связывающий центр*, или *контактную («якорную») площадку*, которая обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом. В свою очередь *молекула субстрата* содержит *функционально различные участки*: например, *субстраты эстераз* или *протеиназ* имеют *одну специфическую связь*, которая атакуется со стороны фермента, и *один или несколько участков, избирательно связываемых ферментом*.



Несмотря на огромное разнообразие структуры ферментов, их специфичности и механизма действия, существует ряд *общих закономерностей формирования активных центров.*

Во-первых, на активный центр приходится относительно малая часть объёма фермента. Роль остальных аминокислотных остатков, в том, чтобы обеспечить молекуле фермента правильную глобулярную форму.

Во-вторых, активный центр – это сложная трёхмерная структура, и в её образовании принимают участие группы, принадлежащие разным частям линейной последовательности аминокислот. Радикалы аминокислот, образующих активный центр, оказываются вблизи друг от друга в результате формирования третичной структуры белка.

В-третьих, активный центр имеет форму узкого углубления или щели, в которую ограничен доступ воде, за исключением тех случаев, когда вода является одним из реагирующих веществ. В этом углублении присутствует несколько полярных аминокислотных остатков, необходимых для связывания субстрата и катализа.

В-четвёртых, в составе активного центра условно выделяют две части:

а) контактный или якорный участок, где происходит связывание субстрата в нужной ориентации;

б) каталитический участок, обеспечивающий протекание реакции.

Каталитический центр - это та область (зона) активного центра фермента, которая непосредственно участвует в химических преобразованиях субстрата. Формируется он за счет радикалов *двух, иногда трех аминокислот, расположенных в разных местах полипептидной цепи фермента, но пространственно сближенных* между собой за счет изгибов этой цепи. Например, *каталитический центр "серин-гистидиновых" ферментов формируется за счет радикалов аминокислот серина и гистидина.* Если фермент является сложным белком, то в формировании каталитического центра нередко участвует простетическая группа молекулы фермента (кофермент). Коферментную функцию выполняют все водорастворимые витамины и жирорастворимый витамин К. (подробнее о коферментной функции витаминов см. пособие "Ферменты", стр.11).

Адсорбционный центр - это участок активного центра молекулы фермента, на котором происходит сорбция (связывание) молекулы субстрата. Он *формируется одним, двумя, чаще тремя радикалами аминокислот, которые обычно расположены рядом с каталитическим центром.*

Главная его функция - связывание молекулы субстрата и передача этой молекулы каталитическому центру в наиболее удобном положении (для каталитического центра).

Эта сорбция происходит только за счет слабых типов связей и потому является обратимой.

Молекулярные механизмы действия ферментов условно можно разделить на несколько этапов. Самое главное, что в результате одного или нескольких механизмов происходит замена реакции на другую реакцию с более низкой энергией активации.

Сближение и ориентация. Фермент осуществляет своё каталитическое действие, только находясь в прямом контакте с субстратом, одним или несколькими. При этом фермент обеспечивает пространственное расположение одного или двух субстратов так, чтобы это было выгодно для каталитически активных групп. Упорядоченное расположение приводит к снижению энергии активации. По этому механизму обычно действуют лигазы/синтетазы.

Напряжение и деформация. Это теория "дыбы". Присоединение фермента к субстрату меняет конформацию субстрата, как бы растягивает, деформирует субстрат. Чем больше длина межатомной связи, тем меньше энергия её разрыва. Места растяжения легче атакуются молекулами воды. Этот механизм хорошо объясняет действие гидролаз, лиаз, некоторых трансфераз.

Очевидно, что именно структура адсорбционного центра определяет субстратную специфичность фермента, то есть требования фермента к молекуле химического вещества, чтобы она могла стать для него подходящим субстратом

В-пятых, субстраты относительно слабо связываются с ферментами. У простых ферментов в связывании и превращении субстрата принимают участие следующие группировки аминокислотных радикалов:

-полярные заряженные: карбоксильные группы глутамата и аспартата, аминогруппы лизина; гуанидиновые группы аргинина; имидазольные группы гистидина;

-полярные незаряженные: гидроксильные группы серина и треонина; сульфгидрильные группы цистеина; фенольные группы тирозина;

-неполярные группы: углеводородные цепи алифатических аминокислот; ароматические кольца фенилаланина и триптофана.

*У сложных ферментов в формировании активных центров принимают участие функциональные группы коферментов.*

В образовании фермент-субстратных комплексов принимают участие те же молекулярные взаимодействия, что и обеспечивают фолдинг макромолекул, межклеточные контакты и другие процессы в биологических системах:

-водородные связи между полярными незаряженными группировками субстрата и фермента;

-ионные связи между противоположно заряженными группировками субстрата и фермента;

-гидрофобные взаимодействия между неполярными группировками субстрата и фермента.

Эти три основных типа не ковалентных связей различаются по своей геометрии, энергии, специфичности.

Специфичность связывания субстрата с ферментом зависит от строго определённого расположения атомов в активном центре.

В настоящее время взаимодействие субстрата и фермента объясняется гипотезой топохимического соответствия. Сохраняя основные положения гипотезы взаимоиндуцированной настройки субстрата и фермента, новая гипотеза фиксирует внимание на том, что специфичность действия ферментов объясняется в первую очередь узнаванием части субстрата, которая не изменяется при катализе. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают многочисленные точечные гидрофобные взаимодействия и водородные связи.

Значение конформационных изменений, возникающих в молекуле фермента в процессе присоединения к ней субстрата показывают на примере гексокиназы. Гексокиназа – фермент, который катализирует фосфорилирование глюкозы в реакции с АТФ. Присоединение небольшой молекулы глюкозы к активному центру гексокиназы приводит к сближению полипептидных цепей двух субъединиц, которые, как клещи, захватывают молекулу глюкозы. По-видимому, при такой индуцированной подгонке конформации фермента к структуре субстрата молекула глюкозы деформируется и облегчается её взаимодействие с молекулой АТФ.

Таким образом, особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент специфическим образом связывает субстрат, и все реакции протекают внутри фермент-субстратного комплекса.

Активный центр формируется из функциональные группы отдельных аминокислот. К *каталитически активным радикалам* белка относятся:

-*нуклеофильные группы* (имидазол гистидина, оксигруппа серина или тирозина, тиольная группа цистеина, ε-аминогруппа лизина, ионизированные карбоксилы аспарагиновой и глутаминовой кислот и др.) и

-*электрофилы* (ион имидазолия, неионизованные карбоксильные группы, ионы металлов и т. п.).

В формировании активного центра принимают участие:

-молекулы воды, входящие в гидратационные слои,

-ионы металлов, связанные с белком, и органические кофакторы. -- жесткость такой конструкции придают  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуры и дисульфидные мостики.

Следовательно, структурные особенности поверхностного слоя белковых глобул позволяют сосредоточить в активном центре большое число различных по химической природе функциональных групп, способных не только сорбировать субстрат на ферменте, но взаимодействовать с ним химически.

Как мы говорили, зона активного центра располагается в области стыка доменов, например активный центр сериновых протеаз типа трипсина, находится *на стыке двух  $\beta$ -структурных доменов*. Такое положение активного центра обуславливает формирование особой среды, отличающейся от той, что окружает молекулы в растворе (клетке).

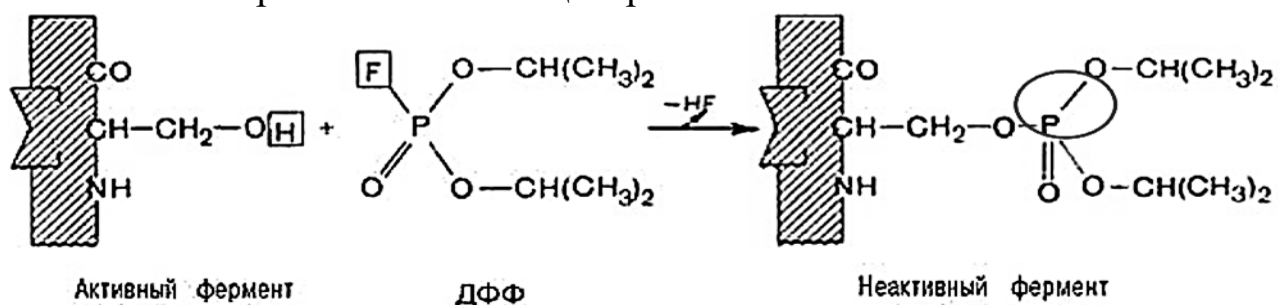
Среда активного центра отличается, как правило, сильно развитой *микрөгетерогенностью*. Это связано с тем, что в образовании поверхностного слоя белка принимают участие не только заряженные и полярные аминокислотные остатки (которым, поскольку они сильно сольватированы, термодинамически выгодно контактировать с водой), но и аполярные углеводородные боковые группы. Например, для  $\alpha$ -химотрипсина методом рентгеноструктурного анализа было найдено, что в поверхностный слой входят 10 остатков лей (из 19), 10 вал (из 23), 10 иле (из 15). Более того, все остатки фен (6) расположены непосредственно на поверхности глобулы. В поверхностный слой прочно встроены также и молекулы воды. В целом микросреда поверхностного слоя обладает, как правило, более *низкой диэлектрической проницаемостью* (присущей органическим растворителям) по сравнению с водой. Так, значение диэлектрической проницаемости в сорбционном участке активного центра химотрипсина меньше 10 (для воды  $\epsilon = 80$ , в бутаноле  $\epsilon = 8$ , в октане  $\epsilon = 2$ ).

Микросреда поверхностного слоя обнаруживает сильно *пониженную полярность* по сравнению с водой. На это указывают результаты сравнения УФ- и видимых спектров поглощения ароматических соединений в воде, в органическом растворителе и при солюбилизации их в поверхностном слое белковой глобулы. В тех участках ферментной глобулы, где непосредственно происходит гидрофобное взаимодействие аполярных аминокислотных остатков полипептидных цепей, полярность микросреды должна быть еще более низкой.

Поверхностный слой белковой глобулы характеризуется повышенной микровязкостью. Эффекты повышенной *микровязкости* особенно сильно развиты в области активного центра. Здесь полипептидные цепи белка

расположены настолько жестко, что затрудняют не только поступательную диффузию в глобулу, но также и вращательное движение связанной молекулы.

*Роль методов ингибиторного анализа в установлении закономерности состава и структуры активных центров у ферментов.* Выявление химической природы и вероятной топографии групп активного центра – проблема первостепенной важности. Она сводится к определению природы аминокислот, их последовательности и взаиморасположения в активном центре. Для идентификации так называемых существенных аминокислотных остатков используют специфические ингибиторы ферментов, методы «мягкого» (ограниченного) гидролиза в сочетании с химической модификацией, включающей избирательное окисление, связывание, замещение остатков аминокислот и др. При помощи *методов ингибиторного анализа* были предприняты попытки установить закономерности состава и структуры активных центров у ферментов, относящихся к разным группам. В частности, при использовании диизопропилфторфосфата (ДФФ), принадлежащего к нервным ядам, наблюдается полное выключение активного центра холинэстеразы – фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина на холин и уксусную кислоту. Оказалось, что этот ингибитор имеет близкое структурное сходство с ацетилхолином и подобно ему взаимодействует с ОН-группой остатка серина в активном центре.



Вызывая фосфорилирование серина в активном центре ряда других ферментов, ДФФ также инактивирует их действие. Показано, что ДФФ избирательно фосфорилирует в каждом чувствительном к нему ферменте *только* один остаток серина, наделенный функциональной активностью.

Учитывая этот механизм действия ДФФ, сделаны попытки определения природы аминокислот в окружении «каталитического» остатка серина у ряда ферментов.

Фермент	Последовательность остатков аминокислот вокруг серина
Химотрипсин	–Гли–Асп– <b>Сер</b> –Гли–Гли–
Трипсин	–Гли–Асп– <b>Сер</b> –Гли–Про–Вал–
Тромбин	–Асп– <b>Сер</b> –Гли–
Эластаза	–Асп– <b>Сер</b> –Гли–
Бутирилхолинэстераза	–Гли–Глу– <b>Сер</b> –Ала–
Ацетилхолинэстераза	–Глу– <b>Сер</b> –Ала–
Алиэстераза печени	–Гли–Глу– <b>Сер</b> –Ала–Гли–Гли–
Щелочная фосфатаза ( <i>E. coli</i> )	–Тре–Асп– <b>Сер</b> –Ала–Сер–Ала–
Субтилизин ( <i>B. subtilis</i> )	–Гли–Тре– <b>Сер</b> –Мет–Ала–
Протеаза ( <i>Aspergillus orizae</i> )	–Тре– <b>Сер</b> –Мет–Ала–
Фосфоглюкомутаза	–Тре–Ала– <b>Сер</b> –Гис–Асп–
Фосфорилаза	–Гли–Иле– <b>Сер</b> –Вал–Арг–

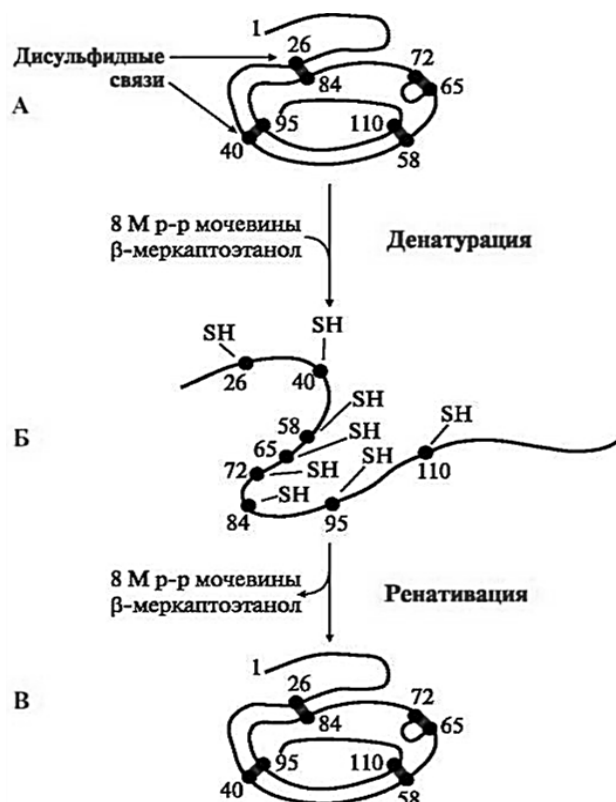
Из таблицы видно, что ферменты, сходные по типу действия, хотя и различаются специфичностью, могут иметь почти одинаковую последовательность аминокислотных остатков в тех участках, которые примыкают к остатку серина, несущему функционально активную гидроксильную группу.

Существенное значение ОН-группы серина для акта катализа было доказано химическим блокированием или ее удалением, когда эстеразы полностью лишались ферментативной активности.

Предполагают, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка-фермента на рибосоме, когда линейная одномерная структура пептидной цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации. Образовавшийся белок приобретает информацию совершенно нового типа, т.е. функциональную (в частности, каталитическую).

Любые воздействия, приводящие к денатурации, т.е. нарушению третичной структуры, приводят к искажению или разрушению структуры активного центра и соответственно потере ферментом каталитических свойств.

Если при подходящих внешних условиях удастся восстановить нативную трехмерную структуру фермента (ренатурировать его), то восстанавливается и его каталитическая активность. Это было показано впервые на примере рибонуклеазы поджелудочной железы:



## Денатурация и ренативация рибонуклеазы

А - нативная молекула рибонуклеазы, в третичной структуре которой имеются 4 дисульфидные связи; Б - денатурированная молекула рибонуклеазы; В - нативная молекула рибонуклеазы, в структуре которой вновь образованы 4 дисульфидные связи между теми же остатками цистеина.

Помимо активного центра, в молекуле фермента может присутствовать также аллостерический центр. *Аллостерический центр* – это участок молекулы фермента, способный присоединять определённые молекулы (эфффекторы или модуляторы). Аллостерический центр специфичен по отношению к своему эфффектору подобно тому, как активный центр специфичен по отношению к своему субстрату.

Между аллостерическим центром одной из субъединиц фермента и аллостерическим эфффектором могут возникать нековалентные взаимодействия (водородные, ионные и гидрофобные). Это приводит к обратимому изменению конформации остальных субъединиц молекулы фермента, в том числе изменению конформации активного центра. В результате активность фермента снижается или повышается.

*Ферменты, у которых активность каталитического центра подвергается изменению под влиянием аллостерических эфффекторов, которые связаны с аллостерическим центром, получили название аллостерических ферментов.*

По отношению к субстрату аллостерические ферменты, содержат и активные центры и эфффекторные центры.

При связывании с эфффекторным центром субстрат не подвергается каталитическому превращению, но влияет на каталитическую эфффективность активного центра.

Известные сведения о химической природе активного центра фермента и аллостерических участках свидетельствуют о том, что в энзиматическом катализе, как и в реакции связывания субстрата, участвует не небольшая часть фермента, как предполагалось ранее, а значительно большая часть молекулы белка-фермента. Когда активный центр не идеально подогнан под свою функцию – этот центр может требовать небольшой деформации для перехода в активную форму. Такая деформация будет функционально необходима.

Но, в природе белок несколько деформируется в процессе своей каталитической работы – т.к. он не алмазный – и это похоже на ту функциональную роль, что деформация бумаги под пером авторучки: чем меньше нажим, тем лучше.

Во многих ферментах проникновение субстрата в активный центр требует небольшого расхождения близких к этому центру боковых групп фермента. Однако, после того как субстрат сел на этот центр, каталитическая функция активного центра не требует движения этих групп. Т.е. подвижность нужна при подготовке к реакции, а жесткость – в момент ее проведения.

Иногда переход от одной функции к другой осуществляется просто переходом субстрата от одного активного центра на другой. Говоря о подвижности белка, надо различать мелкие и более крупные движения.

*Мелкие движения – это тепловые флуктуации.* РентгеноСтруктурныйАнализ (РСА) высокого разрешения способен видеть такие флуктуации на фоне усредненной «статистической структуры». Он видит их как некую размытость положения атомов.

Флуктуация больше у поверхностных групп белка, и в несколько раз ниже у группы ядра белка.

Аминокислотные остатки в петлях колеблются заметно сильнее, чем во вторичных структурах.

Боковые группы колеблются заметно сильнее, чем главная цепь.

Особенно сильно колеблются длинные поверхностные группы, концы которых не зажаты другими группами. Поэтому говорят, что внутренность белка твердая, а его поверхность напоминает жидкость.

Более крупные изменения связаны с деформацией белковой структуры при связывании лигандов.

*Число активных центров.* Обычно число активных центров в молекуле очень невелико, в среднем 1 активный центр приходится на молекулярный вес 30000-80000, т.е. на 250-500 аминокислотных остатков.

Доказательства наличия активного центра в ферментах:



1. Для ряда ферментов было установлено, что воздействие химических реактивов, которые связывают сульфгидрильные группы ( $-SH$ ), вызывает инактивацию ферментов.

2. Для железосодержащих ферментов (каталаза, пероксидаза) было показано, что они инактивируются под влиянием реактивов, связывающих железо.

3. Для магнийсодержащих ферментов было установлено, что удаление магния или же связывание его фтористыми солями приводит к их инактивированию. Все это свидетельствует о том, что в молекулах ферментов имеются какие-то участки, ответственные за их каталитическую активность.

4. О наличии АЦ центров говорит и сопоставление молекулярных весов ферментов и субстратов, превращение которых они катализируют: молекулярный вес фермента во всех случаях в сотни и тысячи раз больше молекулярного веса субстрата. Следовательно, молекула субстрата при ферментативной реакции связывается не со всей молекулой фермента, а с той или иной его частью.

5. Экспериментально установлено, что некоторые ферменты сохраняют свою каталитическую активность после отщепления от них даже значительной части молекулы.

Фосфопируват-гидратаза может быть дегидрирована без потери активности лейцинаминопептидазой или карбоксипептидазой, В этом случае с одного или другого конца ее молекулы отщепляется 150 аминокислотных остатков. Все это свидетельствует о том, что в молекулах ферментов действительно есть активные центры, ответственные за каталитическую активность.

*Какую же роль играют остальные части молекулы фермента?* Активный центр может представить совокупность групп, расположенных на смежных участках изогнутой пептидной цепи, поэтому третичная структура фермента имеет прямое отношение к формированию активного центра.

1. В некоторых случаях, когда субстратом являются крупные молекулы (например, белки), они располагаются по всей молекуле фермента.

2. Иногда ферменты проявляют свою активность лишь вмонтированными в определенные клеточные структуры (так ферменты дыхательной системы связаны с мембранами митохондрий). Это вмонтирование ферментов в структуры клеток идет за счет остальной части молекулы фермента, а не за счет активного центра.

3. Оставшаяся часть молекулы фермента играет большую роль в обеспечении лабильности фермента.

4. Оставшаяся часть молекулы фермента может обеспечивать аллостерический эффект.

Открыт аллостерический эффект был Моно, Жакобом и Шанжэ в Париже в Пастеровском университете, за что они получили Нобелевскую премию.

Таким образом, в настоящее время считают, что вся молекула фермента нужна для функционирования фермента, а не только активный центр. Это видно из той роли, какую играет остальная часть молекулы фермента, хотя несомненно, что главную роль в осуществлении каталитической функции играют активные центры.

*Изоферменты* - это множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по физико-химическим свойствам, в частности: по сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции (активности), электрофоретической подвижности или регуляторным свойствам.

В живой природе имеются ферменты, молекулы которых состоят из двух и более субъединиц, обладающих одинаковой или разной первичной, вторичной или третичной структурой. Субъединицы нередко называют *протомерами*, а объединенную олигомерную молекулу – *мультимером*.

Считают, что процесс олигомеризации придает субъединицам белков повышенную стабильность и устойчивость по отношению к действию денатурирующих агентов, включая нагревание, влияние протеиназ и др. Однако на нынешнем этапе знаний нельзя ответить однозначно на вопрос о существенности четвертичной структуры для каталитической активности ферментов, поскольку пока отсутствуют методы, позволяющие в «мягких» условиях разрушить только лишь четвертичную структуру.

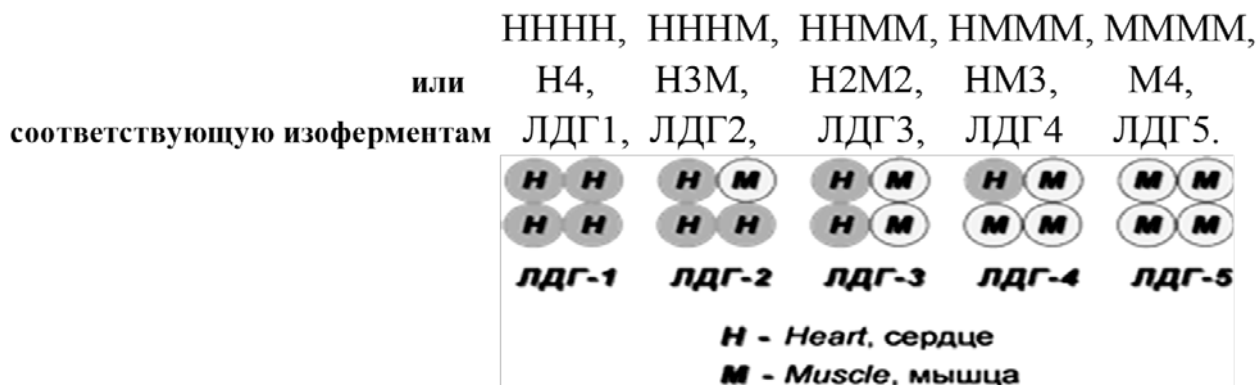
Применяемые обычно методы жесткой обработки (экстремальные значения pH, высокие концентрации гуанидинхлорида или мочевины) приводят к разрушению не только четвертичной структуры, но и вторичной и третичной структур стабильного олигомерного фермента, протомеры которого оказываются денатурированными и, как следствие этого, лишенными биологической активности.

Следует указать на отсутствие ковалентных, главновалентных связей между субъединицами. Связи в основном являются нековалентными, поэтому такие ферменты довольно легко диссоциируют на протомеры. Удивительной особенностью таких ферментов является зависимость активности всего комплекса от способа упаковки между собой отдельных субъединиц.

Если генетически различимые субъединицы могут существовать более чем в одной форме, то соответственно и фермент, образованный из двух или нескольких типов субъединиц, сочетающихся в разных количественных

пропорциях, может существовать в нескольких сходных, но не одинаковых формах. Подобные разновидности фермента получили название изоферментов (изоэнзимов или, реже, изозимов).

В частности, если фермент состоит из 4 субъединиц двух разных типов – Н и М (сердечный и мышечный), то активный фермент может представлять собой одну из следующих комбинаций:



При этом синтез Н- и М-типов осуществляется различными генами и в разных органах экспрессируется по-разному.

В одних случаях субъединицы имеют почти идентичную структуру и каждая содержит каталитически активный участок (например, β-галактозидаза, состоящая из 4 субъединиц).

В других случаях субъединицы оказываются неидентичными. Примером последних служит триптофансинтаза, состоящая из 2 субъединиц, каждая из которых наделена собственной (но не основной) энзиматической активностью.

Однако, только будучи объединенными в макромолекулярную структуру, обе субъединицы проявляют триптофансинтазную активность.

Термин «множественные формы фермента» применим к белкам, катализирующим одну и ту же реакцию и встречающимся в природе в организмах одного вида. Термин «изофермент» применим только к тем множественным формам ферментов, которые появляются вследствие генетически обусловленных различий в первичной структуре белка (но не к формам, образовавшимся в результате модификации одной первичной последовательности).

Одним из наиболее изученных 4 ферментов, множественность форм которого детально изучена методом гель-электрофореза, является ЛДГ, катализирующая обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную. Пять изоферментов ЛДГ образуются из 4 субъединиц примерно одинакового размера, но двух разных типов.

Поскольку Н-протомеры несут более выраженный отрицательный заряд при рН 7,0–9,0, чем М-протомеры, изофермент, состоящий из 4 субъединиц Н-типа (Н<sub>4</sub>), при электрофорезе будет мигрировать с наибольшей скоростью в

электрическом поле к положительному электроду (аноду). С наименьшей скоростью будет продвигаться к аноду изофермент М4, в то время как остальные изо-ферменты будут занимать промежуточные позиции. Следует подчеркнуть, что изоферменты ЛДГ, обладая почти одинаковой ферментативной активностью, различаются некоторыми физико-химическими свойствами: молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, отношением к активаторам и ингибиторам и др., однако для каждой ткани в норме характерно свое соотношение форм (изоферментный спектр) ЛДГ.

Например, в сердечной мышце преобладает Н4, т.е. ЛДГ1, а в скелетных мышцах и печени – М4 (ЛДГ5).

Эти обстоятельства широко используют в клинической практике, поскольку изучение появления изоферментов ЛДГ (и ряда других ферментов) в сыворотке крови может представлять интерес для дифференциальной диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей. По изменению содержания изоферментов в сыворотке крови можно судить как о топографии патологического процесса, так и о степени поражения органа или ткани.

### **Контрольные вопросы**

1. Домены и формирование пространственной структуры белка-фермента: структурные и функциональные характеристики;

2. Домены, их роль в определении ее функциональных свойств, формирование активного центра на границе между доменами

3. Активные центры ферментов, их топография.

4. Каталитический и сорбционный (якорный) подцентры (сайты) активного центра, их функции.

5. Взаимодействие активного центра с субстратом: Теории Фишера («ключ-замок») и Кошланда (индуцированное соответствие). Фермент-субстратные комплексы.

6. Роль методов ингибиторного анализа в установлении закономерности состава и структуры активных центров у ферментов.

7. Примеры строения активных центров ряда ферментов: химотрипсина, карбоксипептидазы А

8. Ингибиторы ферментной активности. Обратимое и необратимое ингибирование. Типы обратимого ингибирования. Примеры.

9. Изоферменты: их строение и роль в клеточном метаболизме. Использование изоферментов в энзимодиагностике.

10. Какие ферменты называют полифункциональными?

11. Бифункциональные ферменты, катализирующие реакции одного метаболического пути.

12. Расскажите о бифункциональных ферментах, катализирующих противоположно направленные реакции.

13. Как образуется активный центр у простых ферментов?

14. Радикалы, каких аминокислотных остатков наиболее часто встречаются в активных центрах ферментов?

15. Какие аминокислоты являются структурообразующими?

16. В чем сходство и отличие активных центров эластазы, трипсина и химотрипсина?

17. Как формируются активные центры сложных ферментов?

18. Какими методами можно изучать топографию активных центров ферментов?

19. В чем заключается метод химической модификации функциональных групп активных центров ферментов?

*Топография активных центров простых и сложных ферментов. (письменная контрольная работа):*

## **Тема 5 - Методические подходы к пониманию механизма действия ферментов. Механизм действия ферментов. Ферментативный катализ**

### План

1. Энергетические изменения при химических реакциях

2. Отличительные свойства катализа, связанные с особенностями строения ферментов

3. Этапы ферментативного катализа

4. Взаимодействие фермента с субстратом:

- Образование фермент-субстратных комплексов.

- Специфичность действия ферментов. Абсолютная и относительная специфичность. Стереоспецифичность.

5. Последовательность событий в ходе ферментативного катализа

6. Роль активного центра в ферментативном катализе.

7. Механизм ферментативного катализа: кислотно-основной катализ органических реакций (специфический **кислотно-основной катализ**, обобщенный кислотно-основной катализ).

8. Ковалентный катализ: механизм ковалентного катализа в активном центре химотрипсина на

9. Причины высокой каталитической активности ферментов:

Структура и функции ферментов, их действия почти ежегодно подробно обсуждаются на многих международных симпозиумах и конгрессах. Важное место отводится рассмотрению:

- структуры всей молекулы фермента и ее активных центров,

- молекулярному механизму действия различных типов ферментов,

- общей теории энзиматического катализа.

Тем не менее до сих пор нет полной ясности по двум кардинальным проблемам энзимологии *чем вызваны*:

- специфичность действия и
- высокая каталитическая эффективность ферментов?

До установления химической природы ферментов гипотезы о механизме их действия опирались на исследования кинетики и модельные опыты химического гомогенного катализа.

Повышение скорости химических реакций под действием ферментов объясняли следующим:

- активированием субстрата в результате образования адсорбционных или молекулярных, обратимо диссоциирующих фермент-субстратных комплексов;
- цепным механизмом реакций с участием радикалов или возбужденных молекул.

После установления химической природы ферментов подтвердилось представление, выдвинутое более 100 лет назад В. Анри, Л. Михаэлисом и М. Ментен, о том, что при энзиматическом катализе фермент **E** соединяется со своим субстратом **S**, образуя нестойкий промежуточный фермент-субстратный комплекс **ES**, который в конце реакции распадается с освобождением фермента и продуктов реакции **P**. Благодаря высокому сродству связывания и образованию **ES**-комплекса резко возрастает число молекул субстрата, вступающих в реакции. Оказалось, что цепные механизмы реакции не играют существенной роли в *биологическом катализе*.

Эти представления легли в основу теории «ключа-замка» Э. Фишера. По теории жесткая структура активного центра оказывается комплементарной молекулярной структуре субстрата, обеспечивая высокую специфичность фермента.

Михаэлис Л. не только постулировал образование промежуточного фермент-субстратного ES-комплекса, но и рассчитал влияние концентрации субстрата на скорость реакции.

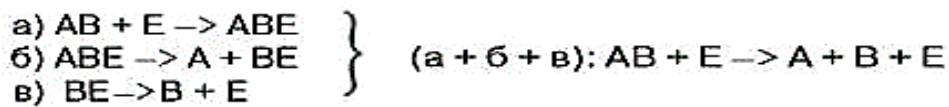
В процессе реакции активации различают несколько стадий:

- 1-присоединение молекулы субстрата к ферменту,
- 2-преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных (переходных) комплексов и
- 3-протекающее в одну или несколько стадий отделение конечных продуктов реакции от фермента.

Схематически это выглядит так: в реакциях **анаболизма**, например  $A + B \rightarrow AB$ , фермент может соединяться как с одним, так и с другим субстратом или обоими субстратами:



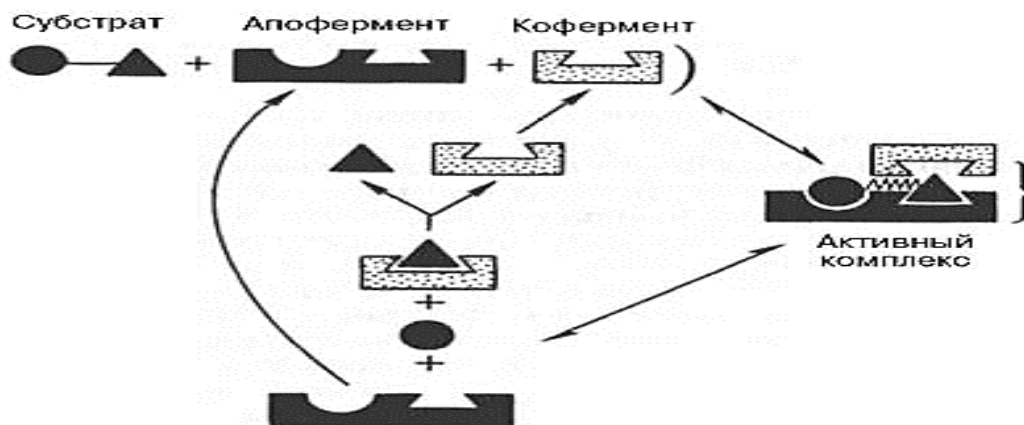
В реакциях **катаболизма**, например  $\text{AB} \rightarrow \text{A} + \text{B}$ :



На рисунке представлена схема образования промежуточного фермент-субстратного комплекса; согласно теории Э. Фишера «ключ-замок»:



Если фермент в активном центре содержит кофермент, то предполагается образование тройного комплекса *по А. Кантарову и Б. Шепартцу*):

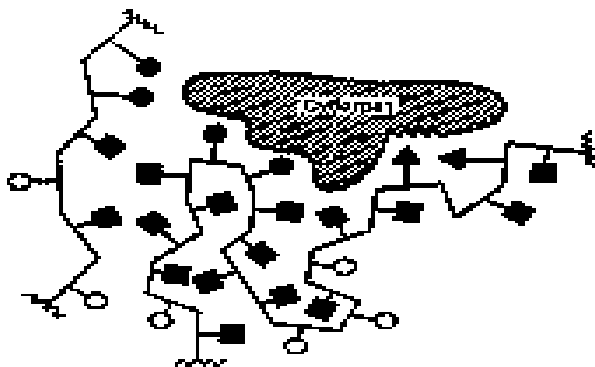


### Функция кофермента

Фермент вступает во взаимодействие с субстратом на очень короткий период, поэтому долгое время не удавалось показать образование такого комплекса. Прямые доказательства существования фермент-субстратного комплекса были получены в лабораториях Д. Кейлина и Б. Чанса.

В настоящее время экспериментальные и математические методы кинетики, термодинамики и статической механики химических реакций позволяют *определить для ферментативных реакций* кинетические и термодинамические показатели, например, константы диссоциации промежуточных фермент-субстратных комплексов, константы скорости и равновесия их образования.

В образовании фермент-субстратных комплексов участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а в ряде случаев также ковалентные, координационные связи:

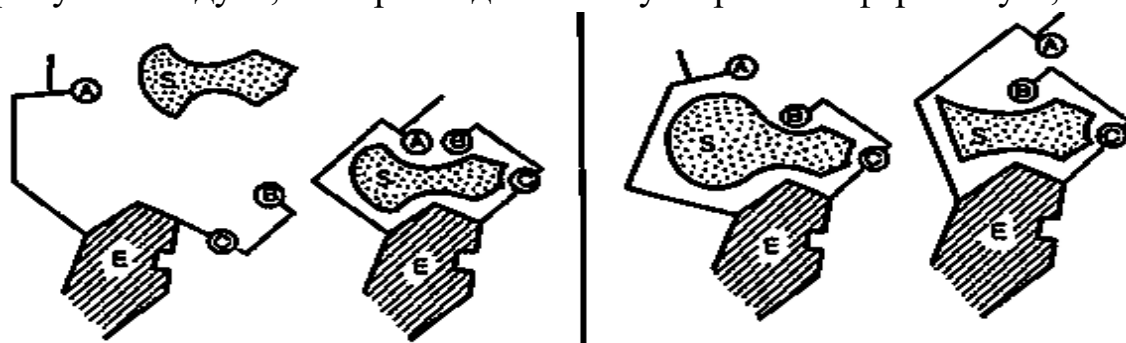


, а рисунке схематично представлено образование не ковалентных связей между ферментом и субстратом.

Как мы знаем для каталитической активности фермента существенное значение имеет пространственная структура, в которой жесткие участки  $\alpha$ -спиралей чередуются с гибкими, эластичными линейными отрезками, которые обеспечивают динамические изменения белковой молекулы фермента. Этим изменениям придается большое значение в теориях ферментативного катализа.

Кошлендом Д. была разработана теория «индуцированного соответствия», допускающая высокую конформационную лабильность молекулы фермента и гибкость и подвижность его активного центра. Эта теория была основана на убедительных экспериментах, которые показали, что субстрат индуцирует конформационные изменения молекулы фермента таким образом, что активный центр принимает необходимую для связывания субстрата пространственную конформацию. Т.е. фермент только в присутствии (точнее), в момент присоединения субстрата будет находиться в активной (напряженной) Т-форме в отличие от неактивной R-формы.

Из рисунка следует, что присоединение субстрата S к ферменту E, вызывая



соответствующие изменения конформации активного центра фермента, в одних случаях приводит к образованию активного комплекса (слева), в других неактивного комплекса (справа), вследствие нарушения пространственного расположения функциональных групп активного центра в промежуточном комплексе.

Получены и новые экспериментальные доказательства о том, что постулированное Д. Кошлендом «индуцированное соответствие» субстрата и фермента создается не обязательно изменениями конформации молекулы



фермента, а геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы субстрата.

*Гипотеза топохимического соответствия.* Сохраняя основные положения гипотезы Кошлендао взаимно индуцированной настройки субстрата и фермента, новая гипотеза фиксирует внимание на том, что специфичность действия ферментов объясняется в первую очередь узнаванием части субстрата, которая *не изменяется* при катализе. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают многочисленные точечные гидрофобные взаимодействия и водородные связи.



Таким образом, в каталитическом процессе существенное значение имеют:

- точное соответствие между ферментом и субстратом,
- термодинамические и каталитические преимущества подобного соответствия
- электростатического соответствия.

*Электростатическое соответствие* обусловлено спариванием противоположно заряженных групп субстрата и активного центра фермента.

*Точное соответствие* обеспечивает образование эффективного комплекса между субстратом и ферментом.

Ферменты, с термодинамической точки зрения, ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации.

Энергией активации ( $E_a$ ) называется энергия, необходимая для перевода всех молекул **1 моля** вещества в активированное состояние при данной температуре. Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.

На рисунке показано влияние фермента на энергию активацию реакции (где  $E_S$  - энергия субстратов,  $E_P$  - энергия продуктов реакции,  $E_a$  - энергия активации). Видно, что реакция с ферментом имеет более низкую энергию активации ( $E_a$ ).



Следует отметить, что как катализируемая ферментом, так и не катализируемая им реакция имеет одинаковую *величину стандартного изменения свободной энергии ( $\Delta G$ )*:



где S - исходный субстрат; P - продукт;  $\Delta E_{нф}$  - энергия активации не ферментативной реакции;  $\Delta E_{ф}$  - энергия активации ферментативной реакции;  $\Delta G$  - стандартное изменение свободной энергии.

Действуя на скорость реакции, ферменты:

- не изменяют равновесия между прямой и обратной реакциями,
- не влияют на величину свободной энергии реакции;
- они ускоряют наступление равновесия химической реакции.

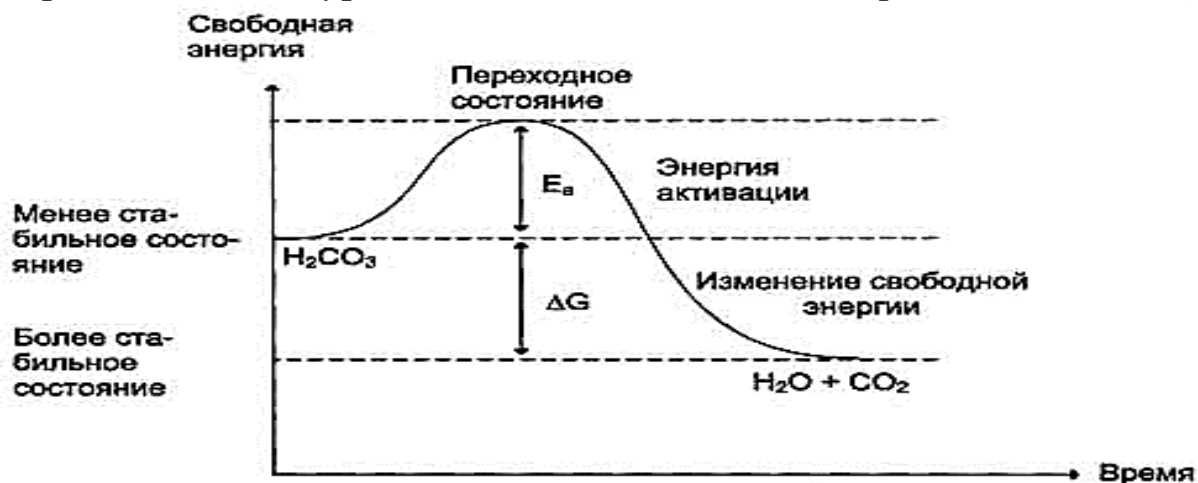
Механизм действия ферментов может быть рассмотрен с двух позиций: с точки зрения изменения энергетики химических реакций и с точки зрения событий в активном центре.

*Механизм действия ферментов.* Итак, любые химические реакции протекают, подчиняясь двум основным законам термодинамики: закону сохранения энергии и закону энтропии. Согласно этим законам, общая энергия химической системы и её окружения остаётся постоянной, при этом химическая система стремится к *снижению упорядоченности* (т.е. *увеличению энтропии*).

Для понимания *энергетики химической реакции* недостаточно знать энергетический баланс входящих и выходящих из реакции веществ, *необходимо учитывать изменения энергии в процессе данной химической реакции и роль ферментов в динамике этого процесса.*

Например- разложения угольной кислоты:  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ .

Угольная кислота слабая; реакция её разложения идет и при обычных условиях, если молекулы угольной кислоты имеют энергию, превышающую определённый уровень, называемый *энергией активации*  $E_a$



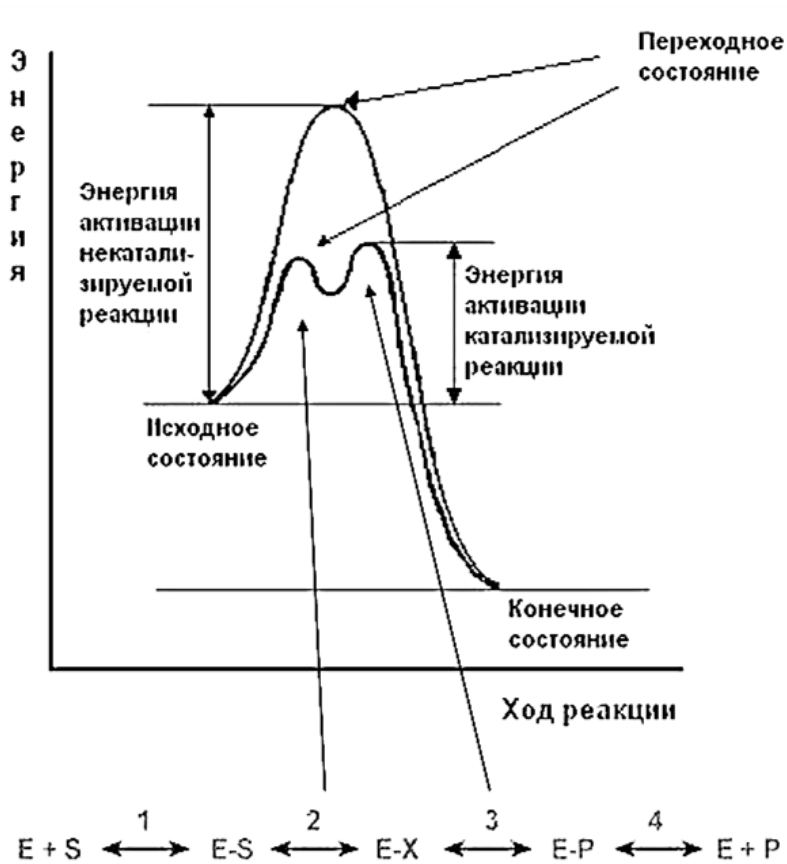
При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей и образование новых соединений. В таком случае говорят, что молекулы, обладающие  $E_a$ , находятся в переходном состоянии.

Разницу энергий между исходным реагентом  $\text{H}_2\text{CO}_3$  и конечными соединениями  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  называют изменением *свободной энергии реакции*  $\Delta G$ . Выделившаяся энергия в результате этой реакции рассеивается в виде тепла в окружающую среду.

Молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  - *более стабильные вещества*, чем  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , т.е. *обладают меньшей энергией* и при обычных условиях практически не реагируют.

*Чем больше молекул обладает энергией, превышающей уровень  $E_a$ , тем выше скорость химической реакции.* Повысить скорость химической реакции можно нагреванием. При этом увеличивается энергия реагирующих молекул.

Однако для живых организмов высокие температуры губительны, поэтому в клетке для ускорения химических реакций используются ферменты. Ферменты обеспечивают высокую скорость реакций при оптимальных условиях, существующих в клетке, путём понижения уровня  $E_a$ .



**Сущность действия ферментов заключается:**

- в активации молекул реагирующих веществ,
- в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.

**В ферментативной реакции можно выделить следующие этапы:**

1. Присоединение субстрата (S) к ферменту (E) с образованием фермент-субстратного комплекса (E-S).
2. Преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько переходных комплексов (E-X) за одну или несколько стадий.
3. Превращение переходного комплекса в комплекс фермент-продукт (E-P).
4. Отделение конечных продуктов от фермента.

Таким образом, ферменты снижают высоту энергетического барьера, в результате возрастает количество реакционно - способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небелковых катализаторов:

Сходство:

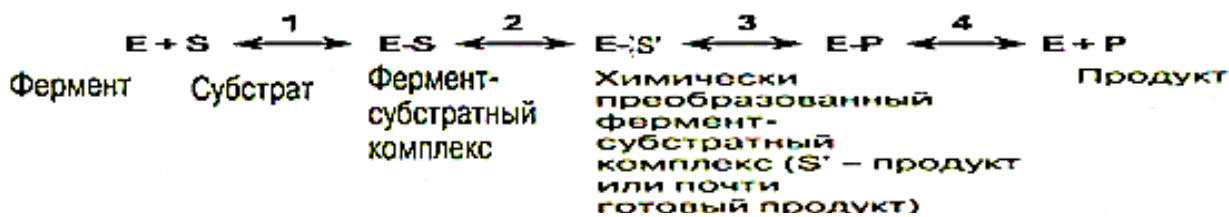
- ферменты катализируют энергетически возможные реакции;
- энергия химической системы остаётся постоянной;
- в ходе катализа направление реакции не изменяется;
- ферменты не расходуются в процессе реакции.

Отличия заключаются в том, что:

- скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами;
- ферменты обладают высокой специфичностью;
- ферментативная реакция проходит *in vivo* т.е. в клетке:
- при температуре 37 °С,
- постоянном атмосферном давлении и
- физиологическом значении pH;
- скорость ферментативной реакции может регулироваться.

## Последовательность событий в ходе ферментативного катализа.

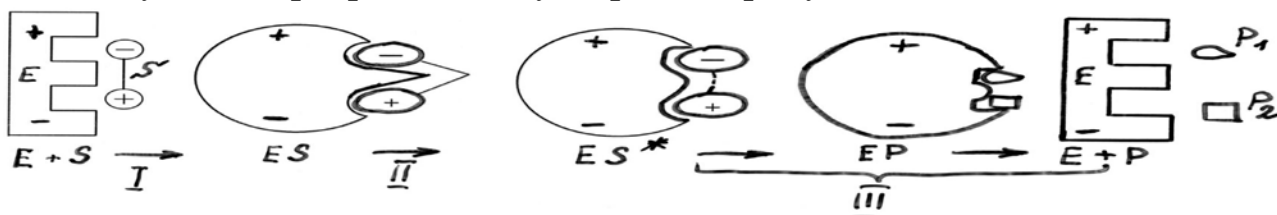
Процесс ферментативного катализа условно можно разделить на 4 этапа:



Первый, второй и четвёртый этапы катализа непродолжительны и зависят от концентрации субстрата (первый этап) и констант связывания лигандов в активном центре фермента (для первого и третьего этапов). Изменения энергетики химической реакции на этих стадиях незначительны.

Третий этап наиболее медленный; длительность его зависит от энергии активации химической реакции. На этой стадии происходят разрыв связей в молекуле субстрата, образование новых связей и формирование молекулы продукта (P).

*Роль активного центра в ферментативном катализе.* Активный центр на всех этапах ферментативного катализа - это комплексная молекулярная "машина", использующая разнообразные химические механизмы, способствующие превращению субстрата в продукт.



В активном центре фермента субстраты располагаются таким образом, чтобы участвующие в реакции функциональные группы субстратов находились в непосредственной близости друг к другу.

Это свойство активного центра называют *эффектом сближения и ориентации реагентов*. Такое упорядоченное расположение субстратов вызывает уменьшение энтропии и, как следствие, снижение энергии активации ( $E_a$ ), что определяет каталитическую эффективность ферментов.

В тоже время активный центр фермента способствует дестабилизации межатомных связей в молекуле субстрата, что облегчает протекание химической реакции и образование продуктов на 3 этапе. Это свойство активного центра называют *эффектом деформации субстрата*.

Механизмы ферментативного катализа определяются ролью функциональных групп активного центра фермента в химической реакции превращения субстрата в продукт.

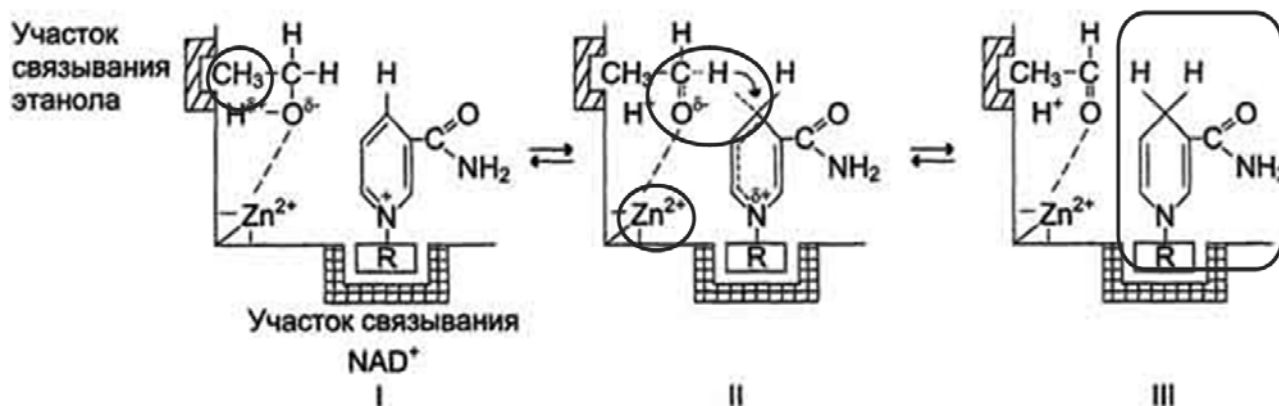
Выделяют два основных механизма ферментативного катализа: кислотно-основной катализ и ковалентный катализ.

1. *Кислотно-основной катализ.* Концепция кислотно-основного катализа объясняет ферментативную активность участием в химической реакции *кислотных групп (доноры протонов)* и/или *основных групп (акцепторы протонов)*. Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, имеют функциональные группы, проявляющие свойства как кислот, так и оснований. К аминокислотам, участвующим в кислотно-основном катализе, в первую очередь относят Цис, Тир, Сер, Лиз, Глу, Асп и Гис. Радикалы этих аминокислот:

- в протонированной форме - кислоты т.е. доноры протона,
- в депротонированной - основания т.е. акцепторы протона.

Амино-кислотный остаток	Кислота (донор протона)	Основание (акцептор протона)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{H}{\underset{H}{N}}H$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$R-C=CH$ $HN \quad NH$ $  \quad  $ $H \quad H$	$R-C=CH$ $HN \quad N:$ $  \quad  $ $H \quad H$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-\text{C}_6\text{H}_4-OH$	$R-\text{C}_6\text{H}_4-O^-$

Благодаря этому свойству ферменты становятся уникальными биологическими катализаторами, в отличие от небиологических катализаторов, способных проявлять либо кислотные, либо основные свойства. Примером кислотно-основного катализа, в котором кофакторами являются ионы  $Zn^{2+}$ , а коферментом молекула  $NAD^+$ , можно привести фермент алкогольдегидрогеназу печени, катализирующую реакцию окисления спирта:  $C_2H_5OH + NAD^+ \rightarrow CH_3-COH + NADH + H^+$ .



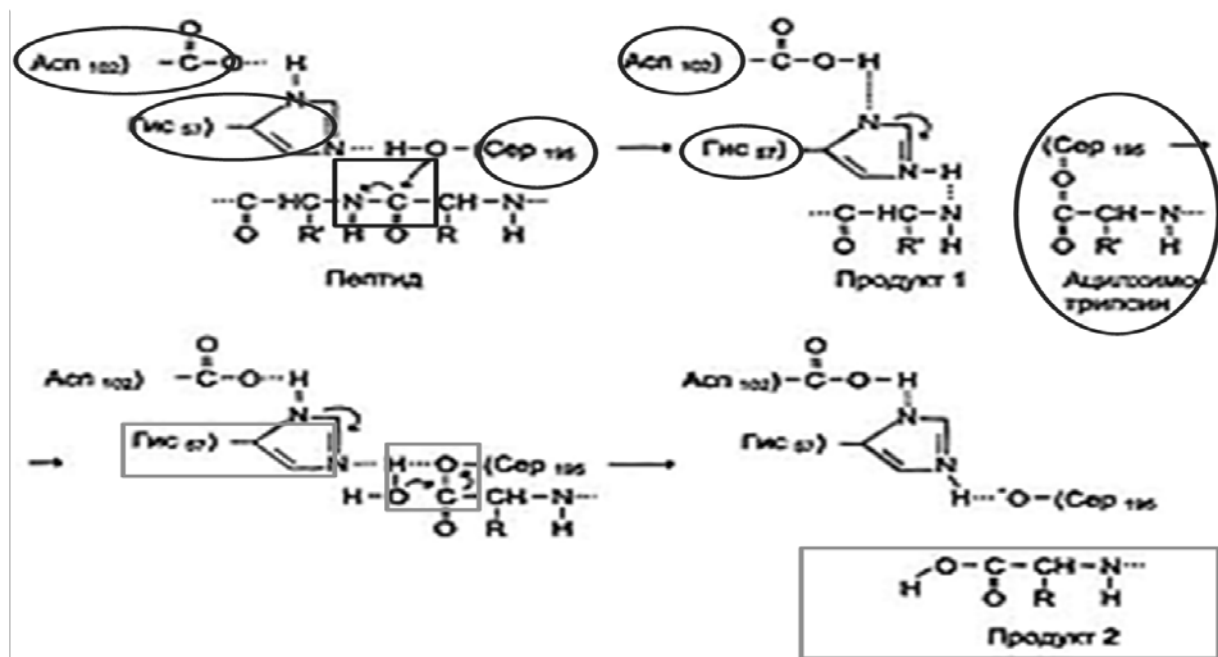
На рисунке представлен механизм кислотно-основного катализа на примере алкогольдегидрогеназы печени. Под цифрой I - молекула этилового спирта имеет центр связывания, обеспечивающий гидрофобное

взаимодействие активного центра и метильной группы спирта; II - положительно заряженный атом цинка способствует отщеплению протона от спиртовой группы этанола с образованием отрицательно заряженного атома кислорода. Отрицательный заряд перераспределяется между атомом кислорода и соседним атомом водорода, который затем в виде гидритиона переносится на четвертый углеродный атом никотинамида кофермента NAD<sup>+</sup> и III - в результате формируется восстановленная форма NADH и уксусный альдегид.

**Ковалентный катализ.** Ковалентный катализ основан на атаке нуклеофильных (отрицательно заряженных) или электрофильных (положительно заряженных) групп активного центра фермента молекулами субстрата. В результате формируются ковалентные связи между субстратом и коферментом или субстратом и функциональной группой аминокислотного остатка активного центра фермента.

Действие сериновых протеаз, таких как трипсин, химотрипсин и тромбин, - пример механизма ковалентного катализа, когда ковалентная связь образуется между субстратом и аминокислотным остатком серина активного центра фермента. Термин "сериновые протеазы" связан с тем, что *аминокислотный остаток серина* входит в состав активного центра всех этих ферментов и участвует непосредственно в катализе.

Пример. Механизм ковалентного катализа на примере химотрипсина, осуществляющего гидролиз пептидных связей при переваривании белков в двенадцатиперстной кишке.



Как следует из рисунка радикалы Asp<sub>102</sub>, His<sub>57</sub> и Ser<sub>195</sub> участвуют непосредственно в акте катализа. Вследствие нуклеофильной атаки пептидной

связи субстрата происходит разрыв этой связи с образованием ковалентно-модифицированного серина - ацил-химотрипсина. Другой пептидный фрагмент высвобождается в результате разрыва водородной связи между пептидным фрагментом и Гис<sub>57</sub> активного центра химотрипсина. Заключительный этап гидролиза пептидной связи белков - деацилирование химотрипсина в присутствии молекулы воды с высвобождением второго фрагмента гидролизуемого белка и исходной формы фермента.

Субстратами химотрипсина служат пептиды, содержащие аминокислоты с ароматическими и циклическими гидрофобными радикалами (Фен, Тир, Три), что указывает на участие гидрофобных сил в формировании фермент-субстратного комплекса.

### **Основы кинетики ферментативных реакций**

*Кинетика ферментативных реакций* - раздел энзимологии, изучает зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от:

- химической природы реагирующих веществ,
- факторов окружающей среды.

Для измерения каталитической активности ферментов используют показатели: *скорость реакции* или *активность фермента*.

Скорость ферментативной реакции определяется изменением количества молекул субстрата или продукта за единицу времени. Скорость ферментативной реакции – это мера каталитической активности фермента, её обозначают как активность фермента.

*Мерой скорости ферментативных реакций* служит *количество субстрата, подвергшегося превращению в единицу времени*, или количество образовавшегося продукта.

Математически скорость ферментативной реакции выражается в изменении концентрации субстрата (уменьшение) или продукта (увеличение) за единицу времени:  $V = \Delta[S]/\Delta t = \Delta[P]/\Delta t$ .

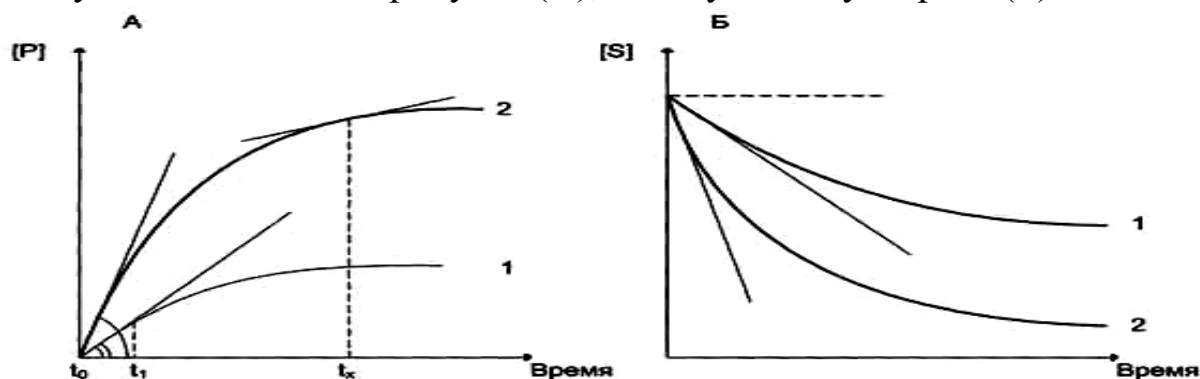
Изменение скорости проводят на начальной стадии реакции, когда продукт ещё практически отсутствует, и обратная реакция не идёт. Кроме того, на начальной стадии реакции концентрация субстрата соответствует его исходному количеству.

На начальном этапе [0 - t<sub>0</sub>] скорость реакции прямо пропорциональна времени и имеет линейную зависимость.

Графически изменение скорости ферментативной реакции определяется тангенсом угла наклона касательной к кривой профиля реакции. Чем больше угол наклона, тем больше изменение скорости реакции.



В реакциях, катализируемых ферментами 1 и 2, начальная скорость реакции, катализируемой 1-ферментом, ниже, чем скорость реакции, катализируемой 2-ферментом, так как тангенс угла наклона касательной к кривой профиля реакции, проведённой из "О"-точки у второго фермента выше, Как в случае накопления продукта (А), так и убыли субстрата (Б).



Скорость в любой момент времени  $t$  определяется тангенсом угла наклона касательной к профилю реакции в момент времени  $t$ .

Период времени ферментативной реакции  $[t_0 - t_1]$  характеризуется линейным накоплением продукта (или убылью субстрата) в зависимости от длительности реакции. Период ферментативной реакции  $[t_1 - t_x]$  характеризуется нелинейным накоплением продукта (или убылью субстрата) в зависимости от времени реакции. С течением времени изменение скорости ферментативной реакции в экспериментальных условиях уменьшается, об этом свидетельствует уменьшение угла наклона касательной в момент времени  $t$ .

Снижение скорости ферментативной реакции может происходить за счёт:

- уменьшения концентрации субстрата,
- увеличения концентрации продукта, который может оказывать ингибирующее действие,
- могут происходить изменения рН раствора,
- инактивация фермента и т.д.

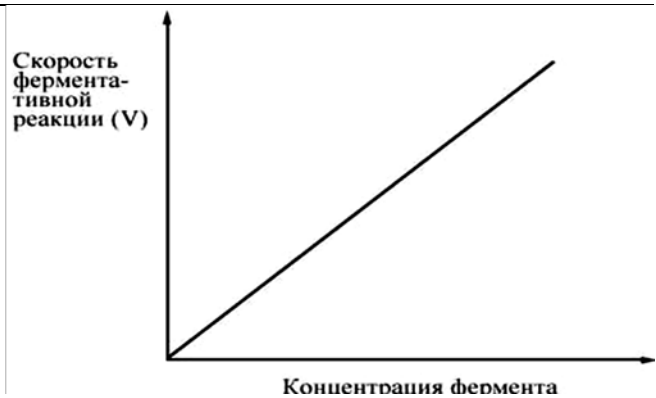
На этапе  $[t_1 - t_x]$  скорость реакции изменяется нелинейно в зависимости от времени. Поэтому для определения скорости ферментативной реакции исследуют изменение скорости на начальном этапе  $[t_0 - t_1]$ , где наблюдают линейное изменение концентрации продукта (или субстрата).

Скорость ферментативной реакции зависит от:

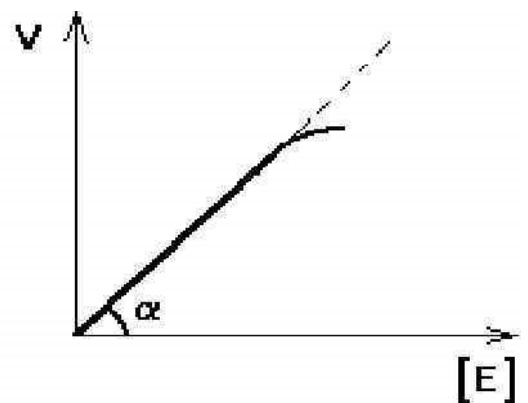
- количества и активности ферментов,
- концентрации субстрата,
- температуры среды,
- рН раствора,
- присутствие регуляторных молекул (активаторов и ингибиторов).

## Зависимость скорости ферментативной реакции от количества ферментов представлена на графиках:

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата и при постоянстве других факторов скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии



Отклонение от линейности графика при очень высокой концентрации фермента возникает при нехватки субстрата, поэтому снижается скорость поступления субстрата на активный центр. Определять скорость ферментативной реакции надо только в том диапазоне концентраций ферментов, в котором график линеен



Однако количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому на практике пользуются условными величинами, характеризующими *активность фермента*:

Одна *международная единица активности (МЕ)* соответствует такому количеству фермента, которое *катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин* при оптимальных условиях проведения ферментативной

реакции: 
$$1 \text{ ME} = \frac{1 \text{ мкмоль превращённого субстрата}}{1 \text{ мин}}$$

Оптимальные условия индивидуальны для каждого фермента и зависят от температуры среды, pH раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

Количество единиц активности nME определяют по формуле:

$$n \text{ ME} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

В медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов часто используют *международные единицы активности - МЕ*.

Для оценки *количества молекул фермента* среди других белков данной ткани определяют *удельную активность (уд. ак.)* фермента:

$$\text{Уд. акт.} = \frac{\text{Кол-во превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время(мин)} \times \text{Кол-во белка(мг)}}$$

По удельной активности судят об очистке фермента: чем меньше посторонних

белков, тем выше удельная активность

*Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата [S].*

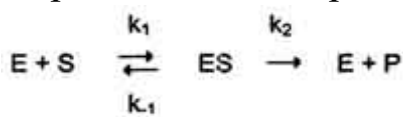
Если концентрацию ферментов оставить постоянной, изменяя только количество субстрата, то график скорости ферментативной реакции описывают гиперболой.

При увеличении количества субстрата начальная скорость возрастает. Когда фермент становится полностью насыщенным субстратом, т.е. происходит максимально возможное при данной концентрации фермента формирование фермент-субстратного комплекса, наблюдают наибольшую снижение скорости образования продукта. Такое состояние соответствует максимальной скорости реакции  $V_{max}$ .



Любое избыточное количество субстрата может соединиться с ферментом после того, как образуется продукт реакции и освободится активный центр фермента. Таким образом, *концентрация фермента - лимитирующий фактор в образовании продукта*. Это наблюдение легло в основу ферментативной кинетики, разработанной учёными Л. Михаэлисом и М. Ментен в 1913 г.

Ферментативный процесс можно выразить следующим уравнением:



, где  $k_1$ - константа скорости образования фермент-субстратного комплекса (ES);  $k_{-1}$ - константа скорости обратной реакции, т.е. распада комплекса (ES);  $k_2$ - константа скорости образования продукта реакции (P). Соотношение констант скоростей:  $(k_{-1} + k_2)/k_1$  - называют константой Михаэлиса и обозначают  $K_m$ . Скорость реакции пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса ES, а скорость образования ES зависит от концентрации субстрата и концентрации свободного фермента.

На концентрацию промежуточного ES влияет скорость формирования и распада ES. Наибольшая скорость реакции наблюдается в том случае, когда все молекулы фермента находятся в комплексе с субстратом, т.е.  $[E] = [ES]$ . Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается уравнением:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}, \text{ где}$$

$V$  — скорость реакции при концентрации субстрата [S]

$V_{max}$  — максимальная скорость

$K_m$  — константа Михаэлиса

. Это уравнение получило название уравнения Михаэлиса-Ментен.

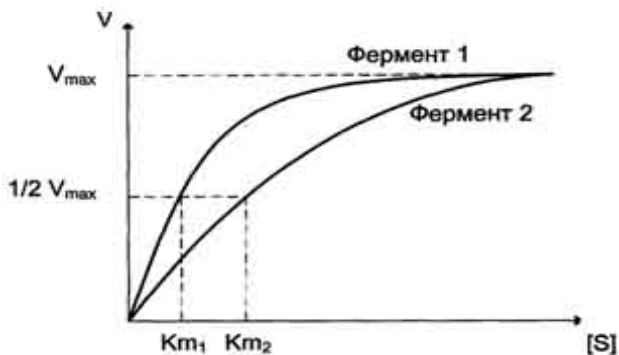
Когда половина молекул фермента находится в комплексе с молекулами субстрата, скорость реакции равна  $\frac{1}{2} V_{\max}$ . В случае, когда скорость реакции равна половине максимальной,  $K_m = [S]$ .

Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости.

Величина  $K_m$  характеризует сродство фермента к субстрату: чем ниже значение  $K_m$  фермента, тем выше его сродство к субстрату.

Уравнение Михаэлиса-Ментен - основное уравнение ферментативной кинетики, описывающее зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Определение  $K_m$  и  $V_{\max}$  имеет важное практическое значение, так как позволяет количественно описать большинство ферментативных реакций, включая реакции с участием двух и более субстратов.

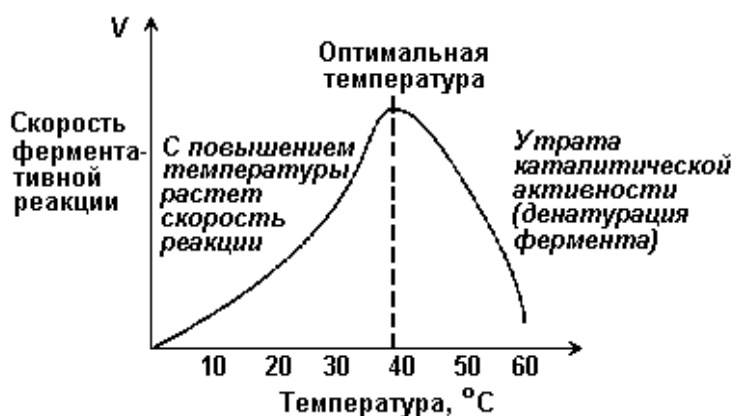


На рисунке представлена зависимость скорости двух ферментативных реакций (1 и 2) от концентрации субстрата. Константа Михаэлиса первого фермента меньше константы Михаэлиса второго фермента ( $K_{m1} < K_{m2}$ ).

Следовательно, сродство первого фермента к субстрату выше, чем у второго фермента, и начальная скорость реакции, катализируемой первым ферментом, выше в сравнении со вторым ферментом.

**Зависимость скорости реакции от t – температуры**, при которой протекает реакция, имеет сложный характер. Значение температуры, при котором скорость реакции максимальна, представляет собой температурный оптимум фермента. Температурный оптимум большинства ферментов организма человека приблизительно равен  $40^{\circ}\text{C}$ . Для большинства ферментов оптимальная температура равна или выше той температуры, при которой живут клетки.

При более низких температурах ( $0^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$ ) скорость реакции увеличивается с ростом температуры. При повышении температуры на  $10^{\circ}\text{C}$  скорость ферментативной реакции удваивается (температурный коэффициент  $Q_{10}$  равен 2)

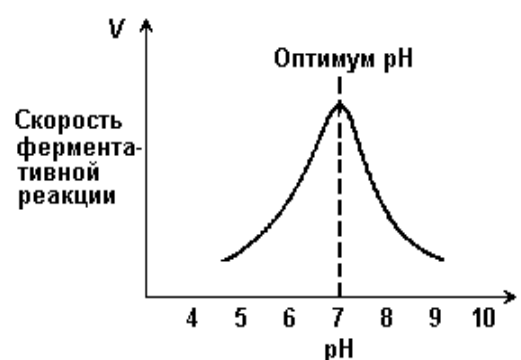


Повышение скорости реакции объясняется увеличением кинетической энергии молекул. При дальнейшем повышении температуры происходит разрыв связей, поддерживающих вторичную и третичную структуру фермента, то есть тепловая денатурация. Это сопровождается постепенной потерей каталитической активности.

*Зависимость скорости реакции от pH среды.* При постоянной температуре фермент работает наиболее эффективно в узком интервале pH. Значение pH, при котором скорость реакции максимальна, представляет собой оптимум pH фермента.

У большинства ферментов организма человека оптимум pH находится в пределах pH 6 – 8, но есть ферменты, которые активны при значениях pH, лежащих за пределами этого интервала.

Изменение pH как в кислую, так и в щелочную сторону от оптимума приводит к изменению степени ионизации кислых и основных групп аминокислот, входящих в состав фермента (например, COOH-группы аспартата и глутамата, NH<sub>2</sub>-группы лизина и т.д.



Ионы водорода (H<sup>+</sup>) оказывают влияние на ферментативную активность различными путями. Они изменяют степень ионизации:

- субстрата,
- продукта и

-самого фермента. Особое значение имеет ионизация функциональных групп активного центра фермента и фермент-субстратного комплекса, определяющих скорость реакции. При оптимальном для каждого фермента значении pH конформация активного центра фермента комплементарна субстрату. При изменении pH относительно оптимальных значений изменяется конформация фермента, активного центра, нарушается комплементарность и снижается скорость реакции.

Оптимум значения pH у ферментов различный. Ферменты, работающие в кислых условиях среды (например, пепсин в желудке или лизосомальные ферменты), эволюционно приобретают конформацию, обеспечивающую работу фермента при кислых значениях pH:

Фермент	Пепсин	Пируват-карбоксилаза	Ката-лаза	Уреаза	ДНКаза	Трипсин	Аргиназ
Оптимум pH	1,5-2,0	4,0	6,8-7,0	6,8-7,2	7,5	6,5-7,5	9,5-9,9

Однако большая часть ферментов организма человека имеет оптимум pH, близкий к нейтральному, совпадающий с физиологическим значением pH.

Следует отметить, что *свойственный ферменту оптимум pH не всегда совпадает с pH его непосредственного внутриклеточного окружения*. Это говорит о том, что среда, в которой находится фермент, в какой-то мере регулирует его активность.

### Абзимы

На заре биохимии считали, что структура активного центра фермента точно соответствует структуре субстрата — подходит к нему, как ключ к замку. Однако В 1940-х годах будущий нобелевский лауреат Л. Полинг показал, что активные центры комплементарны не субстратам и продуктам, а некоторым промежуточным структурам — так называемым *переходным состояниям* вещества, которые образуются в ходе реакции.

Из своей гипотезы **Полинг** сделал интересный вывод: *если бы иммунная система умела вырабатывать антитела против переходных состояний, то такие антитела обладали бы свойствами ферментов*.

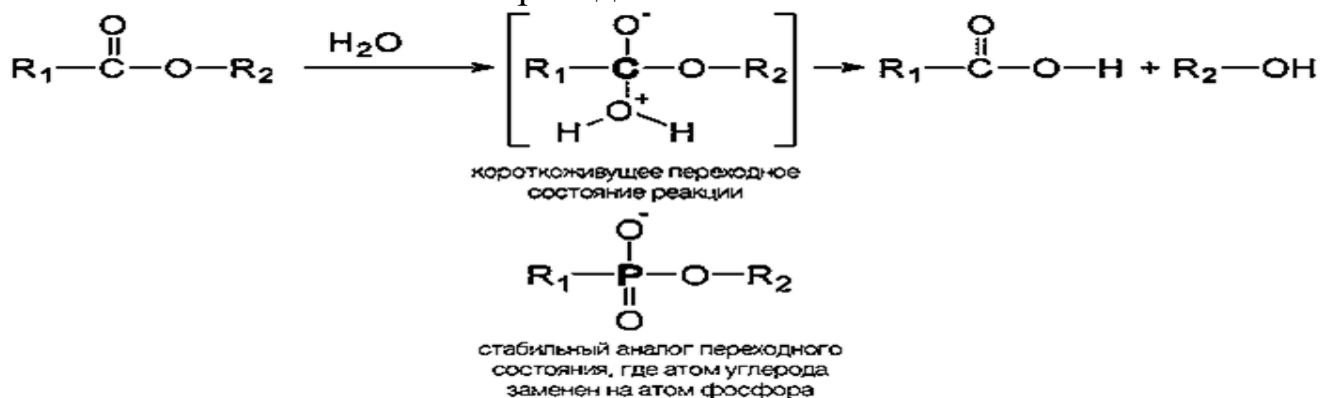
Иммунная система производит невообразимое количество самых разных антител, и среди них всегда найдется такое, которое будет соответствовать даже самому экзотическому антигену.

Однако (как выяснилось) схему Полинга в чистом виде невозможно реализовать технически — переходные состояния существуют очень короткое время.

Поэтому позже В. Дженкс предложил использовать стабильные молекулы с похожей структурой, чтобы получить антитела на них.

Эта идея получила первое экспериментальное подтверждение в 1986 г. Такие антитела, обладающие каталитической активностью, назвали *абзимами* (от английских слов *antibody enzyme* — антитело-фермент). Известные на сегодня абзимы катализируют более ста различных реакций, причем даже такие, для которых природных ферментов не существует. На рисунке показана схема реакции гидролиза сложного эфира карбоновой кислоты антителами –

по переходным состояниям:



Полинг Л. доказал, что активные центры ферментов комплементарны (т.е. соответствуют промежуточным соединениям, образующимся в ходе реакции, – так называемым переходным состояниям).

Т.к. переходные состояния живут очень короткое время, первые подобные каталитически активные антитела были получены с использованием искусственно созданных стабильных аналогов переходных состояний.

Можно считать, что возникла целая новая отрасль **биохимии** — *абзимология*. В числе ее последних достижений — создание новых лекарственных средств, например, абзимов, расщепляющих наркотики в крови.

Открываются перспективы получения новых белковых катализаторов с самыми разнообразными свойствами для научных исследований, и, что немаловажно, для биотехнологии и медицины.

Но этими замечательными достижениями история абзимологии не исчерпывается: успешные эксперименты по дизайну разнообразных искусственных абзимов стимулировали новый виток изучения антител в организме, в результате чего были открыты природные абзимы.

*Природные абзимы.* Первые природные абзимы, обнаруженные американской группой С. Паула в крови больных бронхиальной астмой, не только эффективно связывали вазоактивный интестинальный пептид, но и катализировали его гидролиз (разложение водой).

Вскоре после этого московские ученые под руководством А. Г. Габитова выделили из крови больных системной красной волчанкой антитела, гидролизующие ДНК.

Затем в лаборатории ферментов репарации НИБХ СО РАН автором этой статьи был открыт целый ряд природных антител, которые могут расщеплять ДНК, РНК, АТФ, белки и полисахариды. Такие абзимы есть в крови больных системной красной волчанкой, аутоиммунным тиреоидитом, полиартритом, рассеянным склерозом, вирусным гепатитом и СПИДом, но отсутствуют в крови здоровых доноров, а также больных другими, не аутоиммунными заболеваниями.

*Схема образования антител в организме согласно антиидиотипической сети Эрне.* Когда в организм попадает антиген, иммунная система сначала вырабатывает против него *первичные (идиотипические)* антитела – иммунные белки, которые связывают и нейтрализуют антиген.

Первичные антитела, в свою очередь, могут становиться антигенами – против них иммунная система начинает вырабатывать *вторичные (антиидиотипические)* антитела и т. д.

Теоретически подобная цепь антиген-антитело может быть довольно длинной, но экспериментально установлено присутствие в крови животных только антител четвертого порядка (АТ4). Если первичным антигеном был фермент, то АТ к нему будут «слепком» с его активного центра.

Вторичные и последующие антитела будут представлять собой «слепок со слепка» и, т. о., также содержать некий «внутренний образ» активного центра фермента. Поэтому все они, как и исходный фермент, могут проявлять каталитическую активность.

В здоровом организме благодаря такому механизму поддерживается необходимый баланс антител.

У больных аутоиммунными заболеваниями его действие нарушается, в крови возрастает содержание первичных и, главное, вторичных антител, обладающих каталитической активностью.

#### *Черты структурно-функционального сходства антител и ферментов.*

Итак, ферменты и антитела имеют определенные черты сходства, обусловленные в первую очередь тем, что они являются белками, обладающими характерной пространственной структурой и способностью связывать специфические молекулы - лиганды.

Специфическое узнавание антителом своего антигена представляет собой выбор из громадного разнообразия уже существующих структур той из них, которая способна наиболее прочно связать антиген.

Т. е., в отличие от активного центра фермента антигенсвязывающий центр антитела "предсуществует", а не формируется в результате взаимодействия со специфическим лигандом.

Другими словами, активный центр антитела структурно соответствует основному состоянию лиганда и в какой-то мере может быть уподоблен «замку» с «ключом» - антигеном.

Таким образом, для активных центров антител и ферментов характерна *определенная конформационная лабильность* и специфическое связывание антитела со своим лигандом в целом напоминает аналогичное взаимодействие фермента со своим субстратом.

В частности, выделяют следующие типы антигенсвязывающих центров антител, напоминающие по структуре лиганд связывающие центры ферментов:

а) полости (cavity), характерные для центров, связывающих низкомолекулярные лиганды (гаптены);

б) выемки или бороздки (groove), образующиеся в случае пептид-, ДНК-, полисахаридсвязывающих центров;

в) плоские (planar) области, формирующиеся активными центрами антител, взаимодействующими с белками.



Важной чертой, объединяющей антитела и ферменты, является доступность антигенов и субстратов для молекул воды. Показано, что молекулы воды в ряде случаев выступают в качестве необходимого элемента, формирующего структурную комплементарность антитела и антигена. Вместе с тем существуют определенные отличия, связанные в первую очередь с функциями, выполняемыми данными белками в организме.

-Основное предназначение антитела - как можно прочнее связать антиген, чтобы удалить его; а

-Функциональная роль фермента заключается в связывании субстрата, чтобы обеспечить его дальнейшее превращение в продукт.

Поэтому очень прочное связывание субстрата невыгодно для эффективного катализа, так как движущей силой ферментативного катализа является увеличение энергии связывания лиганда по мере перехода субстрата к переходному состоянию. Лайнус Полинг в 1948 г. постулировал, что активный центр фермента комплементарен не исходному субстрату (как предполагает концепция «ключ - замок»), а переходному состоянию.

Вильям Дженкис в 1969 г. предположил, что антитело, комплементарное структуре переходного состояния реакции, должно катализировать эту реакцию, ускоряя достижение переходного состояния. Работы по получению каталитических антител, одновременно начатые в 1989 году в нескольких лабораториях привели к возникновению научного направления, связанного с созданием биологических катализаторов с заранее заданными свойствами. По аналогии с ферментами каталитические антитела получили название абзимов.

*Как появляются абзимы у аутоиммунных больных?* При этих заболеваниях, как известно, активно идет гибель клеток, из-за чего в крови повышаются концентрации всех клеточных компонентов (белков, ДНК и т. д.), и их комплексов.

Поэтому абзимы могут нарабатываться двумя путями:

- они могут возникать как антитела непосредственно против продуктов клеточного распада — собственных антигенов, структура которых, когда они находятся в комплексе с другими компонентами крови, имитирует структуру переходного состояния реакции.

- согласно теории нобелевского лауреата Н. Эрне, против какого-либо антигена в организме сначала образуются первичные (*идиотипические*) антитела, которые, будучи сами белками, тоже могут играть роль антигенов, против которых могут образоваться вторичные (*антиидиотипические*) антитела и т. д.

Как и исходный фермент, все антитела более высокого порядка могут проявлять каталитическую активность.

По данным новосибирских ученых, в крови больных аутоиммунными заболеваниями обычно находится «коктейль» из абзимов с разными свойствами, образовавшихся разными путями.

*Истории болезней.* Появление абзимов часто является самым ранним признаком развития аутоиммунных процессов, поэтому тестирование их активности является исключительно перспективным подходом как для ранней диагностики, так и для предсказания обострения хронически текущей болезни и оценки эффективности лечения теми или иными препаратами.

Рассеянный склероз, например, обычно удается распознать только на поздних стадиях, когда в мозге больных возникают характерные бляшки, обнаруживаемые с помощью томографии.

Наиболее обоснованная теория возникновения этой болезни отводит главную роль аутоиммунным воспалительным процессам, ведущим к нарушению передачи нервных импульсов. У больных рассеянным склерозом обнаружены антитела, которые разрушают основной белок миелина. С помощью анализа на активность этих абзимов можно обнаружить заболевание на ранней стадии.

#### *Аутоиммунный тиреоидит*

Аутоиммунный тиреоидит: Динамика концентрации гормонов щитовидной железы в крови у одного из больных, в течение полугода принимавшего лекарство плаквинил, снижающее ДНК-гидролизующую активность абзимов. В результате подавления аутоиммунных процессов уровень гормонов щитовидной железы восстановился почти до нормы без гормонального вмешательства.

Известно, что антитела таких больных АИТ гидролизуют белок *тиреоглобулин*, из которого образуется гормон *тироксин*.

У 65 % больных аутоиммунным тиреоидитом были обнаружены антитела с ДНК-гидролизующей активностью, уровень которой коррелировал с диагностическими показателями для этой патологии. При лечении тироксином, происходит временное улучшение, не влияя на глубину протекания самих аутоиммунных процессов.

При лечении *плаквенилом* обнаружили, что он эффективно подавляет многие аутоиммунные реакции: уровень ДНК-гидролизующих абзимов в крови пациентов стал резко снижаться, одновременно и другие показатели также стали приходить в норму - в крови уменьшилась концентрация тиреоглобулина и антител к этому белку, а концентрации тироидных гормонов восстановились практически до нормы (при том, что гормональная терапия не проводилась). В результате у больных нормализовалась функция щитовидной железы, улучшилось общее состояние.

Абзимы, вероятно, играют отрицательную роль и при других аутоиммунных болезнях. Например, иммунизация мышей абзимами, гидролизующими вазоактивный интестинальный пептид, провоцирует у них астму, так как разрушение этого белкового гормона приводит к затруднению дыхания.

Активность ДНК-гидролизующих антител (абзимов) определялась по появлению гидролизованых форм ДНК при инкубации ДНК с антителами (с последующим электрофорезом).

Чем выше активность абзимов, тем больше должна быть концентрация гидролизованых форм ДНК.

Судя по этому критерию, активность абзимов в крови кормящих женщин повышается по сравнению с последним триместром беременности, но особенно – в десятки раз – повышается активность антител из их молока

*Абзимы больных системной красной волчанкой, гидролизующие ДНК, оказались цитотоксичными, т. е. тормозящими рост клеток.*

Такой же способностью обладают некоторые белки-цитокины — природные регуляторы роста многих клеток (один из таких белков, *фактор некроза опухолей*, очень важен для предохранения организма от рака).

Цитотоксичность абзимов иногда бывает выше, чем у самих цитокинов.

В отличие от обычных антител, такие абзимы могут проникать в ядро клетки через все мембраны, связываться с ДНК, расщеплять ее и таким образом приводить клетку к гибели.

Есть основания считать, что появление абзимов на ранних стадиях аутоиммунных заболеваний может стимулировать дальнейшее развитие болезни.

Но абзимы оказались не только врагами: в 1990-х годах новосибирские ученые совершенно неожиданно в изобилии обнаружили абзимы в крови совершенно здоровых людей, а именно — беременных женщин.

Более того, оказалось, после родов эти абзимы попадают в материнское молоко! Почему это происходит?

Потому что особенностью реорганизации иммунной системы беременной женщины является включение у нее своеобразной иммунной «памяти», в которой во время беременности аккумулируется информация о всех вредных факторах окружающей среды.

В случае вскармливающих это приводит к тому, что в результате иммунизации будущей матери различными антигенами за 1—3 до появления потомства ее молоко будет содержать антитела к этим антигенам в очень больших количествах.

При этом не важны ни путь попадания антигена в организм матери, ни его природа (будь это компоненты пищи, белки бактерий или вирусов).

Иммунные процессы с началом лактации запускаются в соответствии с информацией, накопленной в иммунной «памяти», чтобы грудное молоко содержало все антитела, необходимые для защиты новорожденного.

Это обеспечивает последнему *пассивный иммунитет*, т.к. его собственная иммунная система начинает активно развиваться лишь в возрасте 4—6 месяцев.

Молоко рожениц оказалось на редкость богатым источником абзимов, гидролизующих ДНК и РНК, полисахариды, молочный белок казеин и другие вещества.

Каталитическая активность этих антител оказалась еще выше, чем у антител из крови больных аутоиммунными заболеваниями.

В грудном молоке присутствуют и уникальные абзимы, катализирующие не разрушение субстратов, а их модификацию:

-они могут фосфорилировать липиды, белки и полисахариды — прикреплять к определенным их частям остатки фосфата.

Абзимы молока, очевидно, играют положительную роль, заключающуюся в усилении защитного действия пассивного иммунитета за счет гидролиза и модификации чужеродных молекул вирусов, бактерий, компонентов пищи.

Интересный факт: все указывает на то, что беременность стимулирует у женщин процессы, очень похожие на те, что наблюдаются у больных аутоиммунными заболеваниями.

Но в женском организме они заканчиваются с окончанием лактации, а у больных носят хронический характер.

Ответ на вопрос, каким образом у женщин происходит выключение в нужный момент потенциально опасных аутоиммунных реакций, может дать ключ к лечению до сих пор неизлечимых аутоиммунных болезней.

В любом случае скрытый потенциал организма в производстве разнообразных абзимов, бесспорно, велик.

Когда в 2005 г. в издательстве *Wiley-VCH* вышла первая в мире монография, посвященная каталитическим антителам, то вступлением к ней стали известные слова пророка Исая: «Перекуем мечи на орала», очень уместные в данном случае.

Может быть, дальнейшее изучение этих необычных многофункциональных белков действительно приведет к новым удивительным открытиям в медицине и фармакологии, и наши вчерашние «враги» превратятся в особо эффективные лекарства нового поколения?

## **Контрольные вопросы:**

1. Общее понятие о катализе.
2. Снижение энергии активации у различных филогенетических групп организмов.
2. Энергетический барьер реакции и энергия активации ферментативных и ферментативных реакций.
3. Фермент-субстратный комплекс.
4. Природа сил, стабилизирующих различные конформационные состояния системы фермент-субстрат.
5. Доказательство образования фермент-субстратного комплекса.
4. График зависимости активности фермента от температуры раствора. Анализ кривой.
5. Температурный оптимум ферментативной реакции.
6. Термостабильные и термолабильные ферменты.
7. Активность ферментов при низких температурах.
8. Влияние кристаллизации воды на активность ферментов.
9. Активность ферментов в замороженных средах.
10. Зависимость скорости реакции от значения рН раствора.
11. Влияние рН на заряд ионогенных групп в молекулах белка.
12. Изменения структуры фермента и реакционной способности активного центра при разных значениях рН.
13. Оптимальное значение рН для ферментов и его биологическое значение.
14. В чём заключаются сходства и отличия ферментов с небиологическими катализаторами?
15. Расскажите о стадиях образования фермент-субстратного комплекса.
16. Какие взаимодействия называются электростатическими и почему?
17. Как образуются водородные связи?
18. При каких условиях возникают вандерваальсовы взаимодействия?
19. Что такое гидрофобные взаимодействия?
20. Типы катализа, используемые в ферментативных реакциях:  
Общий кислотно-основной катализ.  
Ковалентный катализ.
21. Связывание субстрата в напряжённой конфигурации.
22. Эффект сближения ориентации.
23. Особенности ферментативного действия
24. Какие факторы определяют эффективность и специфичность ферментативного катализа?

## **Тема 6 - Ферменты-дирижеры. Активаторы и ингибиторы**

### План

1. Мультиферментная система.
2. Ферменты-«дирижёры».

3. Два класса регуляторных ферментов: аллостерические и ферменты, регулируемые путём их ковалентной модификации.
4. Аллостерические ферменты: строение и свойства.
5. Аллостерические эффекторы- активаторы и ингибиторы.
6. Аллостерическая регуляция-гомotropная и гетеротропная.
7. Ковалентная модификация ферментов. Варианты ковалентной модификации (частичный протеолиз, фосфорилирования — дефосфорилирование).
8. Ингибирование ферментов: специфическое, неспецифическое.
9. Типы ингибирования: обратимое и необратимое ингибирование.
10. Обратимое ингибирование: конкурентное и неконкурентное ингибирование.
11. Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы.
12. Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты.
13. Локализация ферментов и регуляция их активности.

*Ферменты-«дирижеры»:* изменение конформации под действием эффекторов.

Ферменты, осуществляющие в клетке различные метаболические процессы, организованы в виде последовательных цепей или систем, в которых они действуют согласованно. В каждой такой ферментной системе есть хотя бы один фермент, выполняющий роль «дирижера», который задает скорость всей последовательности реакций, так как он катализирует лимитирующую стадию, т. е. самую медленную реакцию, определяющую скорость всего процесса в целом. Такие *ферменты-«дирижеры»* обладают способностью повышать или понижать свою каталитическую активность в ответ на определенные сигналы.

Благодаря действию подобных ферментов скорость каждой последовательности метаболических реакций постоянно изменяется, причем почти мгновенно приспосабливаясь к меняющимся потребностям клетки в энергии и играющих роль строительных блоков молекулах, которые необходимы для роста и обновления клеток.

В большинстве случаев *фермент-«дирижер»* катализирует первую реакцию такой последовательности. Остальные ферменты просто подчиняются указаниям «дирижера»; катализируемые ими реакции ускоряются лишь при поступлении достаточного количества субстратов, образующихся в качестве продуктов предшествующих реакций.

Ферменты-«дирижеры», активность которых изменяется под действием молекулярных сигналов различных типов, называются *регуляторными*.

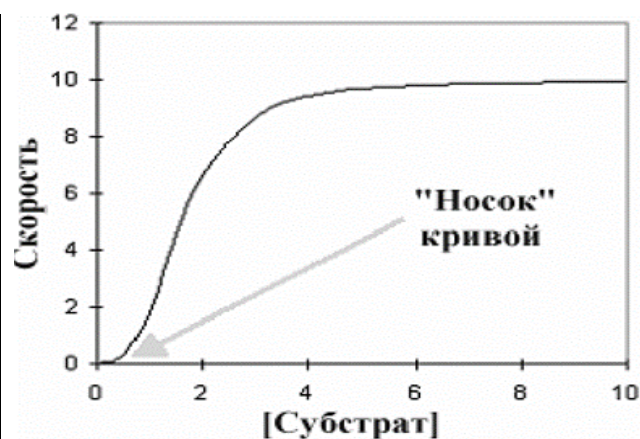
Существуют два основных класса регуляторных ферментов: *аллостерические*, т.е. ферменты, регулируемые нековалентно связанными с

ними модуляторами, и ферменты, регулируемые путём их ковалентной модификации.

Аллостерические взаимодействия проявляются в характере кривых зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата или эффектора, в частности в S-образности этих кривых (отклонение от гиперболической кривой Михаэлиса-Ментен).

Ключевой элемент этой кривой, который отличает ее от гиперболической - «носок» у основания кривой, который можно видеть при низких концентрациях субстрата.

**Сигмоидная кинетика.** При составлении графика зависимости скорости от концентрации субстрата для ферментативной реакции для аллостерических ферментов получается несколько иной тип кривой, называемой сигмоидальной в отличие от гиперболической для не аллостерических ферментов.

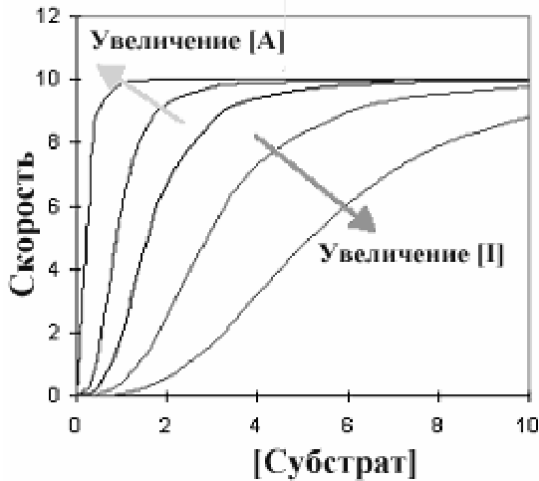


В этой точке увеличение концентрации субстрата вызывает очень незначительное увеличение в скорости - диаграмма имеет очень небольшой наклон. При более высоких уровнях субстрата, (выше 0.5 единиц концентрации на этом графике) можно видеть, что увеличение концентрации субстрата начинает вызывать намного более значительное увеличение в скорости, и кривая становится более крутой. При высоких концентрациях субстрата график становится очень похожим на гиперболический график, и можно видеть такую же пологую кривую, как и на графике уравнения Михаэлиса и Ментен.

Такой тип диаграммы характерен для положительной субстратной кооперативности. При очень низких концентрациях субстрата лишь небольшое количество активных центров фермента связываются с субстратом и фермент будет иметь низкое сродство к субстрату. Поэтому добавление большего количества субстрата вызывает только небольшое увеличение в скорости реакции, поскольку субстраты связываются очень плохо. Однако, по мере повышения числа связавшихся молекул субстрата, положительный кооперативный эффект увеличивает способность фермента связывать субстраты, и кривая на графике начинает это показывать, круто перемещаясь вверх.



Аллостерические ингибиторы и активаторы объединяют общим названием эффекторы. Эффектор - одна из важных особенностей аллостерических ферментов. Возможность изменять скорость реакции, катализируемой ферментом, ингибиторами и активаторами - краеугольный камень принципов регуляции метаболизма. Следующий график показывает пути, по которым эффекторы изменяют кинетический график типичного



аллостерического фермента с положительной субстратной кооперативностью.

Центральная линия графика - типичная сигмовидная кривая в отсутствие любого эффектора. В присутствии активатора (A) скорость реакции повышается при любой данной концентрации субстрата, в то время как ингибитор уменьшает скорость реакции. Интересны и изменения общей формы кривой по сравнению с центральной линией. Ингибитор увеличил сигмовидную форму, удлиняя «носик» кривой, в то время как активатор оказывал противоположный эффект. При более высокой концентрации активатора график в целом приобретает характер гиперболы. Это указывает на то, что аллостерический ингибитор увеличивает уровень субстратной кооперативности, в то время как активатор уменьшает его.

Таким образом аллостерические ферменты обладают рядом свойств, которые отличают их от не аллостерических. Это:

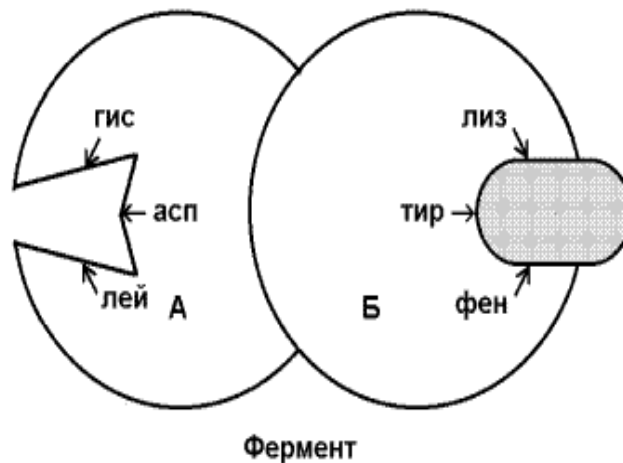
- Полимерная структура,
- Сигмоидная (в отличие от гиперболической для не аллостерических) форма кривой зависимости скорости реакции от концентрация субстрата,
- Существование эффекторов,
- Двухфазный ответ на конкурентные ингибиторы,
- Потеря аллостерических свойств при денатурации

Итак, наряду с активным центром такие ферменты содержат, по меньшей мере, еще один регуляторный центр.

*Аллостерический центр* - участок молекулы фермента, способный присоединять определённые молекулы (эффекторы или модуляторы). Аллостерический центр специфичен по отношению к своему эффектору подобно тому, как активный центр специфичен по отношению к своему субстрату.



На рисунке схематично представлено взаимодействие аллостерического фермента и его эффектора. Аллостерический фермент состоит из двух субъединиц: А - каталитической, включающей активный центр, и Б - регуляторной, в состав которой входит аллостерический центр



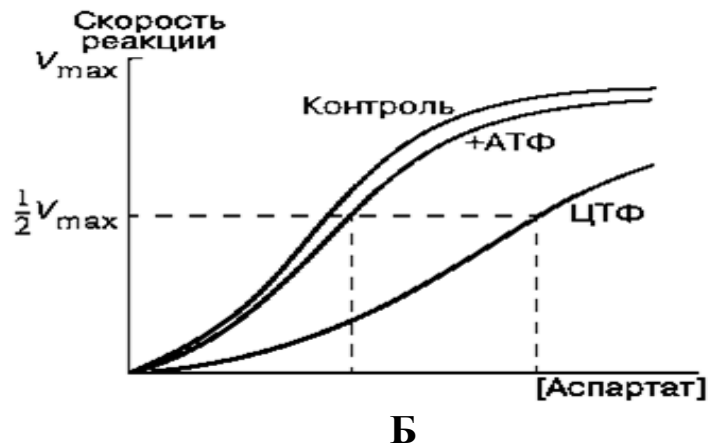
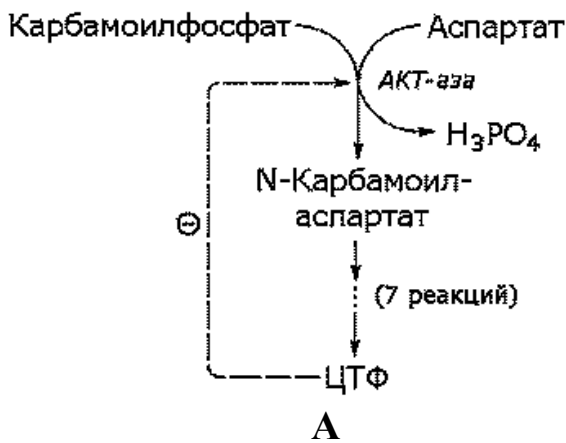
Между аллостерическим центром одной из субъединиц фермента и аллостерическим эффектором могут возникать не ковалентные взаимодействия (водородные, ионные и гидрофобные). Это приводит к обратимому изменению конформации остальных субъединиц молекулы фермента, в том числе изменению конформации активного центра. В результате активность фермента снижается или повышается.

*Аллостерические эффекторы* бывают двух типов – активаторы и ингибиторы.

Аллостерические активаторы способствуют переходу фермента из Т-конформации с низким сродством к субстрату в R-конформацию с высоким сродством к субстрату, аллостерические ингибиторы – наоборот. Если после присоединения эффектора сродство активного центра фермента к субстрату повышается, то эффектор называется аллостерическим активатором, если сродство понижается, то эффектор называется аллостерическим ингибитором.

Различают *гомotropную* и *гетеротропную аллостерическую регуляцию*. В случае гомотропной регуляции эффектором является субстрат. У таких ферментов аллостерический центр по своей конформации совпадает с активным, а роль аллостерического эффектора фермента выполняет молекула субстрата. Взаимодействие субстрата с активным центром одной из субъединиц аллостерического фермента повышает сродство остальных субъединиц к субстрату. Это напоминает связывание молекулы гемоглобина с кислородом.

В случае гетеротропной регуляции эффектор отличается от субстрата и аллостерический центр не совпадает с активным центром. Примером может служить регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов (А). Начальную реакцию этого метаболического пути катализирует фермент аспартат-карбамоилтрансфераза (АКТ-аза). Конечный продукт цепи реакций – цитидинтрифосфат (ЦТФ) является аллостерическим ингибитором АКТ-азы.



При увеличении концентрации ЦТФ (Б) сродство фермента к субстратам снижается, хотя максимальная скорость реакции ( $V_{\max}$ ) остаётся неизменной. График зависимости активности от концентрации при этом смещается вправо, как показано на рисунке Б. В этом случае  $V_{\max}$  может быть достигнута при более высокой концентрации субстрата (аспартата). Ингибирующее действие ЦТФ может быть снято добавлением АТФ (субстратом промежуточных реакций биосинтеза).

Таким образом, при накоплении ЦТФ в клетке скорость синтеза пиримидиновых нуклеотидов снижается и повышается при снижении концентрации ЦТФ. Так фермент обеспечивает постоянное присутствие в клетке нужных количеств цитидинтрифосфата.

### Ковалентная модификация ферментов

В ряде случаев каталитическая активность ферментов может изменяться в результате разрыва или образования ковалентных связей в молекуле. Существует несколько вариантов ковалентной модификации, из которых наибольший интерес представляют частичный *протеолиз* и регуляция путём *фосфорилирования* — *дефосфорилирования*.

*Частичный протеолиз.* Многие белки синтезируются в форме неактивных предшественников, которые затем активируются в результате специфического расщепления одной или нескольких пептидных связей. Если *каталитически активный белок* называется *ферментом* (или *энзимом*), то *неактивный предшественник* фермента называется *проферментом* (или *зимогеном*).

Активация белков путем частичного протеолиза - процесс, широко распространенный в биологических системах. Например:

- пищеварительные ферменты, гидролизующие белки, синтезируются в желудке и поджелудочной железе в виде проферментов: пепсин – в виде пепсиногена, трипсин – в виде трипсиногена и т.д.

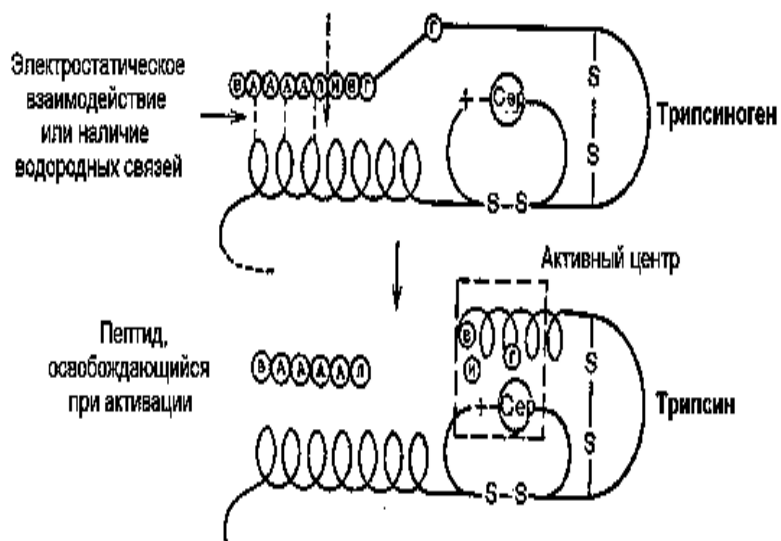
- свертывание крови представляет собой каскад реакций протеолитической активации проферментов. Это обеспечивает быструю ответную реакцию на повреждение кровеносного сосуда.

- некоторые белковые гормоны синтезируются в виде неактивных предшественников. Например, инсулин образуется из проинсулина.

- фибриллярный белок соединительной ткани коллаген также образуется из предшественника — проколлагена.

Активацию неактивных предшественников ферментов путем частичного протеолиза можно рассмотреть на примере превращения трипсиногена в трипсин.). Такое же действие на трипсиноген оказывает и активный трипсин.

Этот процесс происходит под действием фермента энтеропептидазы в просвете двенадцатиперстной кишки и сводится к отщеплению с N-конца полипептидной цепи 6 аминокислотных остатков и, соответственно, укорочению полипептидной цепи как показано на рисунке:



В результате изменения первичной структуры в молекуле профермента возникают новые не ковалентные связи, изменяется конформация полипептидной цепи и формируется активный центр. В молекуле профермента активный центр отсутствует.

Физиологический смысл выработки пищеварительных ферментов в форме проферментов заключается в том, что в противном случае ферменты могли бы оказывать свой эффект на клеточные белки слизистой желудка и поджелудочной железы, вызывая разрушение этих клеток. Такое разрушение клеток может наблюдаться, например, при панкреатите, когда активация трипсина происходит непосредственно в поджелудочной железе.

### Ингибирование ферментов

*Ингибиторами* принято называть вещества, вызывающие частичное или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Поскольку ферменты являются белками, любые агенты, вызывающие денатурацию белка (нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов), приводят к инактивации фермента. Подобное инактивирование относительно неспецифично. Оно не связано с механизмом действия ферментов.

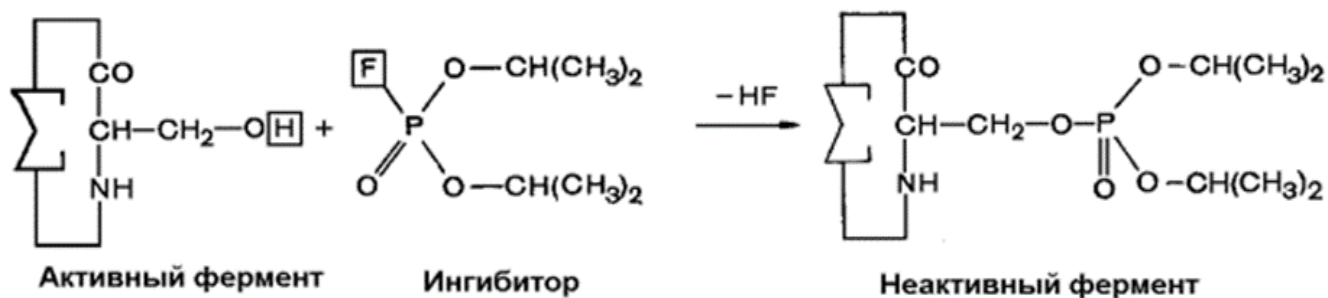
Гораздо большую группу составляют *специфические ингибиторы*, которые оказывают свое действие на один какой-либо фермент или на группу родственных ферментов. Исследование этих ингибиторов имеет важное значение по ряду причин.

1 - ингибиторы могут дать ценную информацию о природе активного центра фермента, а также его функциональных групп и химических связей, обеспечивающих образование фермент-субстратного комплекса.

Известны вещества, специфически связывающие ту или иную группу в молекуле фермента, выключая ее из сферы химической реакции. В частности, йодацетат ( $\text{ICH}_2\text{-COOH}$ ), его амид и этиловый эфир, парахлормеркурибензоат ( $\text{CINg} - \text{C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$ ) сравнительно легко вступают в химическую связь с некоторыми SH-группами ферментов. Если такие группы существенны для акта катализа, то добавление подобных ингибиторов приводит к полной потере активности фермента:  $\text{R-SH} + \text{ICH}_2\text{-COOH} \rightarrow \text{HI} + \text{R-S-CH}_2\text{-COOH}$ .

Некоторые ферменты (холинэстераза, трипсин и химотрипсин) сильно тормозится фосфорорганическими соединениями, в частности *диизопропилфторфосфатом*, вследствие блокирования ключевой гидроксильной группы серина в активном центре.

Диизопропилфторфосфат (ДФФ) – соединение из группы нервнопаралитических отравляющих веществ. Он является ингибитором ацетилхолинэстеразы, которая инактивирует нейромедиатор ацетилхолин. ДФФ связывается с остатком аминокислоты серина в активном центре и блокирует действие фермента.



В результате ацетилхолин накапливается в синаптической щели, нервные импульсы следуют один за другим, мышца не расслабляется, и наступает паралич или смерть.

2 - ингибиторы нашли широкое применение в энзимологии при исследовании природы ферментов и изоферментов, отличающихся не столько по электрофоретической подвижности, сколько по различию реакций на один и тот же ингибитор.

3 - При помощи ингибиторов, избирательно выключающих отдельные стадии многоступенчатого метаболического процесса, могут быть точно установлены последовательность химических реакций и природа

участвующих ферментов. В частности, этим путем при применении йодацетата фторида был расшифрован гликолитический путь окислительно-восстановительных превращений глюкозы до молочной кислоты в мышечной ткани, насчитывающий 11 стадий с участием 11 ферментов и 10 промежуточных метаболитов.

4 - На ингибировании ферментов основан механизм действия на организм многих токсинов и ядов. Так, известно, что при отравлениях синильной кислотой смерть наступает вследствие полного торможения дыхательных ферментов (цитохромоксидазы), в особенности клеток мозга. Токсическое влияние на организм человека и животных некоторых инсектицидов обусловлено торможением активности холинэстеразы — фермента, играющего первостепенную роль в деятельности нервной системы.

5 - Рациональная химиотерапия — осознанное применение лекарственных препаратов в медицине, должна опираться на точное знание механизма их действия, на биосинтез ферментов или работу их в организме. Иногда метод лечения болезней человека включает применение избирательных ингибиторов. Так, ингибитор трипсина, химотрипсина и калликрейна трасилол широко используется при лечении острого панкреатита.

6 - Избирательное ингибиторное действие на ферменты некоторых природных и синтетических соединений (так называемых антиметаболитов) в настоящее время служит основой для разработки эффективных методов синтеза химиотерапевтических препаратов. На этом пути открываются широкие возможности регуляции как синтеза ферментов, так и интенсивности метаболизма.

### **Типы ингибирования**

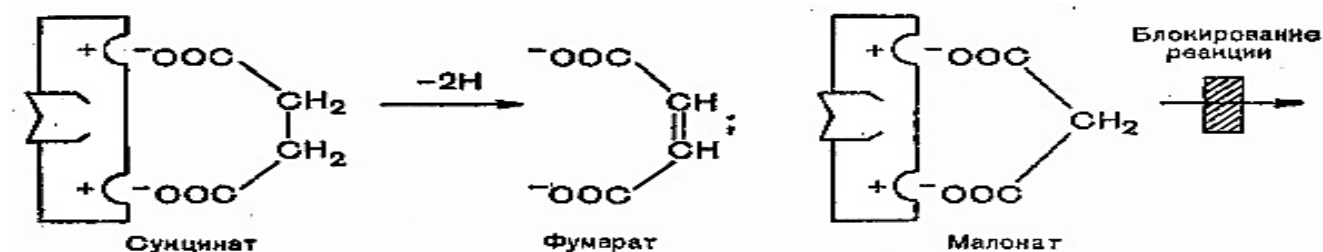
Несмотря на то, что механизм действия большинства ингибиторов не выяснен, обычно различают *обратимое и необратимое ингибирование*. Если молекула ингибитора вызывает стойкие изменения или модификацию функциональных групп фермента, то такой тип ингибирования называется необратимым.

Чаще, однако, имеет место обратимое ингибирование, поддающееся количественному изучению на основе уравнения Михаэлиса — Ментен.

Обратимое ингибирование в свою очередь разделяют на *конкурентное и неконкурентное*, в зависимости от того, удастся или не удастся преодолеть торможение ферментативной реакции путем увеличения концентрации субстрата. Во втором случае повышение концентрации субстрата не изменяет степень ингибирования фермента. К *конкурентному ингибированию* относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и

препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса. Такой тип ингибирования наблюдают, когда ингибитор является структурным аналогом субстрата, в результате возникает конкуренция молекул субстрата и ингибитора за место в активном центре фермента. В этом случае с ферментом взаимодействует либо субстрат, либо ингибитор, образуя комплексы фермент-субстрат (ES) или фермент-ингибитор (EI). При формировании комплекса фермента и ингибитора (EI) продукт реакции не образуется.

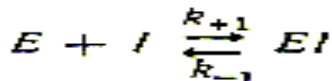
*Конкуренсное ингибирование* может быть вызвано веществами, имеющими структуру, похожую на субстрат, но немного отличающуюся от структуры истинного субстрата. Классическим примером подобного типа ингибирования является торможение активности сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. Этот фермент катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты в fumarовую в соответствии со схемой:



Если в среду добавить малоновую кислоту (ингибитор), то в силу структурного сходства ее с истинным субстратом-сукцинатом поналичию двух таких же ионизированных карбоксильных групп, она будет реагировать с активным центром с образованием *фермент - ингибиторного комплекса* и при этом перенос водорода от малоната не происходит.

Так как структуры субстрата — янтарной кислоты и ингибитора — малоната все же несколько отличаются, они конкурируют за связывание с активным центром, и степень торможения будет определяться соотношением концентраций малоната и сукцината, а не абсолютной концентрацией ингибитора. Этот тип ингибирования иногда называют ингибированием по типу *метаболического антагонизма*.

В общей форме реакция взаимодействия ингибитора с ферментом может



быть представлена следующим уравнением:

Образовавшийся комплекс, называемый фермент-ингибиторным комплексом (EI), в отличие от ES не распадается с образованием продуктов реакции. Константу диссоциации EI-комплекса или ингибиторную константу ( $K_1$ ) можно, следуя теории Михаэлиса — Ментен, определить как отношение

констант обратной и прямой реакций:

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}, \text{ т. е.}$$

ингибиторная константа прямо пропорциональна произведению концентрации фермента и ингибитора и обратно пропорциональна концентрации ЕI-комплекса.

Метод *конкурентного торможения* нашел широкое применение в медицинской практике. К конкурентным ингибиторам относят *антиметаболиты* или *псевдосубстраты*, например, антибактериальные средства *сульфаниламиды*, схожие по структуре с *p*-аминобензойной кислотой, компонентом фолиевой кислоты.

При лечении сульфаниламидами в бактериальной клетке конкурентно нарушается использование *p*-аминобензойной кислоты для синтеза **фолиевой кислоты**, что и вызывает лечебный эффект.



Некоторые аналоги витамина В<sub>6</sub> и фолиевой кислоты, в частности дезоксипиридоксин и аминоптерин, действуют как конкурентные, так называемые коферментные ингибиторы (или антивитамины), тормозящие многие биохимические процессы в организме.

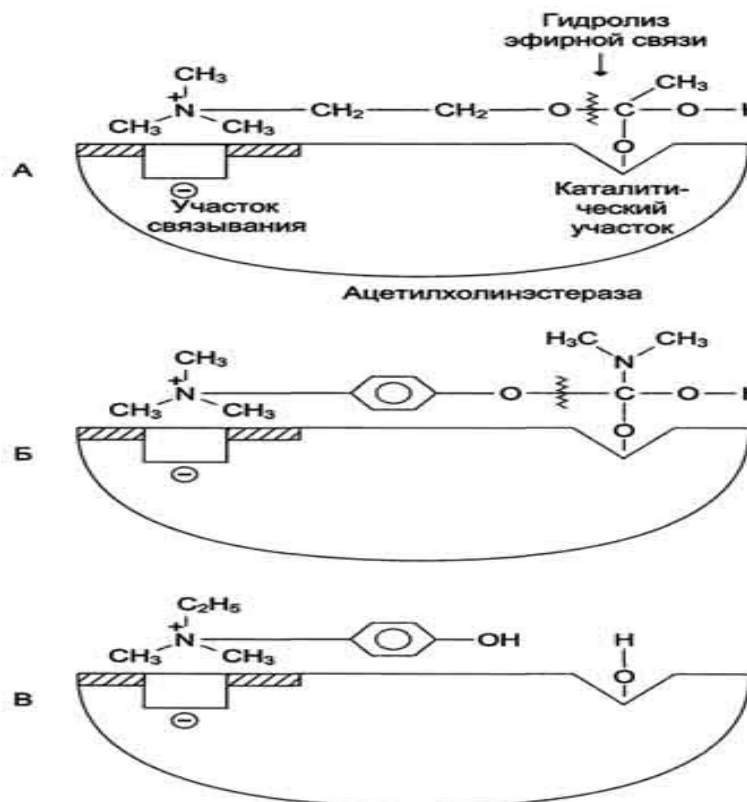
### Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы

Многие лекарственные препараты оказывают своё терапевтическое действие по механизму конкурентного ингибирования. Например, четвертичные аммониевые основания ингибируют ацетилхолинэстеразу, катализирующую реакцию гидролиза ацетилхолина на холин и уксусную кислоту. При добавлении ингибиторов активность ацетилхолинэстеразы уменьшается, концентрация ацетилхолина (субстрата) увеличивается, что сопровождается усилением проведения нервного импульса. Ингибиторы холинэстеразы используют при лечении мышечных дистрофий. Эффективным антихолинэстеразным препаратом является прозерин. На схеме показано (А) присоединение ацетилхолина в активном центре фермента. Стрелкой

указано место гидролиза эфирной связи в молекуле ацетилхолина;

Б - присоединение конкурентного ингибитора - прозерина в активном центре фермента. Указано место гидролиза прозерина, однако реакция идёт намного медленнее, чем с ацетилхолином;

В - присоединение конкурентного ингибитора в активном центре фермента - эндрофония. Эндрофоний связывается в активном центре ацетилхолинэстеразы, препятствуя присоединению ацетилхолина.



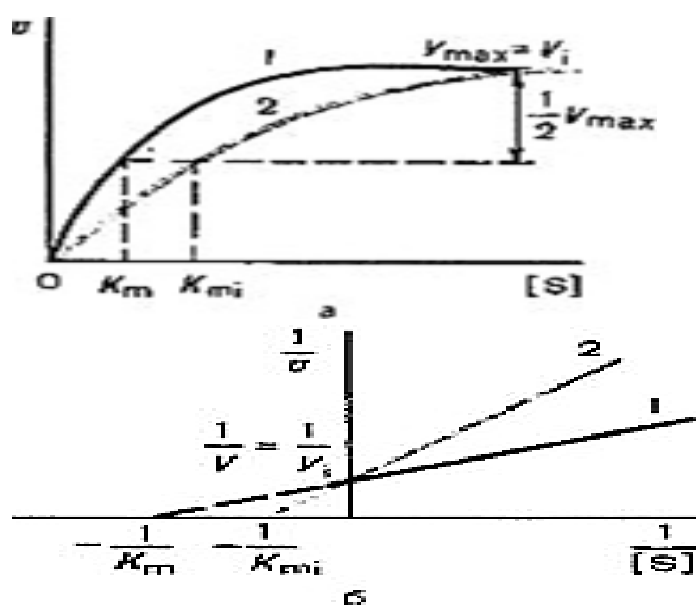
### Кинетические зависимости

На рисунке показано влияние различных концентраций субстрата на скорость реакции, катализируемой ферментами 1 и 2 в присутствии ингибитора:

а) - гиперболическая зависимость  $V$  от  $[S]$ ,

б) прямая зависимость в обратных координатах  $1/V$  от  $1/[S]$  - Лайнуивера-Бэрка,

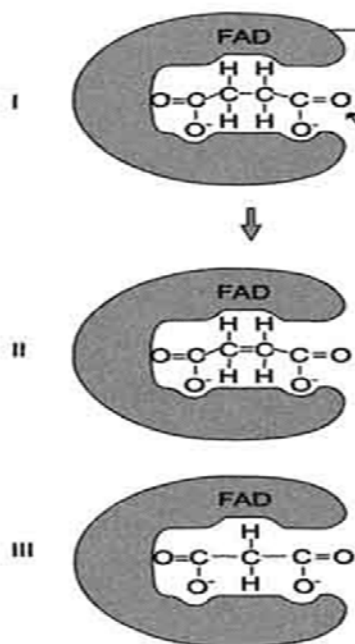
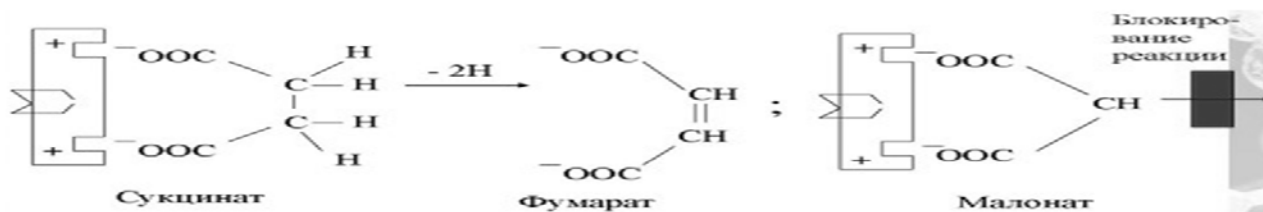
то есть на графике показано, что конкурентный ингибитор



повышает  $K_{mi}$  для данного субстрата, т.е. уменьшает сродство субстрата к ферменту. Таким образом в присутствии конкурентного ингибитора необходима большая концентрация субстрата для достижения  $1/2 V_{max}$ . При значительно более высоких концентрациях субстрата ингибирование полностью исчезает, потому что активные центры всех молекул фермента будут находиться преимущественно в комплексе с субстратом.

Примером конкурентного ингибирования – является и действие малоновой кислоты на сукцинат-дегидрогеназу. Как следует из рисунка на I этапе





I - сукцинат связывается с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы;

II - в ходе ферментативной реакции происходит отщепление двух атомов водорода от сукцината и присоединение их к ко-ферменту FAD. В результате образуется фумарат, который высвобождается из активного центра сукцинатдегидрогеназы;

III - малоновая кислота - структурный аналог сукцината, она также связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы. При этом химическая реакция не идёт.

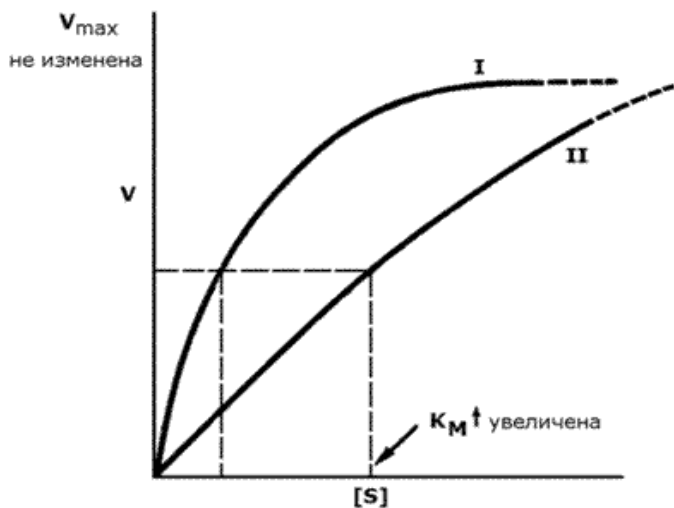
21

(I) - сукцинат связывается с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы → (II) - в ходе ферментативной реакции происходит отщепление двух атомов водорода от сукцината и присоединение их к ко-ферменту FAD. В результате образуется фумарат, который высвобождается из активного центра сукцинатдегидрогеназы → (III) - малоновая кислота - структурный аналог сукцината, она также связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы. При этом химическая реакция не идёт.

Итак, следует помнить особенности, характерные для конкурентного ингибирования:

- конкурентный ингибитор сходен по строению с субстратом.
- конкурентный ингибитор взаимодействует с активным центром фермента, образуя фермент-ингибиторный комплекс, и препятствует взаимодействию активного центра с субстратом.
- действие конкурентного ингибитора зависит от его концентрации: чем выше концентрация ингибитора, тем ниже скорость ферментативной реакции.
- действие конкурентного ингибитора можно снять, увеличив концентрацию субстрата

График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора даёт такую же величину  $V_{max}$ , как и в отсутствии ингибитора (см. рисунок).



На рисунке показано влияние конкурентного ингибитора на кинетические свойства фермента:

величина  $K_M$  в данном случае будет увеличена, поскольку для обеспечения скорости, равной половине максимальной, в присутствии ингибитора потребуется больше субстрата.

Отсюда следует, что конкурентный ингибитор препятствует образованию фермент-субстратного комплекса, но не влияет на процесс распада фермент-субстратного комплекса с образованием продуктов реакции

### Неконкурентное ингибирование

Неконкурентное ингибирование вызывается веществами, не имеющими структурного сходства с субстратами и связывающимися в другом месте молекулы фермента, а не с активным центром.

Степень торможения во многих случаях определяется продолжительностью действия ингибитора на фермент. При данном типе ингибирования благодаря образованию стабильной ковалентной связи фермент часто подвергается полной инактивации, и тогда торможение становится необратимым.

Примерами неконкурентного ингибирования (инактивации) является действие

- йодацетата,
- диизопропилфторфосфата,
- диэтил-*n*-нитрофенилфосфата,
- синильной кислоты, заключающиеся в связывании и выключении функциональных групп или ионов металлов в молекуле фермента.

### Кинетика конкурентного ингибирования

При таком виде ингибирования ингибитор конкурирует с субстратом за активный центр (за контактный участок), что приводит к уменьшению связывания субстрата с ферментом и снижению катализа. Используя терминологию кинетики Михаэлиса-Ментен говорят, что конкурентный ингибитор уменьшает сродство фермента к субстрату, **повышая** константу Михаэлиса ( $K_M$ ), максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) остается при этом **неизменной**.

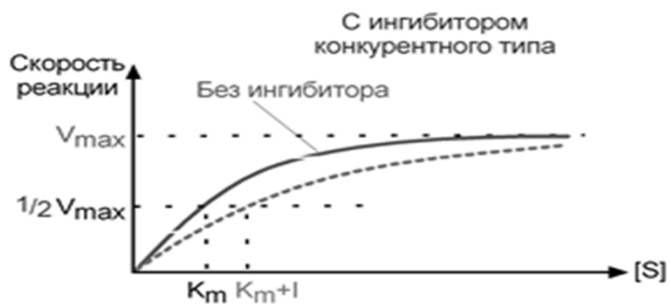


График конкурентного ингибирования в координатах Михаэлиса-Ментен

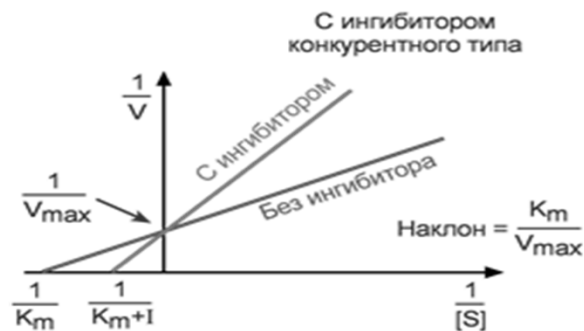


График конкурентного ингибирования в координатах Лайнуивера-Берка

Зависимость в координатах Лайнуивера-Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат. **Конкурентный ингибитор увеличивает  $K_m$  и не изменяет  $V_{max}$ .**

### Кинетика неконкурентного ингибирования

Особенностью неконкурентного ингибитора является его способность связываться с ферментом не в активном центре, и изменение концентрации субстрата **никак не влияет** на это связывание. В то же время неконкурентный ингибитор **не мешает** связыванию субстрата с активным центром. В результате формируется тройной комплекс фермент-субстрат-ингибитор (**E-S-I**), в котором фермент уже не способен изменить свою конформацию и обеспечить проведение реакции. Количество "работоспособных" комплексов E-S при этом снижается. Максимальная скорость реакции ( **$V_{max}$** ) при неконкурентном ингибировании **снижается**, константа Михаэлиса ( **$K_m$** ) **не изменяется**, т.е. добавление дополнительного субстрата не может повлиять на состояние активного центра и работу фермента.

Зависимость в координатах Лайнуивера-Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс. **Неконкурентный ингибитор не изменяет  $K_m$  и снижает  $V_{max}$ .**

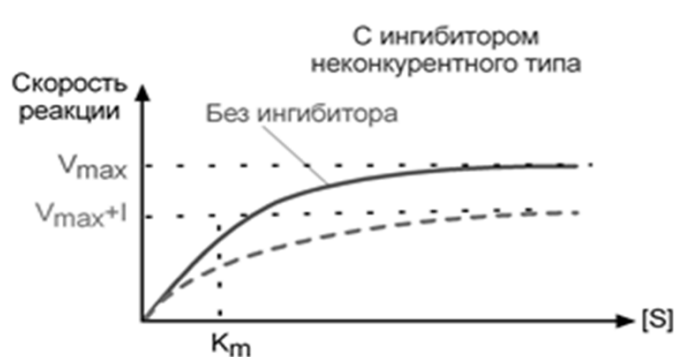


График неконкурентного ингибирования в координатах Михаэлиса-Ментен

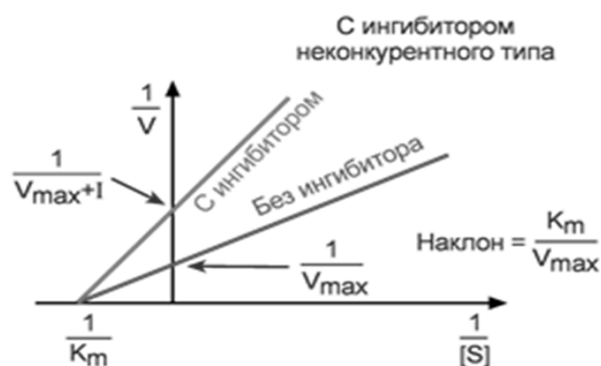


График неконкурентного ингибирования в координатах Лайнуивера-Берка

## **Кинетика бесконкурентного ингибирования**

Бесконкурентный ингибитор способен связываться только с уже образовавшимся комплексом E-S, но не со свободным ферментом. Связывание происходит либо на молекуле субстрата, либо с ферментом, уже начавшем катализ и изменившим свою конформацию. Образовавшийся тройной комплекс E-S-I также непродуктивен.

Максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) и константа Михаэлиса ( $K_m$ ) при бесконкурентном ингибировании снижаются. Добавление дополнительного субстрата не может повлиять на состояние активного центра и работу фермента.

Таким образом, при графическом анализе скоростей ферментативных реакций как функции концентраций субстрата может быть получена ценная информация по кинетике ферментативных реакций, освещающая возможный механизм ферментативного катализа.

### *2. Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты*

Пример лекарственного препарата, действие которого основано на необратимом ингибировании ферментов, - широко используемый препарат аспирин. Противовоспалительный нестероидный препарат аспирин обеспечивает фармакологическое действие за счёт ингибирования фермента циклооксигеназы, катализирующего реакцию образования простагландинов из арахидоновой кислоты. В результате химической реакции ацетильный остаток аспирина присоединяется к свободной концевой  $NH_2$ -группе одной из субъединиц циклооксигеназы (см. схему ниже).

Это вызывает снижение образования продуктов реакции простагландинов, которые обладают широким спектром биологических функций, в том числе являются медиаторами воспаления.

## **Вопросы к теме:**

1. Аллостерическая регуляция.
2. Кинетика действия аллостерических ферментов.
3. Объяснение аллостерического эффекта на молекулярном уровне.
4. Роль гормонов и цАМФ.
5. Ковалентная модификация ферментов.
6. Роль субклеточных структур в регуляции действия ферментов.
7. Проферменты.
8. Обратимость действия ферментов.
9. Изоферменты.
10. Ферментные системы.
11. Ингибирование ферментативной активности - путь лечения патогенных состояний.

12. Направленный дизайн биологически активных соединений, селективное ингибирование ключевых ферментов патогенных микроорганизмов.
13. Обратимые и необратимые ингибиторы.
14. Избирательность подавления активности с учетом особенностей механизма катализа.
15. Скрытые участки связывания ингибиторов.
16. Ингибиторы – миметики переходного состояния.

## **Тема 7- Кофакторы и коферменты**

План:

### 1. Кофакторы

1.1. Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента:

Ионы металлов - стабилизаторы молекулы субстрата,

Ионы металла - стабилизаторы активного центра фермента.

1.2. Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента

1.3. Роль металлов в ферментативном катализе:

Участие в электрофильном катализе,

Участие в окислительно-восстановительных реакциях

1.4. Роль металлов в регуляции активности ферментов.

### 2. Коферменты

2.1. Мульти-субстратные реакции.

2.2. Последовательный механизм.

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы (коферментах) и/или в ионах металлов (кофакторах).

Термин "кофермент" был введен в начале XX века и обозначал часть некоторых ферментов, которая легко отделялась от белковой молекулы фермента и удалялась через полупроницаемую мембрану при диализе. Несколько позже было выяснено, что большинство ферментов состоит из термолabileйной белковой части и термостабильного небелкового фактора – «кофермента». Белковая часть получила название "*апофермент*", который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью. Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу «*холофермента*», обладающую каталитической активностью.

### **Кофакторы**

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется также присутствием в среде активаторов и

ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые тормозят эту реакцию. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Так, соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока; желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы; некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназа), растительная протеиназа и др. в значительной степени активируются соединениями, содержащими свободные SH-группы (глутатион, цистеин), а ряд ферментов – также витамином С. Особенно часто активаторами выступают ионы двухвалентных и, реже, одновалентных металлов. Получены доказательства, что около четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов.

### Ферменты, активируемые металлами

Фермент	Металл	Фермент	Металл
Цитохромы	Fe	Амилаза	Ca
Каталаза	Fe	Липаза	Ca
Пероксидаза	Fe	Карбоангидраза	Zn
Триптофанооксидаза	Fe	Лактатдегидрогеназа	Zn
Гомогентизициклаза	Fe	Уриказа	Zn
Аскорбатоксидаза	Cu	Карбоксипептидаза	Zn
Тирозиназа	Cu	Пируваткарбоксилаза	Mg
Фенолоксидаза	Cu	Фосфатазы	Mg
Ксантинооксидаза	Mo	Фосфоглюкокиназа	Mg
Нитратредуктаза	Mo	Аргиназа	Mn
Альдегидоксидаза	Mo	Фосфоглюкомутаза	Mn
Некоторые пептидазы	Co	Холинэстераза	Mn

Известны ферменты, действие которых активируется ионами нескольких металлов; в частности, енолаза активируется  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^{+}$

Итак, более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов, т.е. кофакторов.

Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента заключается в следующем:

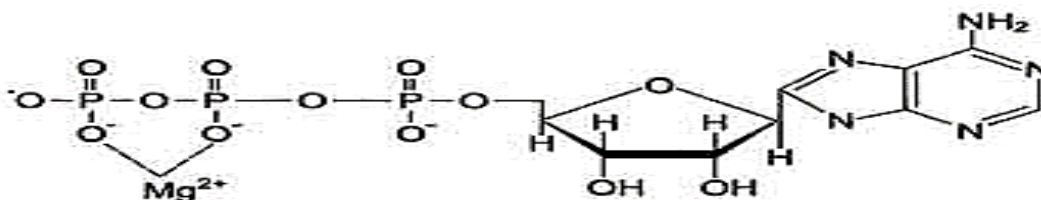
- ионы металлов - стабилизаторы молекулы субстрата,
- ионы металла - стабилизаторы активного центра фермента.
- ионы металла выполняют функцию стабилизаторов конформации белковой молекулы фермента, т.е. третичной и четвертичной структур.

*Ионы металлов - стабилизаторы молекулы субстрата.* В ряде случаев ионы металлов ( $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) выполняют функции простетических групп ферментов, служат акцепторами и донаторами электронов, выступают в качестве электрофилов либо нуклеофилов, сохраняя реактивные группы в необходимой ориентации.

Например, ионы  $Mg^{2+}$  через отрицательно заряженную фосфатную группу обеспечивают присоединение монофосфатных эфиров органических веществ к активному центру фосфатаз, катализирующих гидролиз этих соединений.

Иногда металл соединяется с субстратом, образуя истинный субстрат, на который действует фермент. В частности, ионы  $Mg^{2+}$  активируют *креатинфосфокиназу* благодаря образованию истинного субстрата – *магниевои соли АТФ*.

Для некоторых ферментов субстратом служит комплекс превращаемого вещества с ионом металла. Например, для большинства киназ в качестве одного из субстратов выступает не молекула АТФ, а комплекс  $Mg^{2+}$ -АТФ. В этом случае ион  $Mg^{2+}$  не взаимодействует непосредственно с ферментом, а участвует в стабилизации молекулы АТФ и нейтрализации отрицательного заряда субстрата, что облегчает его присоединение к активному центру



фермента):

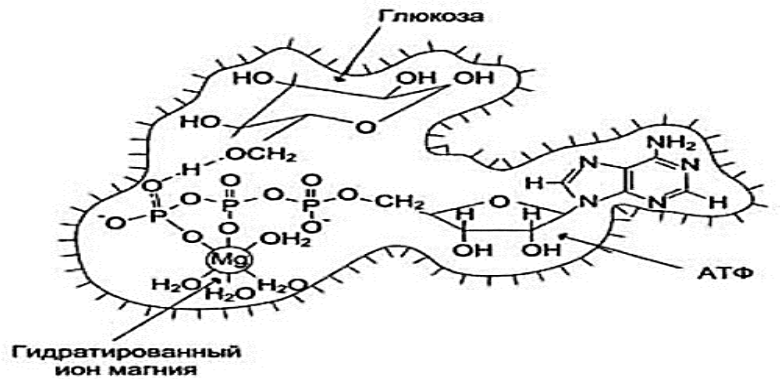
Схематично роль кофактора при взаимодействии фермента и субстрата представляют как комплекс: **E-S-Me**, где **E** - фермент, **S** - субстрат, **Me** - ион металла.

Реакция	Фермент и кофактор	Продукты реакции
Глюкоза + АТФ	Гексокиназа $Mg^{2+}$	Глюкозо-6-фосфат + АДФ
Триптофан + $H_2O$	Триптофаназа $K^+$ или $Rb^+$	Индол + Пируват + $NH_3$
Растворимый фибрин	Трансглутаминаза плазмы $Ca^{2+}$	Нерастворимый фибрин
Аргинин + $H_2O$	Аргиназа $Co^{2+}$ , $Mn^{2+}$ или $Ni^{2+}$	Мочевина + 2,5-диаминовальериановая кислота
Гистидин	Гистидиндекарбоксилаза $Fe^{3+}$ или $Al^{3+}$	Гистамин + $CO_2$
Катехин	Феноксидаза $Cu^{2+}$	o-Бензохинон
Молочная кислота + $NAD^+$	Лактатдегидрогеназа $Zn^{2+}$	Пировиноградная кислота + $NAD \cdot H + H^+$
Нитрат + $NAD \cdot H + H^+$	Нитратредуктаза $Mo^{2+}$	Нитрит + $NAD \cdot H^+ + H_2O$

В качестве примера можно также привести расположение субстратов в активном центре гексокиназы. Гексокиназа катализирует перенос концевой,

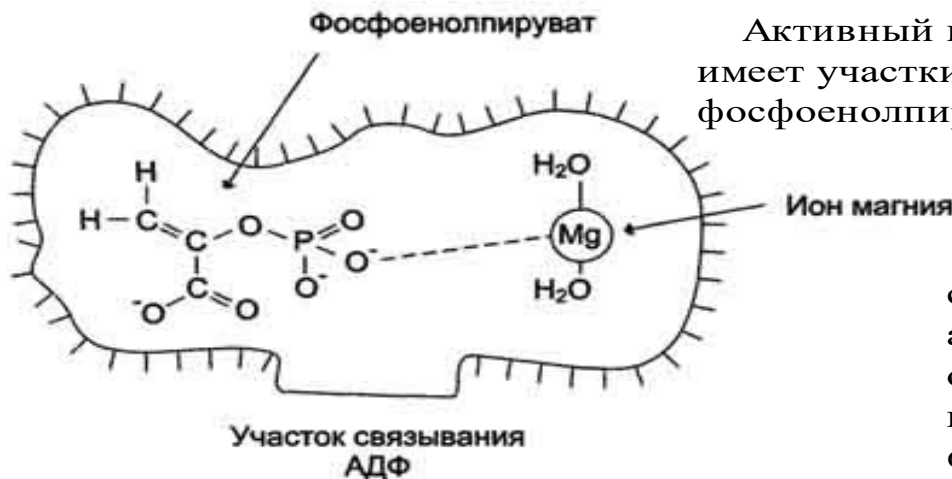
γ-фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата:

В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса  $Mg^{2+}$ -АТФ. В результате ферментативной реакции происходит перенос концевой, γ-фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата



Ион  $Mg^{2+}$  участвует в присоединении и "правильной" ориентации молекулы АТФ в активном центре фермента, ослабляя фосфоэфирную связь и облегчая перенос фосфата на глюкозу.

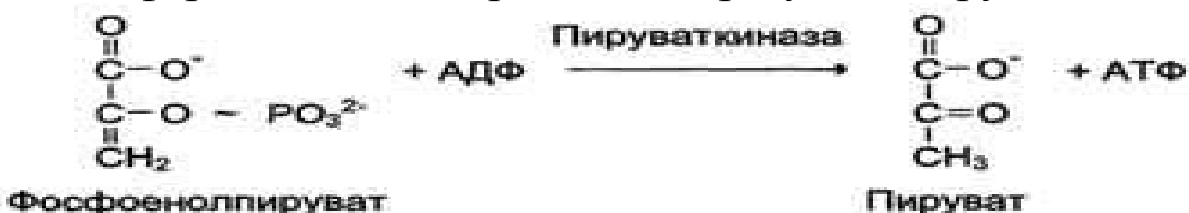
Ионы металла - стабилизаторы активного центра фермента. В некоторых случаях ионы металла служат "мостиком" между ферментом и субстратом. Они выполняют функцию стабилизаторов активного центра, облегчая присоединение к нему субстрата и протекание химической реакции. К металлоэнзимам относят фермент пируваткиназу, катализирующий реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват



Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и АДФ.

$Mg^{2+}$  участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоенолпирувата.

В ходе ферментативной реакции образуется пируват и АТФ.





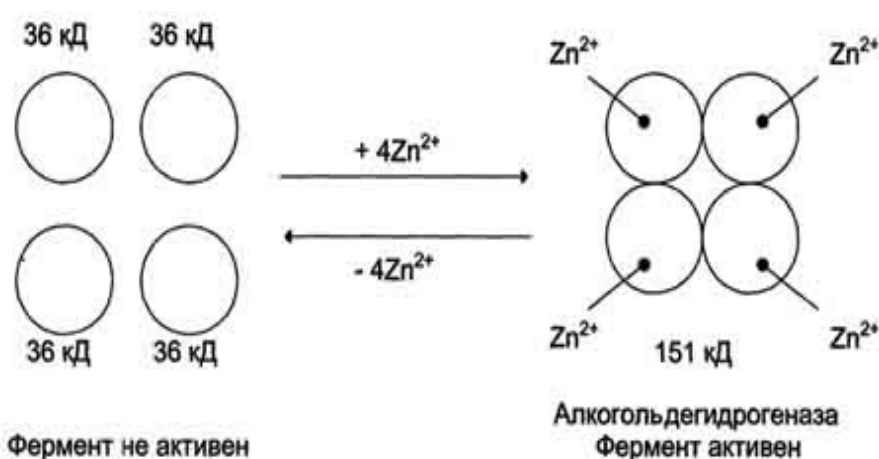
В ряде случаев ион металла может способствовать присоединению кофермента. Перечисленные выше функции выполняют такие металлы, как  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ . В отсутствие металла эти ферменты активностью не обладают. Такие ферменты получили название "металлоэнзимы". Схематично данный процесс взаимодействия фермента, субстрата и металла можно представить следующим образом: **E-Me-S**.

*Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента.* Ионы металлов обеспечивают сохранение вторичной, третичной, четвертичной структуры молекул фермента. Такие ферменты в отсутствие ионов металлов способны к химическому катализу, но они нестабильны. Их активность снижается и даже полностью исчезает при небольших изменениях pH, температуры и других незначительных изменениях внешнего окружения.

Таким образом, ионы металлов выполняют функцию стабилизаторов оптимальной конформации белковой молекулы.

Ферменты, обеспечивающие сохранение вторичной, третичной, четвертичной структуры молекулы фермента, в отсутствие ионов металлов способны к химическому катализу, однако они нестабильны.

В стабилизации вторичной и третичной структуры принимают участие ионы щёлочноземельных металлов. Например, для поддержания третичной конформации пируваткиназы необходимы ионы  $K^+$ . Для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы, катализирующей реакцию окисления этанола, необходимы ионы цинка.



Алкогольдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц с молекулярной массой 151 кД. В состав фермента входят 4 атома  $Zn^{2+}$ .

Удаление  $Zn^{2+}$  приводит к потере активности фермента за счёт диссоциации на 4 неактивные субъединицы с молекулярной массой 36 кД.

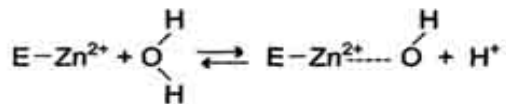
**3. Роль металлов в ферментативном катализе:** не менее важную роль отводят ионам металлов в осуществлении ферментативного катализа.

*Участие в электрофильном катализе.* Наиболее часто эту функцию выполняют ионы металлов с переменной валентностью, имеющие свободную *d*-орбиталь и выступающие в качестве электрофилов. Это, в первую очередь,

такие металлы, как  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ . Ионы щёлочно-земельных металлов ( $Na^+$  и  $K^+$ ) не обладают этим свойством.

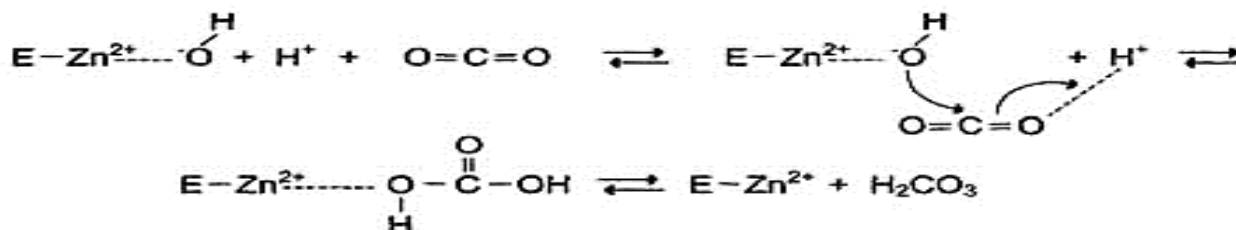
В качестве примера можно рассмотреть функционирование фермента карбоангидраза. Карбоангидраза - цинксодержащий фермент, катализирующий реакцию образования угольной кислоты:  $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$ .

Ион  $Zn^{2+}$  в результате электрофильной атаки участвует в образовании  $H^+$



и  $OH^-$  ионов из молекулы воды:

Протон и гидроксильная группа последовательно присоединяются к диоксиду углерода с образованием угольной кислоты (см. схему).



В ходе электрофильного катализа ионы металлов часто участвуют в стабилизации промежуточных соединений.

*Участие в окислительно-восстановительных реакциях.* Ионы металлов с переменной валентностью могут также участвовать в переносе электронов. Например, в цитохромах (гемсодержащих белках) ион железа способен

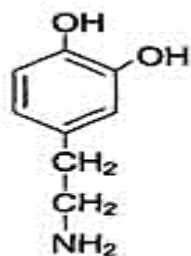


присоединять и отдавать один электрон:

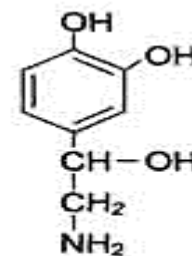
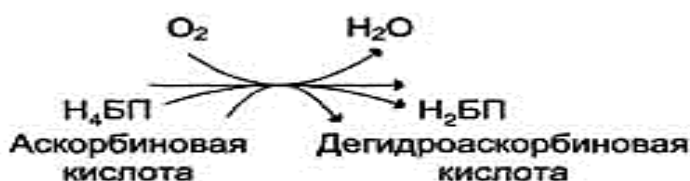
Благодаря

этому свойству цитохромы участвуют в окислительно-восстановительных реакциях.

Фермент дофамингидроксилаза катализирует реакцию образования норадреналина при участии витамина С. За окислительно-восстановительные свойства у дофамингидроксилазы отвечает ион меди:



Дофамин



Норадреналин

Фермент, содержащий ион  $Cu^{2+}$ , не вступает в реакцию с молекулой кислорода. Но при восстановлении  $Cu^{2+}$  до  $Cu^+$  с помощью аскорбиновой кислоты образуется ион меди, способный взаимодействовать с кислородом с образованием перекисного соединения.

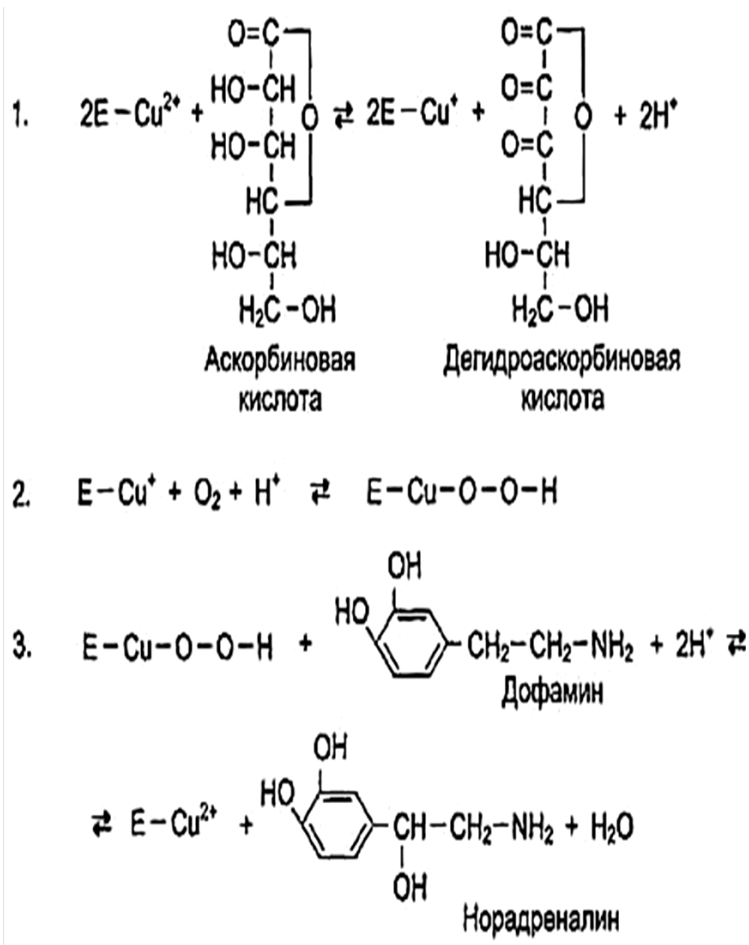
Далее гидроксильная группа переносится на молекулу дофамина с образованием норадреналина:

Участие иона меди в активации молекулы кислорода при функционировании дофамингидроксилазы происходит в 3 этапа:

На 1-ом - восстановление  $\text{Cu}^{2+}$ , входящего в состав активного центра дофамингидроксилазы, до  $\text{Cu}^+$  с помощью аскорбиновой кислоты;

На 2-ом - взаимодействие  $\text{Cu}^+$  с кислородом с образованием перекисного соединения;

На 3-ем - перенос гидроксильной группы на молекулу дофамина с образованием норадреналина.



Иногда ионы металлов выступают в роли регуляторных молекул. Например, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  служат активаторами фермента протеинкиназы С, катализирующего реакции фосфорилирования белков. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  также изменяют активность ряда кальций-кальмодулинзависимых ферментов.

### Коферменты

Как уже было сказано, для проявления каталитической активности большинству ферментов необходимо наличие кофермента. Исключение составляют гидролитические ферменты (например, протеазы, липазы, рибонуклеаза), выполняющие свою функцию в отсутствие кофермента.

Кофермент, локализуясь в каталитическом участке активного центра, принимает непосредственное участие в химической реакции, выступая в качестве акцептора и донора химических группировок, атомов, электронов.

Кофермент может быть связан с белковой частью молекулы ковалентными и не ковалентными связями.

В первом случае он называется простетической группой (например, FAD, FMN, биотин, липоевая кислота). Вместе с тем известны примеры, когда кофермент присоединяется к ферменту нековалентными связями настолько

прочно, что не диссоциирует от белковой молекулы, например тиаминдифосфат.

Во втором случае кофермент взаимодействует с ферментом только на время химической реакции и может рассматриваться в качестве второго субстрата. Примеры -  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ .

Апофермент обеспечивает специфичность действия и отвечает за выбор типа химического превращения субстрата. Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях субстрата. Например, пиридоксальфосфат в зависимости от того, с каким апоферментом взаимодействует, участвует в реакциях трансаминирования или декарбоксилирования аминокислот.

Химическая природа коферментов, их функции в ферментативных реакциях чрезвычайно разнообразны. Традиционно к коферментам относят производные витаминов, помимо них есть значительный класс небелковых соединений, принимающих участие в проявлении каталитической функции ферментов.

К коферментам относят следующие соединения:

- производные витаминов;
- геммы, входящие в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, гуанилатциклазы, NO-синтазы и являющиеся простетической группой ферментов;
- нуклеотиды - доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты;
- убихинон, или кофермент Q, участвующий в переносе электронов и протонов в ЦПЭ;
- фосфоаденозилфосфосульфат, участвующий в переносе сульфата;
- S-аденозилметионин (SAM) - донор метильной группы;
- глутатион, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях.

### **Мультисубстратные реакции.**

Большинство ферментов катализирует реакции, в которых участвует более чем один субстрат. В случае если кофермент не является простетической группой, его также можно рассматривать как ещё один субстрат. Следовательно, участников ферментативной реакции может быть несколько: непосредственно фермент, несколько субстратов и кофермент.

В этих случаях механизм ферментативной реакции, как правило, может идти по одному из двух путей: по механизму "пинг-понг" (механизму двойного замещения) или последовательному.

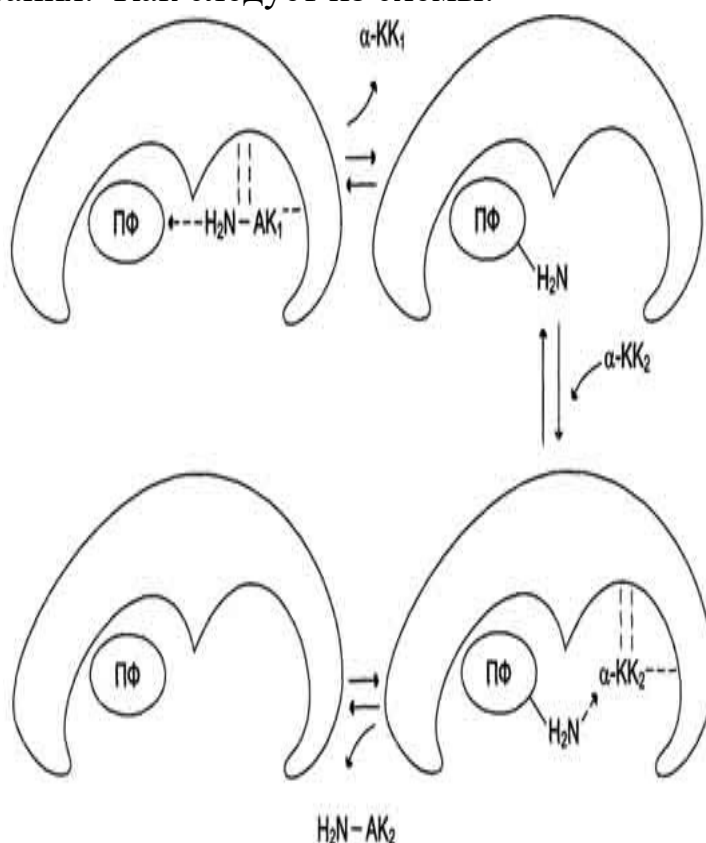
Механизм "пинг-понг":  $E + A \rightarrow EA \xrightarrow{P_1} E' \xrightarrow{B} E'B \rightarrow P_2 + E$ . Как следует из схемы субстрат **A**, взаимодействуя с ферментом (**E**), превращается в продукт (**P**<sub>1</sub>). Фермент остаётся в результате этого преобразования не в нативной форме, а в изменённой (**E'**) в результате модификации кофермента. Далее к активному центру **E'** присоединяется субстрат **B**, подвергающийся преобразованию в продукт (**P**<sub>2</sub>) с высвобождением нативной формы фермента (**E**).

Пример механизма "пинг-понг" - реакция трансаминирования с участием ферментов аминотрансфераз (кофермент пиридоксальфосфат).

Аминотрансферазы, открытые отечественным учёным А.Е. Браунштейном, катализируют обратимые реакции переноса аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту. На рисунке представлена схема механизма "пинг-понг" реакции трансаминирования. Как следует из схемы:

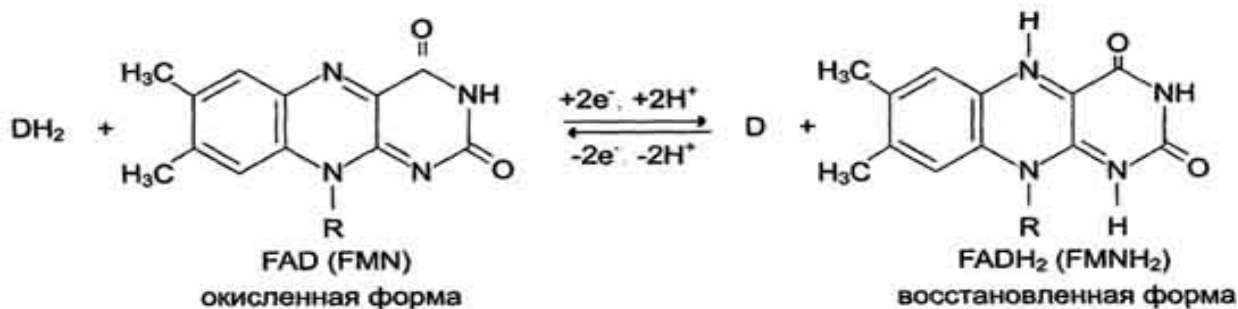
Кофермент пиридоксальфосфат (ПФ), связанный с ферментом, принимает α-аминогруппу от первой аминокислоты (АК<sub>1</sub>), которая при этом превращается в α-кетокислоту 1 (КК<sub>1</sub>) и высвобождается из активного центра фермента.

Далее в активный центр фермента присоединяется α-кетокислота 2 (КК<sub>2</sub>), которая забирает аминогруппу от кофермента и превращается в α-аминокислоту (АК<sub>2</sub>).

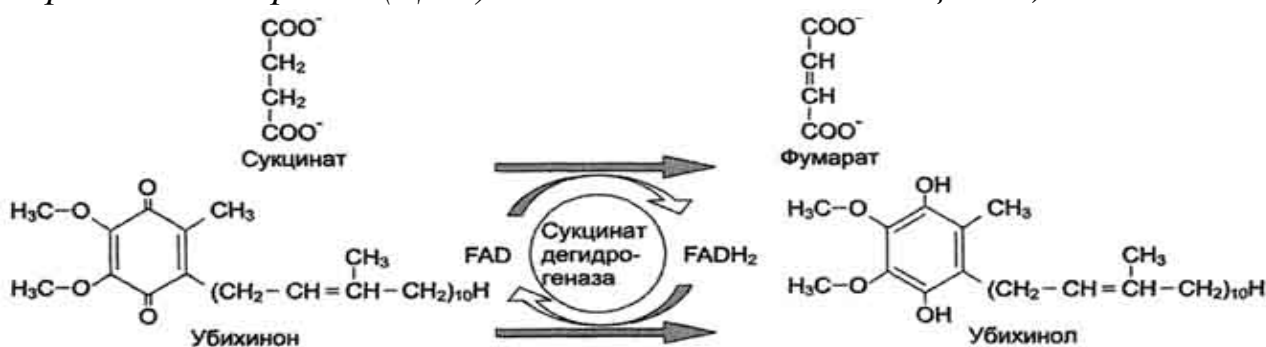


Второй пример механизма "пинг-понг" - реакции дегидрирования с участием кофермента FAD (флавинадениндинуклеотид) или FMN (флавиномононуклеотид), которые прочно связаны с ферментом и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве второго субстрата.

FMN и FAD участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, акцептируя 2 e<sup>-</sup> и 2 H<sup>+</sup> в изоаллаксазиновом кольце



В качестве примера FAD-зависимой реакции можно привести сукцинат-дегидрогеназную реакцию. В этой реакции в качестве второго субстрата участвует убихинон - один из посредников цепи переноса электронов (ЦПЭ). (\*Окисление органических веществ в клетках, сопровождающееся потреблением кислорода и синтезом воды, называют тканевым дыханием, а цепь переноса электронов (ЦПЭ) называют дыхательной цепью).



**Последовательный механизм действия коферментов** В случае последовательного механизма для протекания ферментной реакции требуется одновременно взаимодействие двух субстратов. В этом случае возможно присоединение субстратов двумя различными путями:

1-й путь - Механизм упорядоченного взаимодействия субстрата с активным центром фермента:



Первым в активный центр фермента присоединяется субстрат А, облегчая присоединение субстрата В.

После химической модификации также наблюдают определённый порядок высвобождения продуктов реакции.

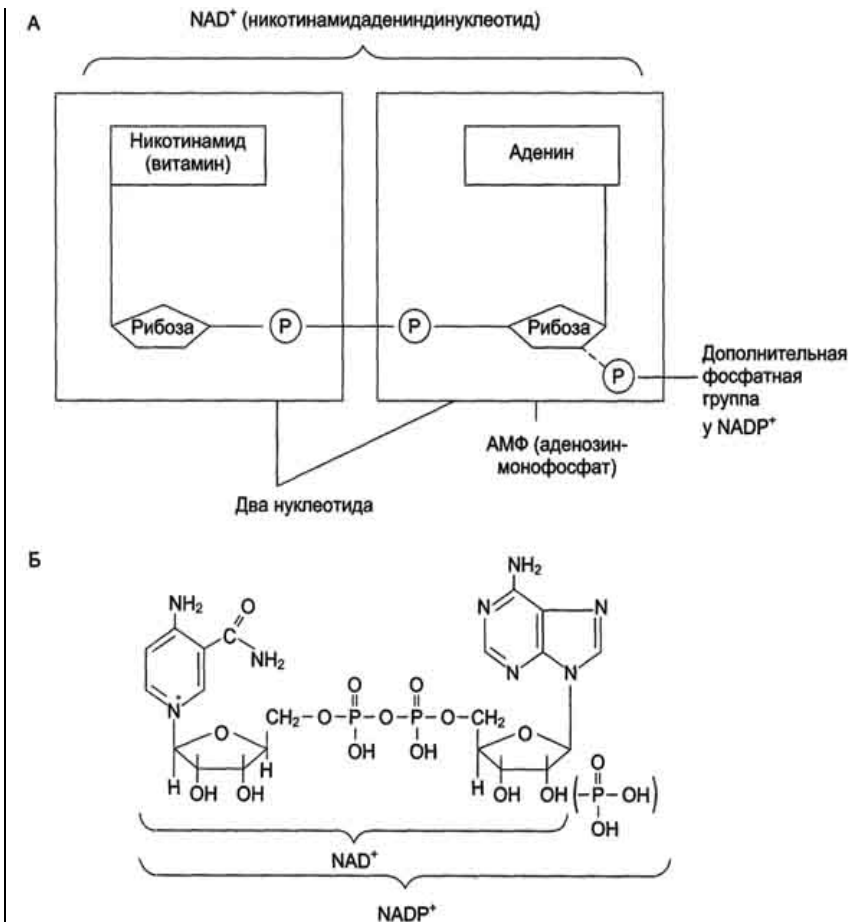
2-й путь - Механизм случайного взаимодействия субстрата с активным центром фермента:



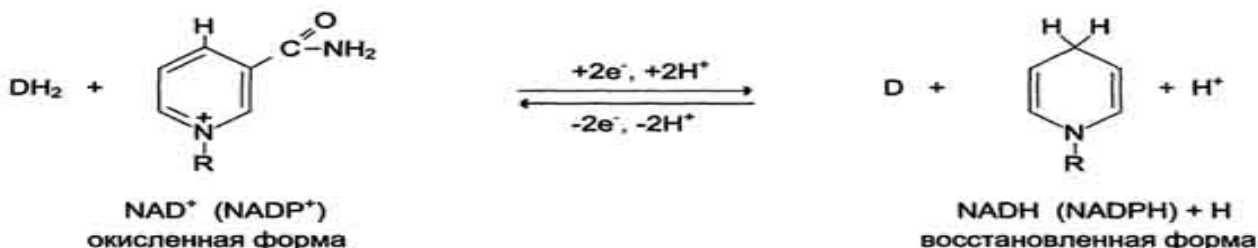
Приоритетности за взаимодействие субстратов А и В в активном центре фермента нет (каждый субстрат имеет свой центр связывания в активном центре). Также нет строгой закономерности высвобождения продуктов реакции.

Примером последовательного упорядоченного механизма может быть реакция дегидрирования с участием коферментов  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ .

На рисунке представлена схема структуры (А) и химические формулы этих коферментов представлены (Б). Оба кофермента функционируют как посредники переноса двух электронов и одного протона от донора к акцептору, другого протона - в среду.



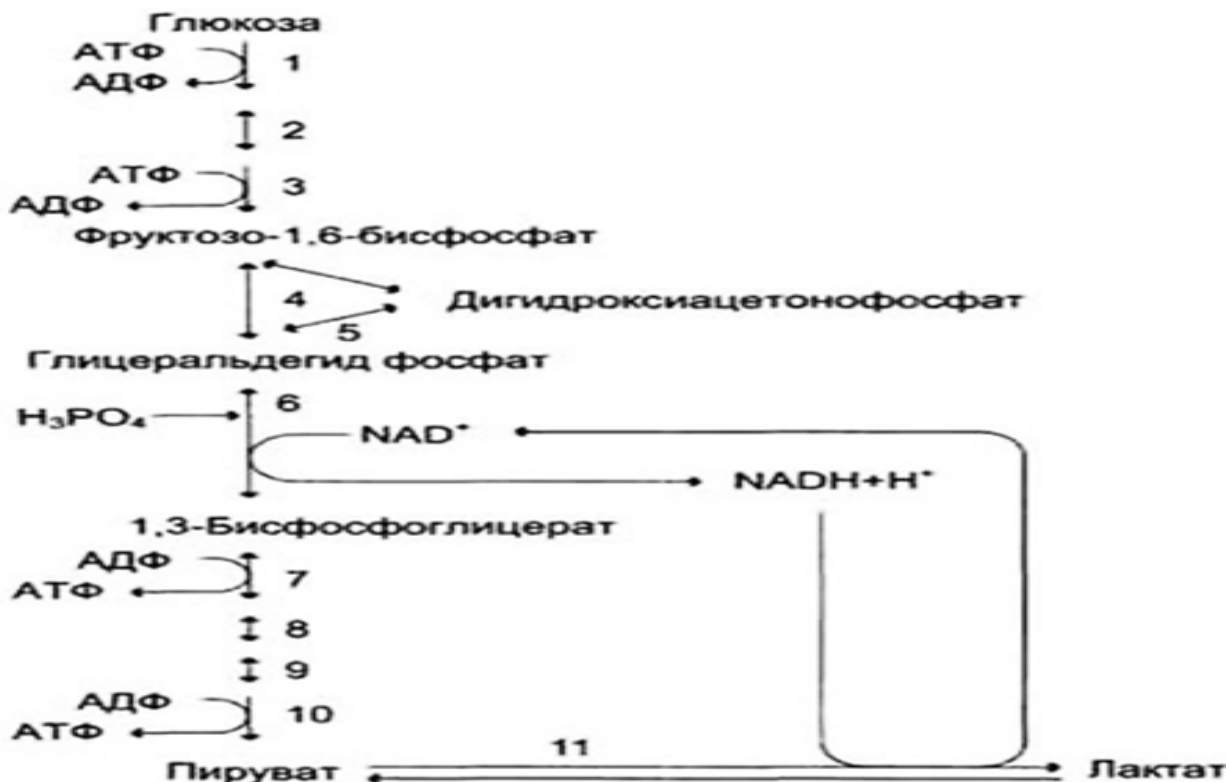
Другими словами, восстановленная форма этих нуклеотидов действует как общий пул электронов, образованный в результате окислительных реакций, и может быть использована в различных восстановительных реакциях. Такие реакции называют сопряжёнными.



Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий одну из важнейших реакций гликолиза - фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата, где  $\text{NAD}$  и  $\text{NADH}$  - соответствует окисленной и восстановленной формы кофермента никотинамидадениндинуклеотида.

Процесс гликолиза (glycys-сладкий и lysis - растворение, распад) - сложный ферментативный процесс последовательных превращений глюкозы, протекающий в тканях человека и животных без потребления кислорода.

Анаэробный гликолиз включает 11 реакций: 5- подготовительных, 5- приводящих к образованию энергии, 11-я – биосинтез лактата (молочной кислоты). Конечным продуктом анаэробного гликолиза является две молекулы лактата.



Протекает в скелетных мышцах при недостатке кислорода. Лактат не выбрасывается из организма, а возвращается из скелетных мышц в печень, окисляется в пировиноградную кислоту, которая используется на биосинтез глюкозы в процессе глюконеогенеза (цикл Кори).

Гликолиз состоит из *двух стадий*.

*Первая стадия* начинается реакцией фосфорилирования глюкозы за счет АТФ. Эта реакция, в результате которой нейтральная молекула глюкозы для участия в следующих этапах гликолиза активируется, как бы запускает в ход гликолиз. Она катализируется ферментом *гексокиназой* в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ .

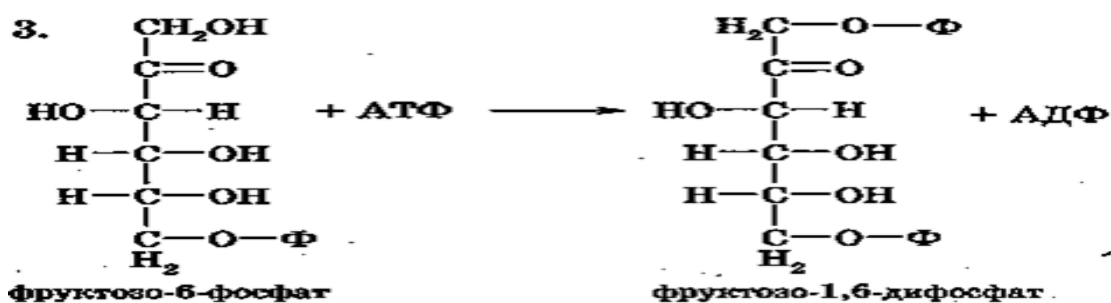


В результате фосфорилирования глюкозы образуется, глюкозо-6-монофосфат, который превращается в фруктозо-6-монофосфат. Катализирует эту реакцию *фосфоглюкоизомераза*:





На следующем этапе осуществляется второе фосфорилирование, в результате которого образуется 1,6-фруктозодифосфат. В ходе этой реакции используется еще одна молекула АТФ. Эта вторая «пусковая» реакция процесса гликолиза осуществляется при участии фермента *фосфофруктокиназы* и ионов  $Mg^{2+}$ .



Образовавшийся фруктозо-1,6-дифосфат расщепляется ферментом *альдозазой* на две фосфотриозы — диоксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат

Образованием двух фосфотриоз, которые при участии триозофосфатизомеразы могут взаимно превращаться друг в друга, заканчивается первая стадия гликолиза.

Таким образом, первая стадия гликолиза характеризуется образованием триозофосфорных эфиров. На этой стадии не происходит никаких окислительных реакций и не выделяется энергия. Наоборот, в результате фосфорилирования глюкозы и фруктозо-6-монофосфата затрачивается энергия двух молекул АТФ.

Необходимо также знать, что реакции фосфорилирования указанных субстратов протекают при помощи двух регуляторных, или аллостерических, ферментов — гексокиназы и фосфофруктокиназы. Их регуляторная роль состоит в том, что при низкой концентрации АТФ в клетке эти ферменты пускают в ход гликолиз, и наоборот, при высоком содержании АТФ гексокиназа и фосфофруктокиназа находятся в клетке в неактивном состоянии, т.е. энергия клетке в данный момент не нужна.

*Вторая стадия* гликолиза начинается реакцией окисления глицеральдегид-3-фосфата. Эта реакция является одной из наиболее важных этапов гликолиза, поскольку в результате окисления альдегидной группы

глицеральдегид-3-фосфата освобождается энергия, сохраняющаяся в форме высокоэнергетического окисленного продукта этой реакции 1,3-дифосфоглицерата. Механизм окисления глицеральдегид-3-фосфата подробно изучен. Его считают одним из наиболее важных открытий в биологии, так как впервые в истории биохимии был раскрыт ферментативный и химический механизм, с помощью которого энергия, освобождающаяся в ходе окисления органических молекул, может запасаться в молекулах АТФ и использоваться организмом.

Катализирует эту реакцию фермент *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа*, активной частью которой являются сульфгидрильная или тиоловая группа  $\text{HS—R}$ , а также кофермент  $\text{НАД}^+$ .

Процесс окисления глицеральдегид-3-фосфата и образование АТФ состоит из нескольких этапов. Сначала фермент связывается своей тиоловой группой с глицеральдегид-3-фосфатом, образуя тиоэфирное соединение, которое окисляется коферментом  $\text{НАД}^+$  (происходит отщепление двух атомов водорода и восстановление  $\text{НАД}^+$  до  $\text{НАД}\cdot\text{Н} + \text{Н}^+$ ). Энергия этого окисления сосредоточивается в карбоксил-тиоловой макроэргической связи

Образовавшееся при этом неустойчивое макроэргическое соединение взаимодействует с фосфорной кислотой.

В результате этой реакции энергия карбоксилтиоловой макроэргической связи сосредоточивается в карбоксилфосфатной макроэргической связи 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, затем передается на фосфорную кислоту, вследствие чего она становится активированной и способна вступать в реакцию фосфорилирования АДФ с образованием АТФ. Такой механизм образования АТФ носит название *субстратного фосфорилирования*, или фосфорилирования на уровне субстрата, и протекает с участием окисляющего субстрата

При помощи фермента *фосфоглицеромутазы* 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую, которая под действием *енолазы* теряет молекулу воды, превращаясь в фосфоенолпируват. Это вторая реакция в процессе гликолиза, в результате которой образуется высокоэнергетическая связь. Отщепление молекулы воды представляет собой внутримолекулярный окислительно-восстановительный процесс, сопровождающийся перераспределением энергии внутри молекулы. Она как бы сосредоточивается у второго атома углерода, где находится остаток неорганической фосфорной кислоты, вследствие чего образуется макроэргическая связь, энергия которой используется на активирование фосфорной кислоты

Под действием *пируваткиназы* остаток активированной фосфорной кислоты переносится от фосфоенолпирувата на АДФ с образованием АТФ и пировиноградной кислоты, т.е. осуществляется вторая реакция фосфорилирования АДФ на уровне субстрата.

Завершающей реакцией второй стадии, а также всего процесса гликолиза является восстановление пировиноградной кислоты до молочной под действием *лактатдегидрогеназы*. Источником атомов водорода служит восстановленная форма кофермента НАД<sup>+</sup> — НАД·Н + Н<sup>+</sup>, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата (в начале второй стадии гликолиза).

*Образованием молочной кислоты завершается вторая стадия гликолиза, а вместе с тем и весь процесс превращения глюкозы в анаэробных условиях.*

Известно, что изменение свободной энергии при расщеплении глюкозы до двух молекул молочной кислоты составляет около 210 кДж/моль, из них 126 кДж рассеивается в виде тепла, а 84 кДж накапливаются в форме богатых энергией фосфатных связей АТФ. Таким образом, КПД анаэробного гликолиза близок к 0,4 (84/210)

У плода и детей первых месяцев жизни преобладает анаэробный распад глюкозы, в связи с чем концентрация молочной кислоты в крови у них выше, чем у взрослых.

### **Контрольные вопросы**

1. Коферменты – переносчики атомов водорода и электронов: никотинамидные коферменты, флавиновые коферменты, липоевая кислота, глутатион, убихинон.
2. Коферменты – переносчики химических групп: нуклеозидфосфаты, кофермент ацетилирования, тетрагидрофолиевая кислота, пиридоксальные коферменты.
3. Коферменты синтеза, изомеризации и расщепления углерод-углеродных связей: производные тиамина, биотин, кобамидные коферменты.
4. Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента:
5. Ионы металлов - стабилизаторы молекулы субстрата,
7. Ионы металла - стабилизаторы активного центра фермента.
8. Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента
9. Роль металлов в ферментативном катализе:
10. Участие в электрофильном катализе,
11. Участие в окислительно-восстановительных реакциях
12. Роль металлов в регуляции активности ферментов.
13. Коферменты
14. Мульти-субстратные реакции.
5. Последовательный механизм.
15. Классифицируйте кофакторы по структуре (коферменты, простетические группы, ионы металлов).
16. Классифицируйте кофакторы по функциональному признаку.

17. Функции кофакторов?

18. Рассказать о кофакторах окислительно-восстановительных процессов на примере никотинамидных кофакторов.

19. Рассказать о кофакторах переноса групп на примере коферментов – производных пиридоксина.

20. Рассказать о кофакторах процессов синтеза, изомеризации и расщепления С-С связей на примере биотина.

21. В чём заключается роль металлов в функционировании ферментов?

## **Тема -8 Ферменты: Регуляция активности ферментов, локализация, классификация и номенклатура ферментов**

### **План**

1. Локализация ферментов.
2. Способы регуляции активности ферментов:
  - 2.1. Регуляция количества молекул фермента в клетке.
  - 2.2. Регуляция скорости ферментативной реакции доступностью молекул субстрата и коферментов.
3. Регуляция каталитической активности ферментов:
  - 3.1 Регуляция каталитической активности ферментов частичным (ограниченным) протеолизом
  - 3.2. Регуляция каталитической активности ферментов ассоциацией/диссоциацией протомеров
  - 3.3. Регуляция каталитической активности ферментов белок-белковыми взаимодействиями.
  - 3.4. Регуляция каталитической активности ферментов путём фосфорилирования/дефосфорилирования
4. Активация ферментов в результате присоединения регуляторных белков.
5. Аллостерическая регуляция.
6. Активность фермента. Методы определения активности.

Одним из уникальных свойств живых организмов является удивительная способность к сохранению сбалансированности:

- катаболических (биodeградативных) и
- анаболических (биосинтетических) процессов.

Важным свойством ферментов является способность проявлять активность, соответствующую потребностям клетки и всего организма. Это возможно благодаря существованию механизмов, позволяющим ферментам реагировать на изменение метаболизма в клетке и воспринимать сигналы из окружающей среды.

Повышение или понижение скорости отдельных реакций осуществляется путем изменения количества фермента (для этого требуются часы) или его активности (это происходит очень быстро) либо используются оба механизма.

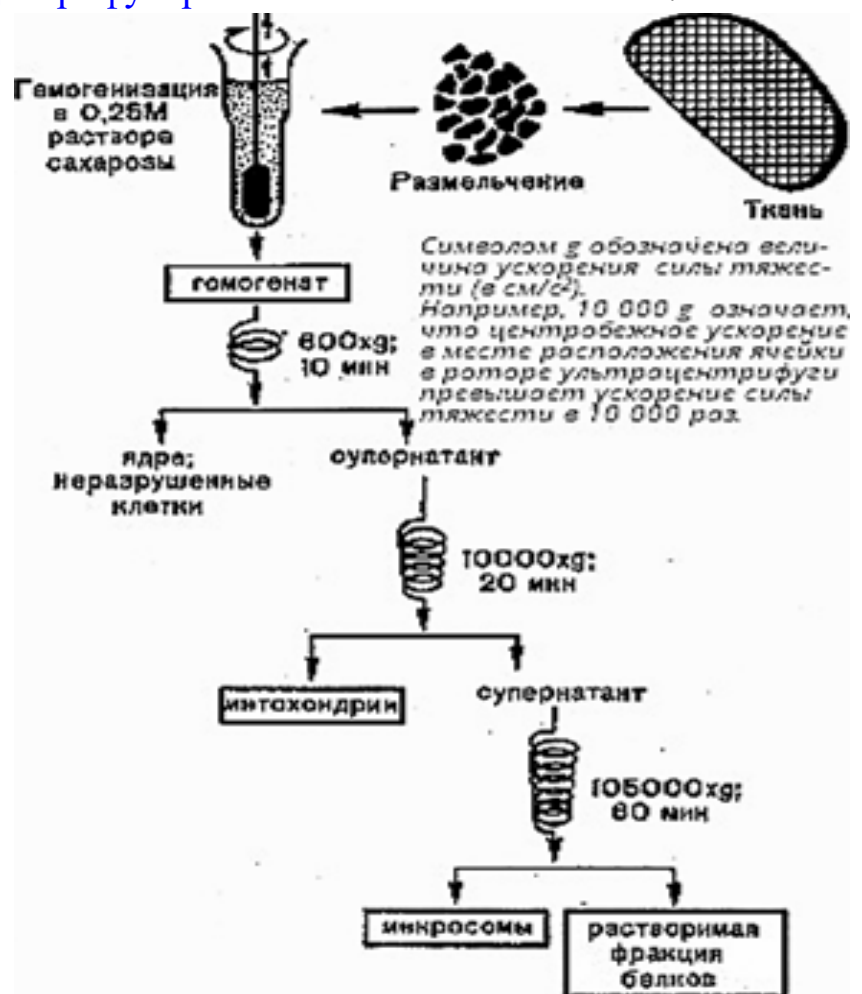
При этом в клетках одновременно совершаются процессы синтеза, распада и взаимопревращения тысяч разнообразных веществ, которые в свою очередь регулируются множеством механизмов, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма. Некоторые из этих регуляторных механизмов, среди которых важная роль принадлежит механизмам регуляции синтеза и каталитической активности ферментов, мы рассмотрим в данной лекции.

**Локализация ферментов.** Функциональная особенность ферментов тесно взаимосвязана с локализацией их в клетках тканей и органов.

Вопрос о локализации ферментов в структурных образованиях клетки (ядро, митохондрии, лизосомы и др.) является чрезвычайно важным, особенно в препаративной энзимологии, когда перед исследователем поставлена задача изолировать и выделить фермент в чистом виде. Сравнительно легко обнаружить локализацию фермента методами цито- и гистохимии. Для этого тонкие срезы ткани органа инкубируют с соответствующими субстратами и после инкубации локализацию продукта реакции устанавливают добавлением подходящих реактивов до появления специфической окраски.

Для выделения органелл в препаративной энзимологии используют метод дифференциального центрифугирования гомогенатов тканей:

На первом этапе разрушают клеточную структуру с помощью дезинтегратора (гомогенизатора). Полученную квазиоднородную (гомогенизированную) массу подвергают дифференциальному центрифугированию при температуре 0–4°C. Обычно распределение ферментов изучают в последовательных индивидуальных фракциях, изолированных при дробном центрифугировании гомогенатов, в частности



-во фракции ядер, которую получают при низкой скорости **центрифугирования**,

-во фракции **митохондрий**, которая осаждается при средней скорости **центрифугирования**,

-во фракции микросом (или рибосом), для изолирования которой требуется высокая скорость **центрифугирования**, и,

-в оставшейся прозрачной надосадочной **жидкости** (супернатант), которая представляет собой растворимую фракцию **цитоплазмы**.

Следует отметить, что фракция **митохондрий** не является гомогенной, поскольку из нее удастся изолировать частицы, известные как **лизосомы**, размер которых занимает промежуточное место между размерами **митохондрий** и микросом. В свою очередь микросомальная фракция также является гетерогенной, поскольку состоит в основном из элементов эндоплазматической сети неоднородного строения.

При помощи метода фракционирования гомогенатов органов и **тканей** было показано, что ядерная фракция **печени** и почек содержит незначительное число **ферментов**, хотя известно, что в ядрах осуществляется синтез некоторых **белков и ДНК**. Основное место **синтеза белка**, – фракция рибосом **цитоплазмы**. Показано, что **ферменты гликолиза** сосредоточены преимущественно в растворимой фракции **цитоплазмы**, в то время как **цитохромоксидаза** и **ферменты цикла Кребса** локализованы во фракции **митохондрий**. С **митохондриями** связаны также **ферменты**, катализирующие окислительное фосфорилирование и распад **жирных кислот**. **Ферменты**, катализирующие **биосинтез жирных кислот**, наоборот, содержатся в растворимой фракции **цитоплазмы**. Для изолирования и выделения **ферментов** из биологических объектов в чистом (гомогенном) состоянии используют целый арсенал **методов выделения белков** в индивидуальном виде

Организованная последовательность процессов обмена возможна при условии что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов.

Следует отметить, что *активность ферментов в клетке непостоянна во времени. Ферменты чутко реагируют на ситуацию, в которой оказывается клетка*, на факторы, воздействующие на нее как снаружи, так и изнутри.

*Главная цель такой чувствительности ферментов – отреагировать на изменение окружающей среды, приспособить клетку к новым условиям, дать ответ на гормональные и иные стимулы, а в некоторых ситуациях – получить шанс выжить.*

**Способы регуляции активности ферментов.** Абсолютное количество присутствующего в клетке фермента регулируется временем его синтеза и распада.

К регуляторным механизмам относятся:

- конкуренция ферментов за общий субстрат,
- выключение активности одного из изоферментов (у множественных форм ферментов),
- влияние концентраций кофакторов и
- явление компартиментализации.

Доступность субстрата или кофермента или влияние закона действия масс. В катализируемой ферментом обратимой химической реакции, например,  $A + B \rightleftharpoons C + D$ , концентрация компонентов реакции и соответственно направление реакции будут регулироваться влиянием *закона действия масс* - фундаментального закона химической кинетики, который говорит: *при постоянной температуре скорость химической реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ.*

Таким образом, изменение количества хотя бы одного из субстратов прекращает или начинает реакцию. Это было показано на примере обратимой реакции трансаминирования, катализируемой ферментом аланинаминотрансферазой: **Аланин+ $\alpha$ -Кетоглутарат $\rightleftharpoons$ Пируват+Глутамат**

Этот тип регуляции играет, ограниченную роль, поскольку в реальных условиях реакция обычно протекает в одном направлении, так как образовавшиеся продукты могут оказаться субстратами для действия других ферментов и выводиться из сферы реакции. В этих случаях устанавливается скорее устойчивое (стационарное) состояние, чем истинное равновесие.

Второй пример *закона действия масс* – который говорит, что изменение количества хотя бы одного из субстратов прекращает или начинает реакцию.- это пример функционирования цикла трикарбоновых кислот.

Для цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) таким субстратом является **оксалоацетат** (щавелевоуксусная кислота). Наличие оксалоацетата "подталкивает" реакции цикла, что позволяет вовлекать в окисление молекулы ацетил-SКоА.

Из-за недостатка оксалоацетата при голодании и инсулинзависимом сахарном диабете развивается опасное для жизни состояние - **кетацидоз**.



*Компартиментализация* – это сосредоточение ферментов и их субстратов

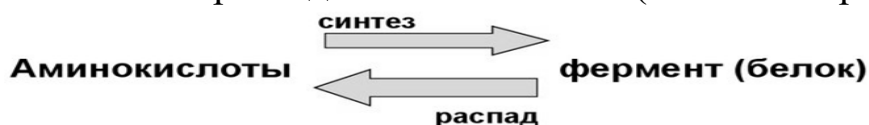
в одном компартменте (одной органелле) – в эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, лизосомах, ядре, плазматической мембране и т.п.

Механизм компартиментализации метаболических процессов играет, по-видимому, важную биологическую роль, пространственно разъединяя с помощью биомембран ферменты со своими субстратами (например, лизосомальные ферменты: протеиназы, фосфатазы, рибонуклеазы и другие гидролитические ферменты – с цитоплазматическими веществами, на которые они действуют). Кроме того, облегчая независимую регуляцию, этот механизм позволяет разделить несовместимые в одном и том же месте (и, возможно, в одно и то же время) метаболические процессы.

Примером последних могут быть пути синтеза высших жирных кислот, протекающие в основном в растворимой фракции цитоплазмы, и пути распада (окисления) жирных кислот. Например, ферменты цикла трикарбоновых кислот и  $\beta$ -окисления жирных кислот расположены в митохондриях, ферменты синтеза белка расположены в рибосомах. Необходимо указать, однако, что при компартиментализации возникает проблема транспорта как метаболитов, так и восстановительных эквивалентов через биомембраны субклеточных органелл.

Эту задачу решает так называемый *челночный механизм*, позволяющий перевод метаболитов в формы, способные переходить через мембраны, и обеспечивающий внутриклеточный гомеостаз.

*Изменение количества фермента.* Изменение количества фермента может происходить в результате увеличения или снижения его синтеза, т.е. количество ферментов определяется соотношением скоростей двух процессов - синтеза, фолдинга белка и распада белков в клетке (тканевый протеолиз:



Синтез и фолдинг регулируются на разных этапах. Наиболее изучен механизм на уровне транскрипции (индукция-активация; репрессия-угнетение). Регуляция осуществляется метаболитами, гормонами и др., например:

-исчезновение *пищеварительных ферментов* при длительном голодании и их появление в восстановительный период (в результате изменения секреции кишечных гормонов),

-при беременности и после родов в молочной железе активно идет синтез фермента *лактозосинтазы* под воздействием лактотропного гормона,

-гормоны глюкокортикоиды стимулируют синтез ферментов *глюконеогенеза*, что обеспечивает стабильность концентрации глюкозы в крови и устойчивость



ЦНС к стрессу,

-токсические субстраты этанол, барбитураты стимулируют в печени синтез "своего" изофермента *цитохрома P<sub>450</sub>*, который окисляет и обезвреживает эти вещества.

На бактериях хорошо изучен феномен индуцированного синтеза ферментов при выращивании их на среде, где единственным источником углерода и энергии служит тот или иной углевод, например глюкоза. Замена в среде глюкозы на лактозу (индуктор) приводит к *индуцированному или адаптивному* (после небольшого периода лаг-фазы) синтезу фермента галактозидазы (программированному лактозным геном), расщепляющей лактозу на глюкозу и галактозу.

В клетках прокариот и эукариот имеются ферменты, концентрация которых не требует добавления индуктора - это *конститутивные ферменты*.

Количество фермента в клетке зависит от наличия продукта реакции, которая катализируется данным ферментом, причем продукт реакции вызывает торможение синтеза фермента в результате репрессии.

В животных тканях *быстрый синтез ферментов* наблюдается реже. Механизм *индуцирующего синтеза* изучен только для небольшого числа ферментов:

- тирозинтрансаминазы,
- серин- и треониндегидратазы,
- триптофанпирролазы и др. – происходит это в ответ на введение гормонов или прием белковой пищи.

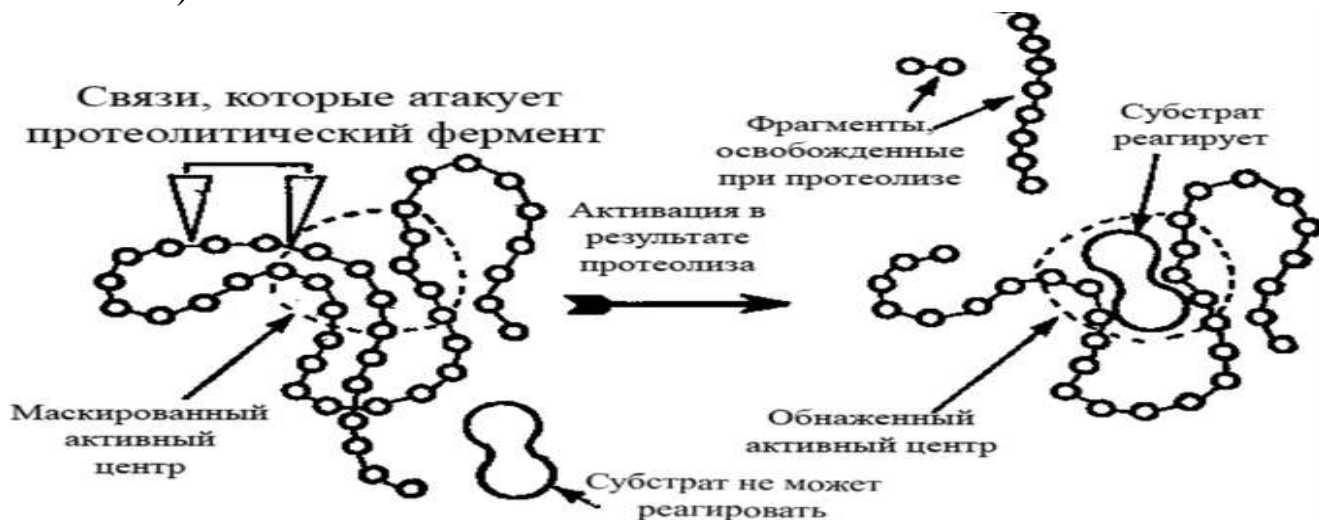
Однако при поступлении в организм некоторых ядов, канцерогенных веществ, алкалоидов, инсектицидов через несколько дней наблюдается резкое повышение активности (*соответственно количества*) ферментов-гидроксилаз (монооксигеназ) эндоплазматической сети клеток печени, окисляющих чужеродные вещества в нетоксичные для организма продукты. Предполагают, что в этих случаях имеет место синтез ферментов путем индукции (т.е. *de novo*).

Описаны случаи, когда под действием подобных гидроксилаз чужеродные вещества превращаются в организме в более токсичные соединения. Это явление, обратное детоксикации, получило название летального синтеза.

*Ограниченный (частичный) протеолиз проферментов.* Целый ряд ферментов вырабатывается клетками организма в каталитически неактивной форме в виде проферментов, т.е. зимогенов. Ограниченный (частичный) протеолиз *проферментов* подразумевает, что синтез некоторых ферментов осуществляется в виде *более крупного предшественника* и при поступлении в нужное место этот фермент активируется через отщепление от него одного или

нескольких пептидных фрагментов. Подобный механизм защищает внутриклеточные структуры от повреждений.

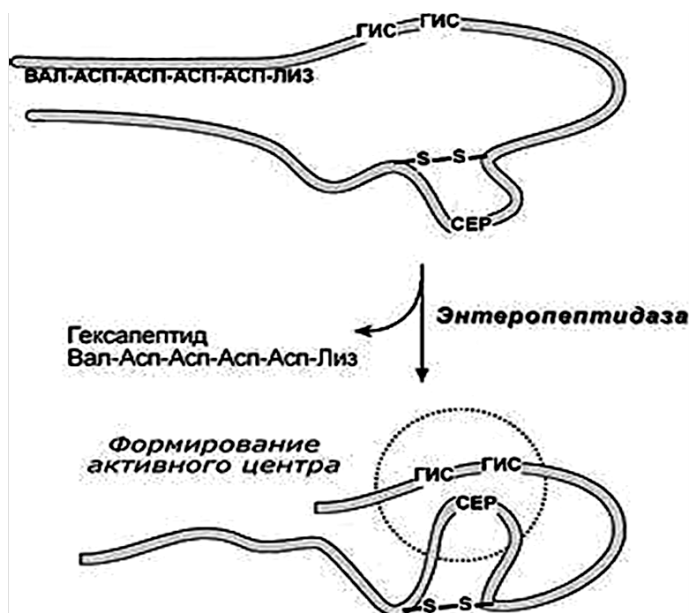
Примером служит активация протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (трипсиноген, пепсиноген, прокарбоксипептидазы), факторов свертывания крови, лизосомальных ферментов (например, катепсины).



Активация профермента происходит путем отщепления от него пептида. В результате отщепления пептида изменяется первичная структура, молекулярная масса, конформация фермента и его активного центра, повышается сродство к субстрату и скорость ферментативной реакции.

Например, трипсин в поджелудочной железе синтезируется в форме неактивного предшественника трипсиногена.

В кишечнике происходит отщепление с N-конца молекулы трипсиногена гексапептида под действием энтеропептидазы. Фермент из неактивной формы переходит в активную. При этом изменяется первичная структура, мМ, конформация фермента. Формируется активный центр. Синтез пептидаз в неактивной форме предотвращает их разрушающее действие на клетки органов, в которых они образуются.



Регуляция распада (протеолиз) менее изучена, но также на генетическом уровне. Например, регуляции баланса трипсиноген/трипсин в поджелудочной железе.

В поджелудочной железе поддерживается тонкий баланс между трипсиногеном и его активированной формой – трипсином. Конверсия трипсиногена в трипсин внутри поджелудочной железы может приводить к панкреатиту. Высокий уровень катионного трипсиногена (кодируемого геном PRSS1), высокий уровень кальция и низкий pH способствуют переходу трипсиногена в трипсин.

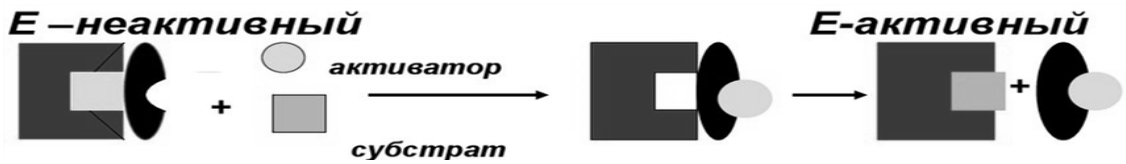
Регуляция уровня кальция осуществляется, в частности, кальций-чувствительным рецептором (который кодируется геном CASP), к дисрегуляции может приводить воздействие этанола. Активирующие мутации в PRSS1 или инактивирующие мутации в CASP могут приводить к повышению уровня трипсина, а этанол может играть роль триггерного фактора для развития панкреатита, вызывая повышение уровня кальция.

Трипсин элиминируется двумя путями: экскрецией через панкреатические протоки и деградацией. Деградации трипсина способствует химотрипсин С (кодируемый геном CTSC). Работа муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (который кодируется геном CFTR) облегчает прохождение панкреатического сока через протоки, таким образом, способствуя элиминации трипсина.

Инактивирующие мутации в любом из этих генов приводят к повышению уровня трипсина в поджелудочной железе. Вызванный избытком трипсина воспалительный процесс через регуляторные системы ведет к повышению уровня ингибитора сериновой протеазы типа 1 Kazal (кодируемой геном SPINK1), который подавляет активность трипсина, предотвращая, таким образом, дальнейшую активацию трипсиногена и ограничивая повреждение ткани.

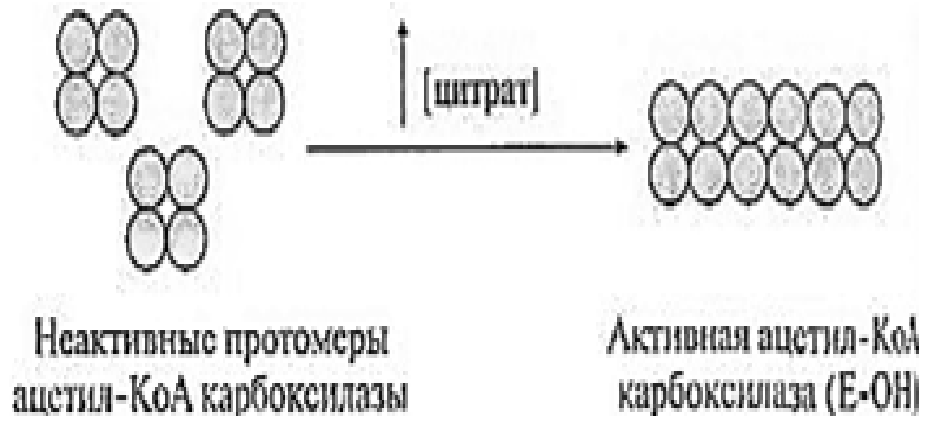
Мутации в этом гене увеличивают восприимчивость к панкреатиту у людей, имеющих мутации в других вышеперечисленных генах, особенно в CFTR (см. *New England Journal of Medicine*, октябрь 2011, №20).

*Регуляция активности путем ассоциации-диссоциации.* Ферменты - олигомерные белки: состоят из каталитических (с активным центром) и регуляторных протомеров (центр связывания с эффектором). Диссоциация (ковалентная химическая модификация - обратимая): в состоянии «покоя» (неактивная) структура молекулы фермента представлена комплексом этих субъединиц. В этом состоянии активный центр закрыт регуляторными протомерами, т.е. комплекс неактивный. Активатор связывается с регуляторными единицами - комплекс диссоциирует и активный центр открывается:



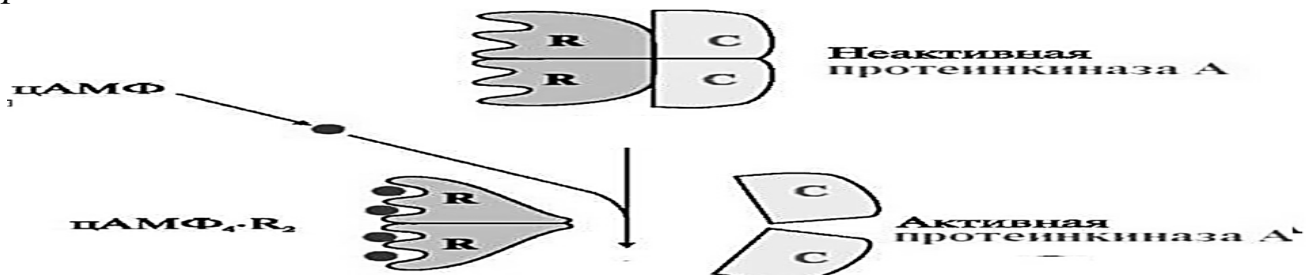
Регуляция активности путем ассоциации-диссоциации протомеров ацетил-КоА-карбоксилазы. В тканях присутствуют ферменты, которые в неактивной форме представлены отдельными комплексами, состоящими из нескольких протомеров, например ацетил-КоА карбоксилаза. При увеличении в клетке концентрации специфических регуляторных молекул они присоединяются к определенным центрам протомеров.

Изменение их конформации, вызванное присоединением лигандов, повышает их сродство друг к другу и стимулирует ассоциацию, т.е. образование активной формы фермента.



Веществом, которое изменяет конформацию комплексов, является цитрат. При повышении его концентрации в цитозоле клетки 3 тетрамера объединяются в олигомер из 12 протомеров – активную форму ацетил-КоА карбоксилазы.

*Белок-белковое взаимодействие* или регуляция путем ассоциации-диссоциации субъединиц в олигомерном ферменте. Термин «белок-белковое» взаимодействие обозначает действие, когда в качестве регулятора выступают специфичные белки. В целом ситуация схожа с аллостерическим механизмом: *после влияния каких-либо факторов на специфичные белки изменяется активность этих белков, и они, в свою очередь, воздействуют на нужный фермент.* Пример белок-белкового взаимодействия - регуляция активности протеинкиназы А.



В результате диссоциации неактивной протеинкиназы, под действием активатора -цАМФ протеинкиназа активируется.

Регуляция активности фермента путем ковалентной (химической) модификации (фосфорилирование/дефосфорилирование). Ковалентная модификация заключается в обратимом присоединении или отщеплении определенной группы, благодаря чему изменяется активность фермента. Такой группой является фосфорная кислота, реже метильные и ацетильные группы. Обычно различают обратимую ковалентную и не ковалентную химические модификации ферментов.

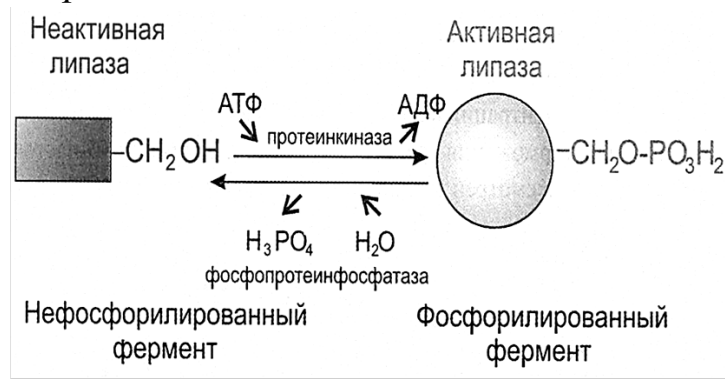
Фосфорилирование фермента происходит через ОН-группы серина. Модификации подвергается ОН-группа аминокислоты в составе фермента. К ОН-группе присоединяется фосфат (или, наоборот, отщепляется фосфат)



Фосфорилирование белков осуществляют ферменты *протеинкиназы*, относящиеся к классу трансфераз. Они катализируют образование сложноэфирной связи между фосфатной группой и ОН-группой аминокислотных остатков серина, треонина или тирозина. Донором фосфатной группы чаще всего является АТФ. Дефосфорилирование – реакцию, обратную фосфорилированию, катализируют ферменты *протеинфосфатазы*, относящиеся к классу гидролаз. Активность протеинкиназ и протеинфосфатаз регулируется гормонами.

*Активация ферментов фосфорилированием.*

Триацилглицерол-липаза (ТАГ-липаза) – фермент жировой ткани. В дефосфорилированной форме фермент неактивен. Под действием протеинкиназы А (ПКА) фермент фосфорилируется и переходит в активную форму

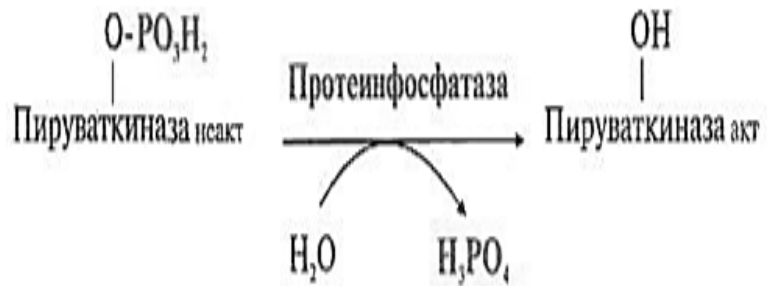


В результате фосфорилирования происходят изменение заряда, конформации фермента и конформации активного центра фермента. Повышается сродство фермента к субстрату и возрастает скорость ферментативной реакции.

*Активация ферментов дефосфорилированием.*

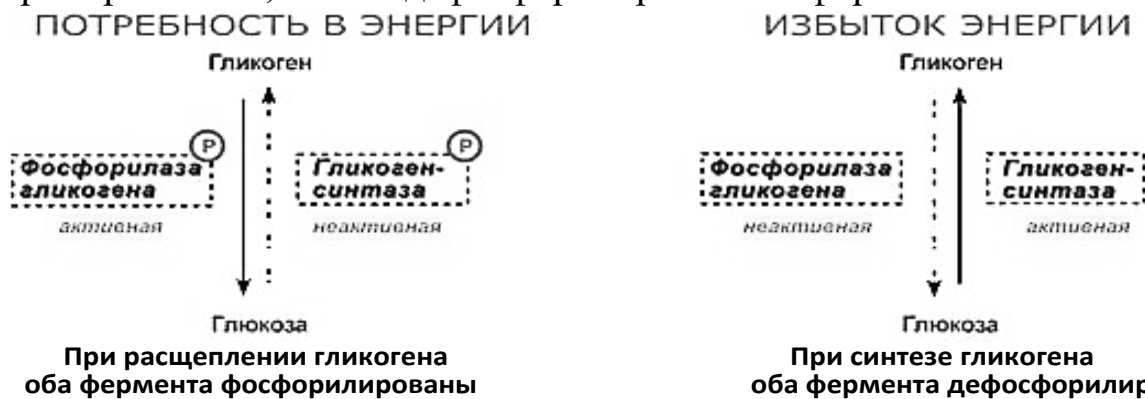
Для некоторых ферментов, обеспечивающих метаболизм глюкозы, холестерина или гликогена, фосфорилированная форма является неактивной.

Например, фермент пируваткиназа, участвующий в катаболизме глюкозы, переходит в активную форму только после отщепления фосфорного остатка. Поэтому



в данном случае фосфорилирование вызывает снижение активности, а дефосфорилирование – повышение активности фермента

Итак, ферменты могут быть активны как в фосфорилированном, так и в дефосфорилированном состоянии. в одной клетке *не* могут идти одновременно синтез и распад гликогена – это противоположные процессы с совершенно с разными задачами. Синтез и распад исключают друг друга или, по-другому, они реципрокны. Активность ключевых ферментов метаболизма гликогена гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы изменяется в зависимости наличия в составе фермента фосфорной кислоты – они активны либо в фосфорилированной, либо в дефосфорилированной форме.



Ферменты гликогенфосфорилаза и гликогенсинтаза при потребности организма в глюкозе фосфорилируются:

- при этом фосфорилаза гликогена становится **активной** и начинает расщепление гликогена, а
- гликогенсинтаза **не активна**.

При необходимости синтеза гликогена оба фермента дефосфорилируются, синтаза при этом становится активной, фосфорилаза – неактивной.

*Активация ферментов в результате присоединения регуляторных белков.* Этот тип регуляции можно рассмотреть на примере активации фермента аденилатциклазы, локализованной в плазматической мембране клетки. Активный центр аденилатциклазы локализован на цитоплазматической стороне плазматической мембраны. Активированная аденилатциклаза катализирует реакцию образования из АТФ циклического 3',5'-АМФ (цАМФ) - вторичного, внутриклеточного посредника действия гормонов. В мембране аденилатциклаза функционирует в комплексе с другими белками:

- рецептором гормона, выступающего во внеклеточную среду и взаимодействующего с гормонами;

- с G-белком, занимающим промежуточное положение между рецептором и ферментом аденилатциклазы. G-белок - олигомерный белок, состоящий из 3 субъединиц -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .  $\alpha$ -Субъединица имеет центр связывания и расщепления ГТФ. Поэтому этот белок называется ГТФ-связывающим белком, или G-белком. В результате связывания гормона с рецептором происходит изменение конформации G-белка, уменьшение его сродства к молекуле ГДФ, с которой он связан в отсутствие гормонального сигнала, и увеличение сродства к ГТФ. Присоединение ГТФ вызывает конформационные изменения в G-белке и диссоциацию его на субъединицы: субъединицу  $\alpha$ , связанную с ГТФ ( $\alpha$ -ГТФ), димер  $\beta\gamma$ .

$\alpha$ -ГТФ имеет высокое сродство к аденилатциклазе, его присоединение приводит к активации последней, поэтому  $\alpha$ -ГТФ – это регуляторный белок, а данный механизм активации аденилатциклазы называют активацией ферментов в результате присоединения регуляторных белков.

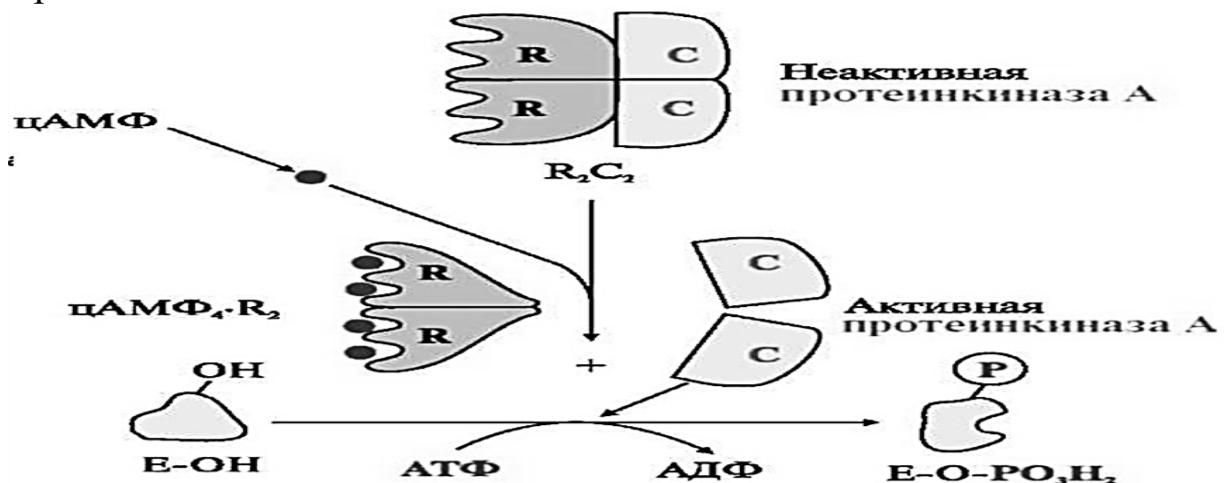
При активации аденилатциклазы происходят следующие этапы:

1 -изменение конформации рецептора после присоединения к нему сигнальной молекулы и увеличение его сродства к регуляторному G-белку. В результате образуется комплекс рецептора и протомеров G-белка;

2 -образование этого комплекса приводит к изменению конформации  $\alpha$  - протомера G-белка, который теряет сродство к ГДФ и происходит замена ГДФ на ГТФ. В результате комплекс протомеров G-белка распадается;

3 - $\alpha$  - протомер взаимодействует с аденилатциклазой, что ведет к изменению ее конформации и как следствие этого - активации;

4 - после этого аденилатциклаза катализирует синтез цАМФ, который в свою очередь активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу. Активация последней связана с диссоциацией комплекса входящих в нее протомеров после присоединения цАМФ.



Таким образом, за присоединение фосфата отвечает протеинкиназа, за отщепление фосфопротеинфосфата, их эффектом является гормон. Протеинкиназа фосфорилируя соответствующие ферменты, изменяет их активность и, следовательно, скорость метаболизма в клетке. Данный пример показывает, что регуляция активности молекулы фермента (т.е. протеинкиназы) путем ассоциации/диссоциации происходит с последующей активацией фосфорилированием (фермент фосфоридаза).

### **Аллостерическая регуляция. Автономная саморегуляция ферментативных процессов**

Существуют различные механизмы регуляции процессов, протекающих в организме:

1) Самый молодой уровень филогенетически - нейрогуморальная регуляция (с участием центральной нервной системы, классических гормонов и гормонов местного действия)

2) Регуляция на генетическом уровне - изменение скорости биосинтеза белка.

3) Филогенетически наиболее старый уровень - автономная саморегуляция ферментов.

Автономная саморегуляция - это регуляция, которая происходит благодаря самим участникам реакции, то есть за счет фермента, его субстрата (или субстратов) и/или продуктов деятельности данного фермента. Фермент не только работает, но еще и сам себя регулирует.

Механизмы автономной саморегуляции очень многочисленны, но построены на двух основных принципах.

1) Механизмы, основанные на кинетических свойствах фермента, количественно характеризующихся  $K_m$  и  $V_{max}$  - это механизмы кинетического типа.

2) Второй принцип связан с аллостерическими свойствами фермента, то есть со способностью фермента угнетаться или активироваться под действием субстрата и/или продуктов. Это механизмы аллостерического типа

*Общий принцип.* Фермент изменяет активность с помощью нековалентно связанного с ним эффектора. Связывание происходит в участке, пространственно удаленном от активного (каталитического) центра. Это связывание вызывает конформационные изменения в молекуле белка, приводящие к изменению определенной геометрии каталитического центра.

Активность может:

- увеличиться - это активация фермента, или
- уменьшиться - это ингибирование.



«Сообщение» о присоединении аллостерического активатора передается посредством конформационных изменений каталитической субъединице, которая становится комплементарной субстрату, и фермент «включается». При удалении активатора фермент вновь переходит в неактивную форму и «выключается».



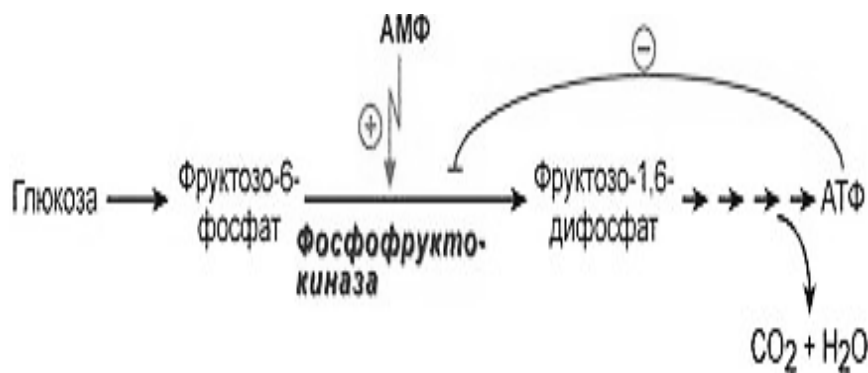
Аллостерические ферменты построены из двух и более субъединиц: одни субъединицы содержат каталитический центр, другие имеют аллостерический центр и являются регуляторными. Присоединение эффектора к аллостерической (регуляторной) субъединице изменяет конформацию белка и, соответственно, активность каталитической субъединицы.

Аллостерические ферменты обычно стоят в начале метаболических путей, и от их активности зависит течение многих последующих реакций. Поэтому они часто называются **ключевыми ферментами**.



Во многих строго биосинтетических реакциях основным типом регуляции скорости многоступенчатого ферментативного процесса является *ингибирование по принципу обратной связи*.

Это означает, что *конечный продукт реакции подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию синтеза, которая является ключевой.*



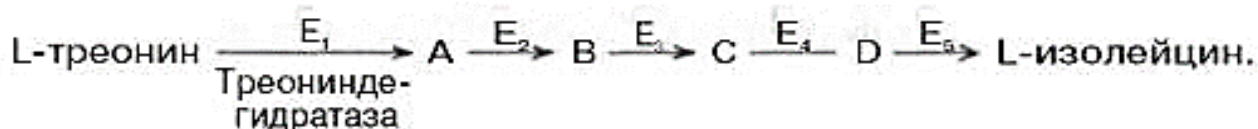
Поскольку конечный продукт структурно отличается от субстрата, он связывается с аллостерическим (т.е. некаталитическим) центром молекулы фермента, вызывая ингибирование всей цепи синтетической реакции.

Предположим, что в клетках осуществляется многоступенчатый биосинтетический процесс, каждая стадия которого катализируется собственным ферментом:

Скорость подобной суммарной последовательности реакций в значительной степени определяется концентрацией конечного продукта P, накопление которого выше допустимого уровня оказывает мощное ингибирующее действие на первую стадию процесса и соответственно на фермент E<sub>1</sub>.

Впервые существование аллостерического механизма контроля активности ферментов метаболитами было обнаружено у E.coli при исследовании синтеза изолейцина и ЦТФ.

Оказалось, что изолейцин, являющийся конечным продуктом синтеза, избирательно подавляет активность треониндегидратазы, катализирующей первую стадию последовательного процесса превращения треонина в изолейцин, насчитывающего пять ферментативных реакций:



Аналогично ЦТФ как конечный продукт биосинтетического пути оказывает ингибирующий эффект на первый фермент (аспартат-карбамоил-трансферазу), регулируя тем самым свой собственный синтез). Этот тип ингибирования получил название *ингибирования по принципу обратной связи, или ретроингибирования*. Существование его доказано во всех живых организмах. В настоящее время он рассматривается как один из ведущих типов регуляции активности ферментов и клеточного метаболизма в целом.

С другой стороны, в амфиболических процессах, выполняющих одновременно биосинтетические и биodeградативные функции, доказано существование *регуляции* как по типу *ретроингибирования*, так и *макроэргическими соединениями – индикаторами энергетического состояния клетки*. Для амфиболических процессов уникальным типом регуляции, свойственным только им, является *активация предшественником*, когда первый метаболит в многоступенчатом пути активирует фермент, катализирующий последнюю стадию.

Так, доказано активирующее влияние глюкозо-6-фосфата, являющегося предшественником гликогена, на фермент гликогенсинтазу. Подобные типы ингибирования конечным продуктом и активирования первым продуктом свойственны аллостерическим (регуляторным) ферментам, когда эффектор, модулятор, структурно отличаясь от субстрата, связывается в особом

(аллостерическом) центре молекулы фермента, пространственно удаленном от активного центра.

Следует иметь в виду, что модуляторами аллостерических ферментов могут быть как активаторы, так и ингибиторы.

Если после присоединения эффектора сродство активного центра фермента к субстрату повышается, то эффектор называется аллостерическим активатором, если сродство понижается, то эффектор называется аллостерическим ингибитором.

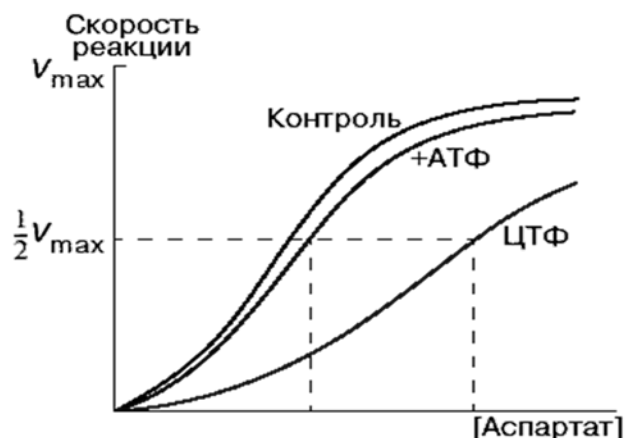
Различают гомотропную и гетеротропную аллостерическую регуляцию. В случае *гомotropной* регуляции эффектором является субстрат. У таких ферментов аллостерический центр по своей конформации совпадает с активным, а роль аллостерического эффектора фермента выполняет молекула субстрата. Взаимодействие субстрата с активным центром одной из субъединиц аллостерического фермента повышает сродство остальных субъединиц к субстрату. Это напоминает связывание молекулы гемоглобина с кислородом.

В случае *гетеротропной* регуляции эффектор отличается от субстрата и аллостерический центр не совпадает с активным центром. Примером может служить регуляция биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.



Начальную реакцию этого метаболического пути катализирует фермент аспартат-карбамоил-трансфераза (АКТ-аза). Конечный продукт цепи реакций – цитидинтрифосфат (ЦТФ) является аллостерическим ингибитором АКТ-азы. При увеличении концентрации ЦТФ сродство фермента к субстратам снижается, хотя максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) остаётся неизменной.

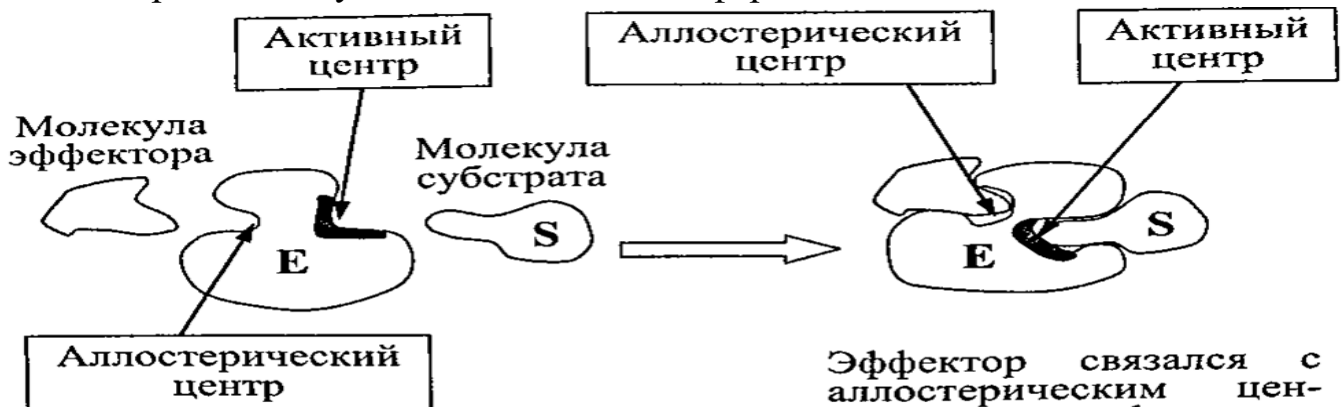
График зависимости активности от концентрации при этом смещается вправо. В этом случае  $V_{max}$  может быть достигнута при более высокой концентрации субстрата (аспартата). Ингибирующее действие ЦТФ может быть снято добавлением АТФ (субстратом промежуточных реакций биосинтеза).



Таким образом, при накоплении ЦТФ в клетке скорость синтеза пиримидиновых нуклеотидов снижается. Так фермент обеспечивает постоянное присутствие в клетке нужных количеств цитидинтрифосфата.

Наследующем рисунке представлена схема:

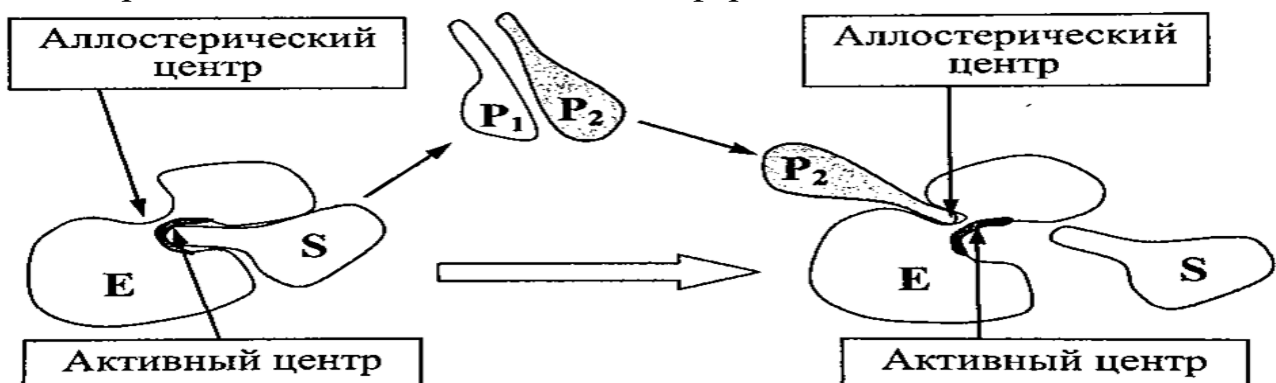
- аллостерического усиления активности фермента:



Молекула эффектора не связана с аллостерическим центром и конформация активного центра не позволяет ему связываться с субстратом – фермент не работает

Эффектор связался с аллостерическим центром, конформация активного центра изменилась так, что он стал способен связываться с субстратом – активность фермента возрастает

- аллостерического снижения активности фермента:



Молекула эффектора не связана с аллостерическим центром, активный центр связывается с субстратом – активность фермента высокая

Эффектор (продукт реакции или другая молекула) связывается с аллостерическим центром, конформация активного центра меняется, и он не связывается с субстратом – активность фермента падает

Присоединение отрицательного эффектора к аллостерическому центру вызывает значительные изменения конфигурации активного центра молекулы фермента, в результате чего фермент теряет сродство к своему субстрату (образуется неактивный комплекс).

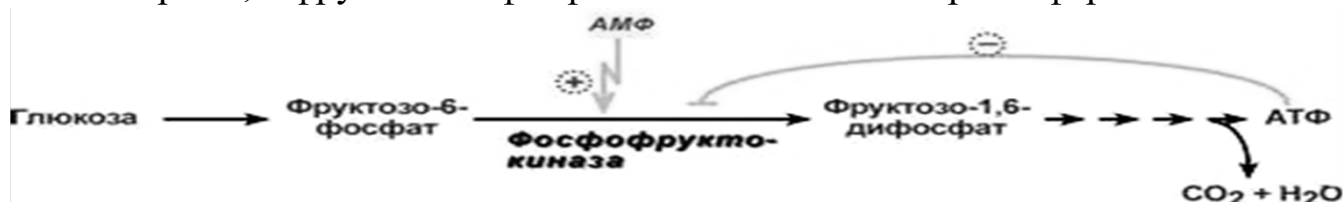
В качестве отрицательного регулятора может выступать конечный метаболит биохимического процесса или продукт данной реакции, т.е. включается механизм обратной отрицательной связи. Если регуляторами

являются начальным метаболитом или субстратом реакции, то говорят о прямой регуляции, она может быть как положительной, так и отрицательной.

Также регулятором могут быть метаболиты биохимических путей, связанных с данной реакцией.

Например, фермент энергетического распада глюкозы, *фосфофруктокиназа*, регулируется промежуточными и конечными продуктами этого распада.

При этом АТФ, лимонная кислота, фруктозо-1,6-дифосфат являются ингибиторами, а фруктозо-6-фосфат и АМФ – активаторами фермента.



В регуляции синтеза холестерина ингибитором ключевого фермента гидрокси-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-редуктаза) является сам холестерин, что быстро и точно регулирует его количество в клетке.

Регуляция синтеза холестерина осуществляется по принципу обратной связи: холестерин угнетает синтез оксиметил-глутарил-КоА-редуктазы (ОМГ-редуктазы)



ОМГ-редуктаза определяет скорость синтеза холестерина.

В то же время в адипоцитах синтез нейтрального жира (триацилглицеролов) никак не ограничивается количеством конечного продукта, что позволяет клетке накапливать жир в гигантском количестве.

### Активность фермента. Методы определения активности.

Определение количественного содержания ферментов в биологических объектах трудно, поскольку, за редким исключением, ферменты в тканях присутствуют в ничтожно малых концентрациях. Поэтому *о количестве ферментов судят по скорости катализируемой реакции в определенных, согласованных условиях измерения.*

При оптимальных условиях температуры, рН-среды и полном насыщении фермента субстратом *скорость катализируемой реакции пропорциональна концентрации фермента.* О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования продукта реакции.

Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах.

Стандартная международная единица (Е или U): *за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин).*

В связи с введением Международной системы единиц (СИ) предложено новое выражение активности фермента *в каталах (кат, kat): 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 молю в 1 с (1 моль/с).*

Рекомендовано, кроме того, измерять активность фермента при температуре 25°C, оптимуме рН и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения. В этих случаях *скорость соответствует нулевому порядку реакции в отношении субстрата* и зависит только от концентрации фермента.

Для выражения активности *в практической работе* с ферментами часто пользуются произвольными понятиями удельной и молярной активности.

Активность – более широкое понятие, чем количество. Она подразумевает в первую очередь результат реакции, а именно *убыль субстрата* или *накопление продукта*. Естественно, при этом нельзя игнорировать время, которое проработал фермент и число молекул фермента. Но так как число молекул фермента подсчитать обычно нереально, то используют *количество биологического материала*, содержащего фермент (объем или массу).

Таким образом, при определении активности ферментов нужно одновременно учитывать три переменные:

- масса полученного продукта или исчезнувшего субстрата,
- время, потраченное на реакцию,
- количество фермента, но на самом деле массу или объем биологического материала, содержащего фермент.

Для понимания соотношений указанных факторов наглядным и простым примером может служить строительство двух зданий.

Здания приравняем к продукту реакции, *рабочие* – это ферменты, *бригада* соответствует объему биологического материала. Итак, задачи:

1. На постройке одного здания трудилась бригада из 10 человек, другого такого же здания – бригада из 5 человек. Строительство закончено одновременно и в полном объеме. Где выше активность рабочих?

2. На постройке одного здания из 3 этажей трудилась бригада из 10 человек, другого здания из 12 этажей – бригада тоже из 10 человек.

Строительство закончено одновременно и в полном объеме. Где выше активность рабочих?

3. На постройке одного здания из 5 этажей трудилась бригада из 10 человек, другого такого же здания – бригада тоже из 10 человек. Строительство первого здания заняло 20 дней, второе построено за 10 дней. Где выше активность рабочих?

### **Основы количественного определения активности ферментов**

#### *Общая активность фермента*

За единицу общей активности фермента принимают такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в единицу времени в расчёте на количество материала, взятого для исследования. Так, активность аланинаминотрансферазы в печени крыс равна 1670 мкмоль пирувата в час на 1г ткани; активность холинэстеразы в сыворотке крови человека составляет 250 мкмоль уксусной кислоты в час на 1мл сыворотки при 37°C.

Особого внимания исследователя требуют высокие значения активности фермента как в норме, так и в патологии.

Рекомендуется работать с небольшими показателями активности фермента.

Для этого источник фермента берут в меньшем количестве (сыворотку разводят в несколько раз физиологическим раствором, а для ткани готовят меньший процентный гомогенат). По отношению к ферменту в таком случае создаются условия насыщения субстратом, что способствует проявлению его истинной активности. Общая активность фермента рассчитывается с помощью

формулы: 
$$a = \frac{\Delta C}{V \times t} \times n,$$
 где  $a$  – активность фермента (общая),  $\Delta C$  – разность концентраций субстрата до и после инкубации;  $V$  – количество материала, взятого на анализ,  $t$  - время инкубации;  $n$  - разведение.

Следует иметь в виду, что показатели активности ферментов сыворотки крови и мочи, исследуемых в диагностических целях, выражают в единицах общей активности.

#### *Удельная активность фермента*

Поскольку ферменты являются белками, важно знать не только общую активность фермента в исследуемом материале, но и ферментативную активность белка, находящегося в данной пробе. За единицу удельной активности принимают такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в единицу времени в расчёте на 1 мг белка пробы.

Для вычисления удельной активности фермента необходимо общую активность разделить на содержание белка в пробе:

Удельная активность =  $\frac{\text{Общая активность}}{\text{Количество белка}}$ . Например, содержание белка в ткани печени составляет 160 мг/г. Разделив общую активность аланинаминотрансферазы (1670 мкмоль пирувата в час на 1г ткани) на это значение, получаем 10,4 мкмоль пирувата/мг белка×час.

Чем хуже очищен фермент, тем больше в пробе находится посторонних балластных белков, тем ниже удельная активность. В ходе очистки количество таких белков уменьшается, и соответственно удельная активность фермента повышается. Предположим, в исходном биологическом материале, являющемся источником фермента (измельчённая печень, каша из растительной ткани), удельная активность была равна 0,5 мкмоль/ (мг белка× мин). После дробного осаждения сульфатом аммония и гель-фильтрации через сефадекс она повысилась до 25 мкмоль/(мг белка× мин), т.е. увеличилась в 50 раз. К оценке эффективности очистки ферментных препаратов прибегают при производстве лекарственных средств энзиматической природы.

*Удельную активность определяют в том случае, когда нужно сопоставить активность разных препаратов одного и того же фермента.*

*Если требуется сравнить активность разных ферментов, рассчитывают молекулярную активность.*

*Примеры расчетов активности, известно,*

-что 1 г пепсина расщепляет 50 кг яичного белка за один час – таким образом, его активность составит 50 кг/час на 1 г фермента,

-если 1,6 мл слюны расщепляет 175 кг крахмала в час – активность амилазы слюны составит 109,4 кг крахмала в час на 1 мл слюны или 1,82 кг/мин×г или 30,3 г крахмала/ с×мл.

2. Создание стандартных условий, чтобы можно было сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях – оптимальная рН и фиксированная температура, например, 25°С или 37°С, соблюдение времени инкубации субстрата с ферментом.

3. Необходимо наличие избытка субстрата, чтобы работали все имеющиеся в растворе молекулы фермента.

## **Методы анализа активности и свойств ферментов**

### *Спектральные методы*

– Фотометрия в УФ и видимом диапазоне (наиболее распространённый метод, основан на измерении поглощения света), связана с применением химических методов для осуществления «цветных реакций», а также с



применением окрашенных субстратов: определение белка, нуклеиновых кислот, фосфатов, липидов, сахаров,

– Флуориметрия (более чувствительный, менее универсальный, основан на поглощении и испускании света),

– Люминометрия (очень чувствительный, основан на собственном свечении),

– Турбидиметрия (рассеяние света) при образовании суспензии субстратов или клеток

*Электрохимические методы*

- Титриметрический метод (рН-статирование, измерение изменения рН),

*Вискозиметрические методы*

- основаны на уменьшении вязкости полимерных субстратов, в первую очередь полисахридов (карбогидразы), определение вязкости ферментационных сред,

*Хроматографические методы* (ТСХ, ЖХ, ВЭЖХ, белковая хроматография),

*Электротранспортные методы:*

-Электрофорез (в денатурирующих и неденатурирующих условиях) – определение молекулярной (Мм) массы белков и пептидов

-Электрофокусирование – определение изоэлектрической точки белков (рI)

*Масс-спектрометрические методы.*

В медицине концентрацию ферментов в биологических жидкостях принято выражать в единицах активности на литр (МЕ/л, кат/л).

Иногда используют не международные единицы активности, особенно в тех случаях, когда субстрат или продукт реакции невозможно выразить в мкмоль/л. Такая ситуация складывается при использовании в качестве субстрата полимерных соединений с неизвестной молекулярной массой. Так, при определении активности  $\alpha$ -амилазы методом Каравея в качестве субстрата используют растворимый крахмал, который представляет собой смесь полисахаридов различной молекулярной массы. Поэтому активность фермента выражают в граммах или мг крахмала, гидролизованного одним литром сыворотки крови (мочи) за 1 ч, т.е. г/(л•час) или мг/(л•час).

В большинстве случаев *скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента*, т.е. определив по скорости реакции активность фермента, можно оценить концентрацию фермента в биологической жидкости.

Кроме того, *скорость ферментативной реакции, а значит и активность фермента, зависит от природы субстрата и с различными субстратами для одного и того же фермента она может отличаться в несколько раз.*

*Скорость ферментативной реакции зависит от рН реакционной смеси.* Объясняется это тем, что в активные центры ферментов входят различные ионогенные группы белковых молекул, которые при различных значениях рН среды ионизируются по-разному. Исходя из этого определение активности того или иного фермента в биологической жидкости необходимо проводить при рН, близкого к рН-оптимуму данного фермента.

*Скорость ферментативной реакции зависит от температуры реакционной смеси.* Повышение температуры всего лишь на один градус Цельсия увеличивает скорость ферментативной реакции на 2,5- 20,0%. При более высоких температурах происходит денатурация ферментов и, они теряют каталитические свойства. Поэтому активность ферментов определяют при фиксированной температуре (25, 30, 37°C).

Существенное влияние на скорость ферментативной реакции оказывает *ионная сила раствора*, в котором измеряется активность ферментов. Так как измерение активности ферментов в биологическом материале производят в буферных растворах, их концентрация может колебаться от 0,01 до 0,10 моль/л, что может отражаться на величине измеренной активности ферментов. Более того, состав буферных смесей также оказывает влияние на активность одного и того же фермента.

Из сказанного следует, что скорость катализируемой ферментом реакции, а значит и его активность, существенно зависит от условий инкубационной среды. Поэтому для получения правильных и воспроизводимых результатов от персонала лабораторий требуется, наряду с точным выполнением прилагаемой инструкции, также понимание сути происходящих во время анализа процессов.

### **Классификация ферментов**

В организме человека, животных, растений, микроорганизмов содержится большое количество ферментов, катализирующих различные по химической сущности реакции. Комиссией по ферментам Международного биохимического союза разработаны классификация и номенклатура ферментов. В основе принятой классификации ферментов лежит специфичность их действия. *По типу катализируемых реакций* все ферменты делятся на 6 основных классов. Каждый класс ферментов разделяется на подклассы, которые в свою очередь делятся на подподклассы по тому же принципу, т.е. по типу катализируемой реакции. Каждому ферменту в Международной классификации ферментов присваивается четырехзначный код.

Класс	Название класса	Катализируемые реакции:
1	Оксидоредуктазы →	-окислительно-восстановительные реакции;
2	Трансферазы →	-переноса различных групп от одних соединений к другим;
3	Гидролазы →	-расщепления веществ на более простые соединения с участием воды;
4	Лиазы →	-расщепление не гидролитическим путем связей –С-С-, отщепление групп с образованием двойной связи, присоединение по двойной связи.
5	Изомеразы →	-реакции изомеризации, т.е. превращения органических веществ в их изомеры;
6	Лигаза (синтетаза) →	синтеза сложных соединений из более простых соединений: присоединение друг к другу молекул с использованием энергии АТФ (или других высокоэнергетических соединений).

Первое число кода указывает на принадлежность фермента к одному из шести классов, второе - к подклассу, третье - к подподклассу, и наконец, четвертое число - это порядковый номер фермента в подподклассе.

Например, уреазы (систематическое название мочевины: амидогидролаза) имеет шифр 3.5.1.5.

*Механизмы изменений активности ферментов в биологических жидкостях*

Как было показано выше, большая часть ферментов локализована внутри клеток. Одни из них находятся в цитозоле (например, ферменты гликолиза), другие в клеточных мембранах (митохондриях, лизосом, эндоплазматической сети и т.п.). В кровоток ферменты поступают из клеток при их повреждении, некрозе, при повышении проницаемости цитоплазматических мембран.

*Количество поступающих из поврежденных клеток в кровоток ферментов зависит от количества поврежденных клеток, от содержания ферментов в клетках и прочности связи ферментов с биологическими мембранами.* Во внеклеточной среде, в том числе и в крови, ферменты клеток обычно находятся непродолжительное время. У разных ферментов крови время удаления из кровотока различное, от нескольких минут, до нескольких дней.

В представленной таблице приведены в качестве примера периоды «полужизни» некоторых ферментов в плазме крови:

Название фермента	Период «полужизни»
Аспартатаминотрансфераза	17±5 ч
Аланинаминотрансфераза	74±10 ч
Креатинкиназа	15 ч
Щелочная фосфатаза	3-7 дней
Амилаза	10 дней
ЛДГ-1	113±ч
ЛДГ-11	10±2 ч

*Каким превращениям подвергаются находящиеся в крови ферменты?*

Внеклеточная среда для клеточных ферментов является чужеродной средой, с иным электролитным, биохимическим составом, с отличными от клеток физико-химическими параметрами, поэтому под действием различных факторов внеклеточной жидкости белковые молекулы ферментов в крови подвергаются различным конформационным и химическим превращениям.

В частности, поскольку любое повреждение клеток (тканей) вызывает воспалительную реакцию организма, молекулы ферментов крови подвергаются т.н. *физиологической денатурации*, при которой они становятся эндогенными патогенами (флогогенами, от греч. *флогос*- воспаление).

Флогогены фагоцитируются моноцитами и макрофагами. Лишь низкомолекулярные ферменты, такие как альфа-амилаза поджелудочной железы, способны проникать через почечный фильтр и выводиться из организма с мочой. Все остальные ферменты, имеющие достаточно большие молекулярные массы, не способны удалиться из кровотока путем экскреции почками.

*Удаление (элиминация) таких патогенов (повторим, что во внеклеточной среде клеточные ферменты являются чужеродными веществами, флогогенами) происходит главным образом в процессе воспалительной реакции путем фагоцитоза моноцитами, нейтрофилами и макрофагами.* Все эти процессы очищения крови от чужеродных веществ (физиологически денатурированных эндогенных патогенов) осуществляется в основном путем фагоцитоза.

Так как различные ферменты клеток поступают в кровь при повреждениях клеток и с различной скоростью удаляются из кровотока, кинетика активности различных ферментов крови используется не только для диагностики повреждения тех или иных органов и тканей, но и является свидетельством степени повреждения тех или иных тканей и органов и состояния механизмов очищения крови от клеточных ферментов.

*Методы определения активности ферментов.* Отличительными особенностями ферментов как аналитов являются:

- их очень низкое содержание в клетках и биологических жидкостях;
- небольшое время их существования в биоматериалах (быстрая обновляемость, быстрое уменьшение их каталитической активности при нарушениях синтеза и элиминации);
- высокая каталитическая активность нативных ферментов в оптимальных условиях;
- нестабильность *in vitro*;
- большой диапазон содержания (активности) при патологических состояниях;
- различная диагностическая специфичность различных ферментов внеклеточной жидкости.

В противоположность большинству других биохимических компонентов биологических жидкостей количество ферментов (в молях или мг) не может быть измерено, за небольшим исключением. Объясняется это тем, что количество молекул фермента в исследуемом материале крайне мало и существующими биохимическими методами такие количества измерить не удается.

*О количестве фермента косвенно судят по его активности, то есть по производимому ферментом действию.* Иными словами, присутствие и количество ферментов в исследуемом материале распознается по их специфичности и скорости катализируемой ими реакции.

Любое изменение конформации ферментов, наличие ингибиторов или отсутствие активаторов приводит к изменению их каталитической активности. Присутствие в биожидкостях факторов, воздействующих на конформацию ферментов, изменяет их активность. К таким факторам, в частности, относится низкая аналитическая концентрация ферментов во внеклеточном пространстве; разбавление концентрации внутриклеточных ферментов в большом объёме ВКЖ может приводить к необратимым денатурационным изменениям и частичной или полной потере каталитической активности.

*Как мы говорили, активность фермента можно определить либо по скорости накопления продуктов ферментативной реакции, либо по скорости убыли субстрата.*

Рекомендуется активность ферментов по возможности определять по начальной скорости реакции. В это время ещё имеется избыток субстрата, продуктов реакции образовалось ещё мало и фермент не успел частично разрушиться. Желательно определение активности ферментов производить в таких условиях, когда количество превращенного (израсходованного) субстрата не превышает 20% от исходного уровня.

При исследовании ферментов, требующих для своего каталитического действия присутствия кофакторов, а также ионов металлов, последние должны быть добавлены в инкубационную смесь.

Для определения активности ферментов можно применять *колориметрические, спектрофотометрические, флуориметрические, кондуктометрические и другие физико-химические* методы. В практике работы клиничко-диагностических лабораторий для определения активности ферментов чаще используют фотометрические и спектрофотометрические методы.

В основе *фотометрических методов* лежит измерение при помощи колориметров, фотометров интенсивности окраски веществ, образующихся при взаимодействии субстрата или продукта реакции со специфическими реагентами, добавленными в пробу, как правило, после остановки ферментативной реакции.

*Спектрофотометрические методы* основаны на поглощении света определенных участков спектра субстратами или продуктами реакции. Спектры поглощения этих соединений могут иметь максимумы при определенной длине волны как в ультрафиолетовой, так и в видимой области.

Например, для белков-ферментов максимум поглощения при  $\lambda 280$  нм (кванты света поглощают триптофан, тирозин, фенилаланин. Эмпирически доказано, что раствор белка с концентрацией 1 мг/мл соответствует 1 опт. ед. плотности. Активность ДНКаз определяют по приросту кислото-растворимых продуктов при длине волны  $\lambda 260$  нм (кванты света поглощают азотистые основания).

Спектрофотометрические методы широко применяются для определения активности оксидоредуктаз, в частности, дегидрогеназ, которые действуют с участием  $\text{NAD}^+$  или  $\text{NADP}$ . Переход  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$  ( $\text{NADP}^+$  в  $\text{NADPH}$ ) сопровождается изменением поглощения длины волны 340 нм; окисленная форма кофактора не поглощает эту длину волны, а восстановленная поглощает. Определение активности ферментов, основанное на разнице спектров поглощения окисленной и восстановленной форм никотинамидадениндинуклеотидных коферментов, получило название оптического теста Отто Варбурга.

Методики, в основе которых лежит тест Варбурга, могут быть использованы для определения активности не только дегидрогеназ, но и других ферментов. В этих случаях в инкубационную смесь вносят вспомогательные субстраты, ферменты и коферменты, среди которых содержатся либо

окисленные  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADP}^+$ ), либо восстановленные их формы ( $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$ ).

Примеры некоторых абсорбционных методы определения активности ферментов.

Как отмечалось выше, *активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата*. Скорость ферментативной реакции можно определять по изменению концентрации субстрата или продукта в реакционной смеси.

В настоящее время в КДЛ основными абсорбционными (спектрофотометрическими) методами определения активности ферментов являются следующие:

Аланинаминотрансфераза (АлАТ, АЛТ) и Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)

*Аминотрансферазы* катализируют реакции переноса аминогруппы с аминокислот на  $\alpha$ - кетокислоты с образованием новых аминокислот и новых кетокислот.

Эти реакции играют большую биологическую роль, так как обеспечивают биосинтез необходимых организму аминокислот.

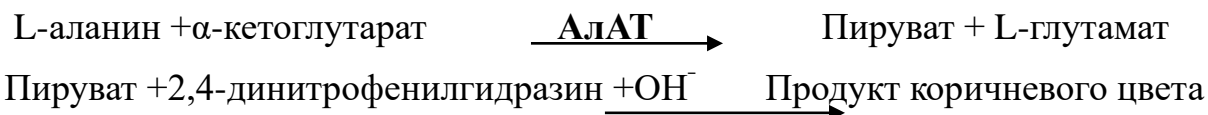
Аминотрансферазы содержатся во всех клетках организма, но относительное содержание их в клетках разных органов и тканей не одинаково. Так, гепатоциты содержат больше аланинаминотрансферазу, а кардиомиоциты - аспартатаминотрансферазу. В клетках эти два типа трансаминаз распределены между клеточными структурами неравномерно: аланинаминотрансфераза в основном локализована в цитозоле, а АсАТ находится и в цитозоле, и в митохондриях.

Для проявления высокой каталитической активности трансаминаз необходимым условием является содержание в них кофактора - производного витамина  $\text{B}_6$  - фосфопиридоксаля, который непосредственно участвует в химическом превращении аминокислот. При дефиците фосфопиридоксаля, несмотря на достаточное количество апофермента, каталитическая активность трансаминаз практически равна нулю.

Среди нескольких унифицированных методов измерения активности АлАТ и АсАТ в крови наиболее часто используются

*-Колориметрический метод определения активности аланинаминотрансферазы (АлАТ\_) Райтмана-Френкеля.*

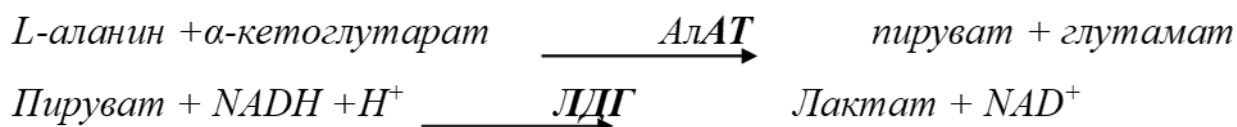
Этот метод определения активности аминотрансфераз *по конечной точке* основан на следующей химической реакции:



Активность АлАТ пропорциональна количеству образовавшегося пирувата, который при добавлении в реакционную смесь 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образует динитрофенилгидразон-пируват, имеющий коричневую окраску. Интенсивность окраски пропорциональна активности АлАТ.

*-Кинетический УФ метод определения активности АлАТ*

*Химизм реакций:*



*Принцип метода.* Метод основан на измерении оптической плотности восстановленного NADH в процессе его окисления пируватом с образованием NAD<sup>+</sup>. Восстановленный NADH имеет максимум поглощения длины волны 340нм, в то время как его окисленная форма, образующаяся в результате реакции, эту длину волны не поглощает.

Оптическая плотность реакционной смеси пропорциональна концентрации либо продукта реакции, либо кофермента.

Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо определить изменение оптической плотности в единицу времени (в минуту). Скорость окисления NADH пропорциональна активности АлАТ.

*-Определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) по конечной точке методом Райтмана-Френкеля.*

*Принцип метода-* тот же, что и при определении активности АлАТ

*Химизм реакций:*



Продукт реакции динитрофенилгидразон имеет коричневую окраску, интенсивность которой измеряют колориметрически после остановки реакции добавлением щелочи при длине волны 500-560 нм.

Активность фермента прямо пропорциональна оптической плотности продукта реакции.

*-Определение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим ультрафиолетовым методом (тест Варбурга)*

*Принцип метода:* тот же, что и для АлАТ.

*Химизм реакций:*



А) основная реакция:

L-аспартат +  $\alpha$ -кетоглутарат  $\xrightarrow{\text{AcAT}}$  Оксалоацетат+L-глутамат.

Б) индикаторная реакция:

Оксалоацетат + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{МДГ}}$  L-малат + NAD<sup>+</sup> (МДГ-малатдегидрогеназа)

Ход измерения:

После внесения в термостатируемую кювету необходимых реагентов через 60 сек измеряют экстинкцию. Ровно через 1 и 2 мин измеряют экстинкцию A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> против воды при 340 нм.

Одновременно проводят измерение активности калибровочного раствора, содержащего известную активность фермента.

Расчет производят по формуле:

Активность<sup>AcAT</sup> = (A<sub>2</sub> – A<sub>1</sub>) пробы / (A<sub>2</sub> – A<sub>1</sub>) кал × Активность<sup>стандарта</sup>

### **Щелочная фосфатаза (ЩФ)**

Фосфатазы-ферменты класса гидролаз, катализируют реакции гидролитического отщепления от сложных эфиров органических соединений остатки ортофосфорной кислоты. В зависимости от реакции среды, в которой ферменты наиболее активны, все фосфатазы делятся на кислые и щелочные фосфатазы.

*Щелочная фосфатаза* - гетерогенный фермент, представленный отдельными изоферментами, каждый из которых сосредоточен в определенном органе. Различают печеночный, костный, кишечный, плацентарный, холестатический, почечный изофермент щелочной фосфатазы. Для всех этих ферментов рН-оптимум находится в щелочной среде. В крови взрослых здоровых людей обнаруживается лишь печеночная форма фосфатазы. У детей сыворотка крови содержит также в большом количестве костную ЩФ.

*Принцип метода.* ЩФ расщепляет в глициновом буфере 4-нитрофенилфосфат с образованием фосфата и окрашенного в щелочной среде в желтый цвет 4-нитрофенола.

*Ход определения.* Пробу крови вносят в буферный раствор, далее в него добавляют субстрат, инкубируют 10 мин, останавливают реакцию раствором ЭДТА, перемешивают и измеряют экстинкцию пробы и контрольного раствора против воды и вычисляют разность экстинкций опытной и контрольной проб и рассчитывают активность фермента по формуле.

(При определении экстинкции при различных длинах волн в формулах используются соответствующие коэффициенты).

Одним из часто определяемых ферментов в крови является *креатинфосфокиназа* или сокращенно *креатинкиназа (КК)*.

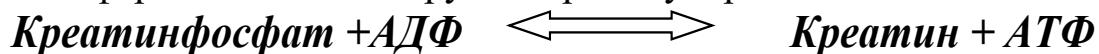
Этот фермент относится к классу трансфераз, подклассу фосфотрансфераз.

*Креатинкиназа* катализирует обратимое фосфорилирование креатина с участием АДФ. Наибольшее количество креатинкиназы содержится в скелетной мускулатуре, сердце и головном мозге.

Креатинфосфокиназа (КФК или КК) - димер, состоящий из двух субъединиц – М (muscle) и В (brain). Из них образуются три изофермента:

- КК-ММ (мышечный),
- КК-МВ (сердечный),
- КК-ВВ (мозговой).

Все изоферменты катализируют обратимую реакцию:

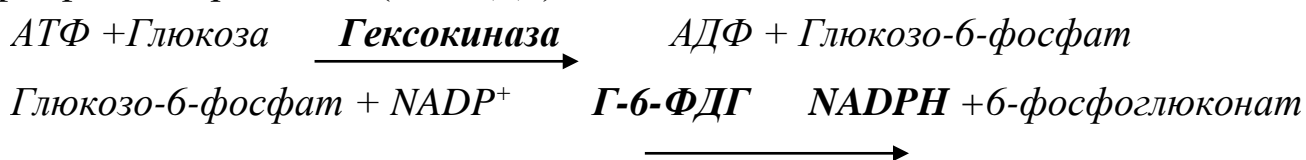


*-Определение активности общей креатинкиназы в сыворотке крови*

В настоящее время в основном используются методы, основанные на оптическом тесте Варбурга по реакции, приведенной выше, в сопряжении с другими ферментными реакциями.

*Принцип метода:*

Креатинкиназа катализирует фосфорилирование АДФ в присутствии креатинфосфата, образуя АТФ и креатин. Активность фермента определяется по скорости образования NADPH, оптическую плотность которого измеряют при 340 нм, в ряде реакций с участием гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ).



Повышение экстинкции при 340 нм, обусловленное образованием восстановленного кофермента, пропорционально активности фермента.

*Референтные интервалы:* муж -52-200 МЕ/л  
жен -35-165 МЕ/л

Креатинкиназа играет важную роль в мышцах, обеспечивая превращение АДФ в АТФ при сокращении мускулатуры, используя креатинфосфат как резервную форму макроэргических фосфатных соединений.

Сывороточная креатинкиназа в основном имеет мышечное происхождение и её активность зависит от ряда физиологических факторов (пола, возраста, мышечной массы, физической активности, расы).

Активность креатинкиназы значительно увеличивается при заболеваниях скелетной мускулатуры (мышечная дистрофия, миозиты, полимиозиты, злокачественная гипертермия, травмы, острый рабдомиолиз), центральной нервной системы (острые цереброваскулярные заболевания, церебральная ишемия, синдром Рейё) и щитовидной железы (гипотиреоз)

После инфаркта миокарда подъём активности фермента наблюдается через 3-6 часов и достигает своего максимума через 24-36 часов. Фермент быстро выводится из организма, так что его активность возвращается к исходному уровню через 3-4 дня.

*Определение общей активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови*

ЛДГ- гликолитический фермент, катализирующий обратимую реакцию восстановления пирувата в лактат и дегидрирование лактата с образованием пирувата. В качестве кофактора содержит  $NAD^+$  ( $NADH$ ). Фермент содержится в клетках всех органов и тканей, но наиболее высока его активность в почках, сердце, скелетной мускулатуре, печени и эритроцитах.

*-Кинетический метод определения активности общей ЛДГ*

*Принцип метода:* фермент катализирует восстановление пирувата восстановленным  $NADH + H^+$  с образованием лактата и окисленного  $NAD^+$ .

Скорость реакции определяется путем измерения экстинкции при длине волны 340 нм; снижение оптической плотности в единицу времени пропорционально активности ЛДГ.

Химизм реакции:



**Способы определения концентрации продукта реакции или субстрата**

*1. Прямое фотометрирование.* Этот способ используют, если субстрат или один из продуктов реакции можно определить фотометрически. Таким продуктом является, например, *p*-нитрофенол, поэтому этот подход используют при определении активности фосфатаз. Кислая и щелочная фосфатазы гидролизуют пара-нитрофенолфосфат с образованием пара-нитрофенола, который в щелочной среде окрашивается в желтый цвет, интенсивность окраски измеряют при 405нм.

*2.Окрашивание продукта или субстрата красителем.* Если продукт ферментативной реакции или субстрат не имеет окраски, их превращают в окрашенные производные. В методе Райтмана-Френкеля для определения активности трансаминаз продукт реакции пируват переводят в окрашенную форму взаимодействием с 2,4-динитрофенилгидразином.

*3.Тест Варбурга.* В некоторых методах измерения активности ферментов используются сопряженные ферментативные реакции с участием NADH или NADPH, которые имеют максимум поглощения при 340 нм, в то время как их окисленные формы ( NAD<sup>+</sup> или NADP<sup>+</sup>), при этой длине волны не поглощают.

При определении активности фермента оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации продукта (субстрата) или кофермента соответственно, т.е. подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера. Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо измерить изменение оптической плотности (A) в единицу времени (в минуту).

### **Способы измерения скорости ферментативной реакции**

Определение активности ферментов биологических материалов осуществляют при помощи нескольких способов определения скорости ферментативной реакции.

#### *1.Измерение «по конечной точке».*

Способ заключается в измерении оптической плотности на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного отрезка времени t от начала реакции. Такой способ называют ещё однотоочечной кинетикой. Как правило, по истечении указанного отрезка времени t в реакционную смесь вносят реагент, останавливающий ферментативную реакцию, например, кислоту или щелочь. Отсюда и название способа – «по конечной точке».

Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:

$\Delta A / \text{мин} = (A_{\text{оп}} - A_{\text{хол}}) / t$ , где  $A_{\text{хол}}$  - оптическая плотность холостой пробы на реагент или сыворотку, если они вносят значительный вклад в окраску реакционной смеси.

#### *2.Измерение двухточечное.*

При этом способе оптическую плотность определяют на линейном участке кинетической кривой дважды, четко фиксируя интервал времени t между измерениями. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:  $\Delta A / \text{мин} = (A_2 - A_1) / t$ . Этот способ используют в современных методах определения активности многих ферментов.

#### *3.Измерение многоточечное, или кинетическое.*

При этом способе оптическую плотность на линейном участке кинетической кривой определяют -3-5 раз через четко фиксированные интервалы времени. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:  $\Delta A / \text{мин} = \Delta \bar{A} / t$ . Многоточечная кинетика используется только для биохимических анализаторов, так как в ручном варианте это достаточно

трудоемко. Двух- и многоточечный варианты особенно эффективны при определении активности аллостерических ферментов. Многоточечная кинетика считается наиболее точным способом измерения скорости ферментативной реакции.

### **Расчет ферментативной активности**

Ферментативную активность рассчитывают по калибратору, калибровочной кривой и коэффициенту экстинкции продукта или субстрата.

*1. Расчет по калибратору* (стандарту) проводят при наличии в наборе реагентов раствора продукта реакции, или субстрата с известной концентрацией. При этом на всей области определения активности фермента оптическая плотность реакционной смеси должна линейно зависеть от концентрации калибратора, т.е. подчиняться закону Бугера-Ламберта-Бера.

*2. Расчет по калибровочной кривой* проводят, если оптическая плотность реакционной смеси **нелинейно** зависит от концентрации продукта реакции. Это может происходить по ряду причин: поток световой энергии не является монохроматическим, что имеет место, когда используются интерференционные или стеклянные светофильтры, т.е. зависит от средства измерения оптической плотности; молекулы растворителя взаимодействуют с частицами вещества, поглощающими световую энергию. Это взаимодействие изменяется с изменением концентрации вещества; изменение рН раствора влияет на устойчивость образующихся соединений; прочее.

При нелинейной зависимости экстинкции реакционной смеси от концентрации продукта реакции в процессе анализа одновременно с опытными пробами инкубируют не менее 4-х стандартных (калибровочных) проб, содержащих продукт в различных, но известных концентрациях. По полученным данным строят калибровочный график в координатах:

$$\{X=E\}, \{Y= \Delta A/ \text{мин}\}, \text{ или } (Y= \Delta A/ \text{ за время реакции}, \Delta A = A_{\text{оп}} - A_{\text{хол}})$$

и по нему находят активность в опытной пробе.

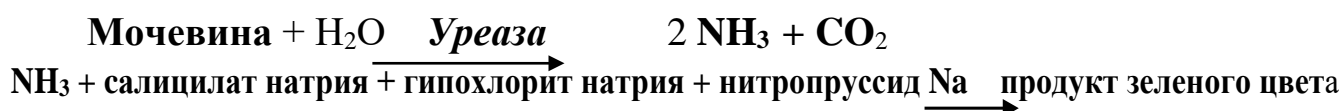
### **Ферментные методы определения субстратов**

В современной клинической биохимии ферментативные методы анализа постепенно вытесняют химические методы. Они отличаются от химических методов определения различных аналитов в биоматериалах высокой специфичностью, низкой температурой реакций, обладают высокой аналитической чувствительностью, проводятся в водных растворах. Аналит во всех этих методах выступает в качестве субстрата.

В настоящее время в КДЛ ферментативными методами определяют глюкозу, креатинин, мочевины, мочевую кислоту, холестерин, триацилглицерины, лактат, и многие другие аналиты.

В качестве примера схемы реакций и принципы некоторых методов:

-Уреазный салицилат-гипохлоритный, уреазный фенол-гипохлоритный метод определения мочевины:



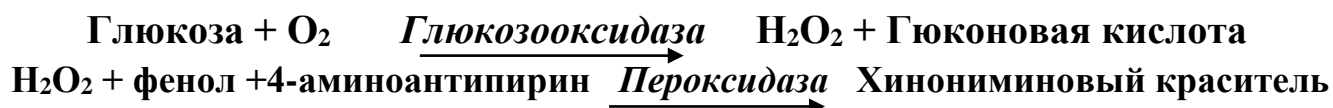
Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна концентрации мочевины. В фенолгипохлоритном методе место салицилата натрия (точнее, 4-хлорсалицилата натрия) используют фенол и получают продукт голубого цвета (фенолиндофеноловый синий).

-Уреазный глутаматдегидрогеназный метод:



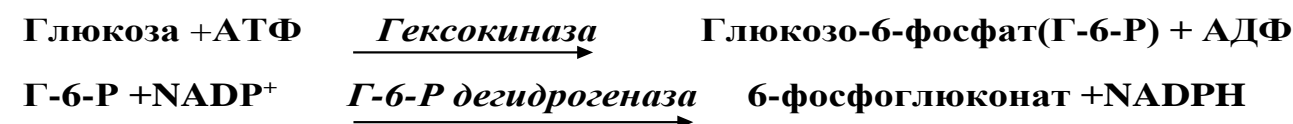
Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации мочевины.

- Глюкозооксидазный-пероксидазный метод определения глюкозы



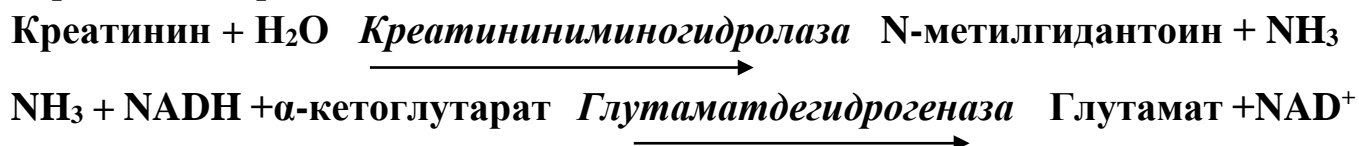
Концентрация продукта реакции пропорциональна концентрации глюкозы в пробе, так как скорость его образования пропорциональна концентрации образованного при окислении глюкозы пероксида водорода.

-Гексокиазный метод определения глюкозы:



Количество образовавшегося в результате сопряженных реакций NADPH пропорционально концентрации глюкозы в пробе.

-Креатининиминогидролазно- глутаматдегидрогеназный метод определения креатинина:



Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации креатинина.

По способу фотометрирования эти методы разделяют на колориметрические и УФ методы, когда фотометрирование осуществляют при 340 нм. По участку кинетической кривой, на котором происходит фотометрирование, различают кинетические и методы по конечной точке.

В первом случае фотометрирование осуществляют на начальном линейном участке кинетической кривой, при этом скорость изменения оптической плотности реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита; во втором- когда кинетическая кривая выходит на плато, при этом оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита.

Таким образом, все используемые методы можно объединить в 4 группы:

- колориметрические по конечной точке,
- колориметрические кинетические,
- УФ методы по конечной точке и
- кинетические УФ методы.

Сущность колориметрических методов по конечной точке заключается в следующем:

1. На первом этапе образец (аналит) с помощью ферментативной реакции или цепи реакций превращают в продукт, который можно определить колориметрическим методом.

2. На втором этапе этот продукт взаимодействует с хромогенным комплексом, в результате образуется окрашенное соединение, которое фотометрируют; интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости.

Расчет концентрации образца проводят относительно концентрации калибратора (стандарта) по формуле:  $C = [(A_{оп} - A_{хол}) : (A_{кал} - A_{хол})] \times C_{кал}$  где С-концентрация аналита;

$A_{оп}$  -оптическая плотность опытной пробы;

$A_{хол}$  –оптическая плотность холостой пробы (бланка);

$A_{кал}$ - оптическая плотность калибратора;

$C_{кал}$  –концентрация аналита калибратора.

Необходимо отметить, что все реакции как первого, так и второго этапов должны во время инкубации обеспечить полное превращение субстратов в продукты, т.е. кинетика всех реакций должна выходить на плато (доходить до конца), отсюда название «по конечной точке».

Чтобы все реакции проходили до конца, необходимо очень аккуратно и точно соблюдать условия инкубации, указанные в инструкциях к используемому набору реагентов (рН, температуру, время реакции и т.д.).

### **Колориметрические кинетические методы**

К этой группе можно отнести методы, аналогичные методам по конечной точке, только фотометрирование в этом случае проводят на линейном участке кинетической кривой. Скорость изменения оптической плотности

реакционной смеси (скорость ферментативной реакции) прямо пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два (двухточечная кинетика) или несколько (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированные интервалы времени. Изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:  $\Delta A/\text{мин} = A_2 - A_1/t$  (для двухточечной кинетике).

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора. Все измерения оптической плотности должны производиться точно на линейном участке кинетической кривой.

### **УФ методы по конечной точке**

Примером применения такого метода измерения является определение глюкозы в крови гексокиназным методом. Его сущность заключается в том, что на последнем этапе цепи ферментативных превращений глюкозы участвует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, при действии которой  $\text{NADP}^+$  восстанавливается в  $\text{NADPH}$ . Концентрацию  $\text{NADPH}$  определяют фотометрически при длине волны 340 нм (УФ метод). Она пропорциональна концентрации в крови глюкозы. Расчет проводят относительно калибровочного раствора глюкозы. В этом методе все ферментативные реакции должны обеспечить полное превращение субстратов в продукты и  $\text{NADP}^+$  в  $\text{NADPH}$ , т.е. кинетические кривые должны выйти на плато за время инкубации.

### **УФ кинетические методы**

В этих методах на первом этапе происходит ферментативное превращение соответствующего образца с образованием продуктов, которые в последнем этапе ферментативных реакций окисляют  $\text{NADH}$  в  $\text{AD}^+$  или  $\text{NADPH}$  в  $\text{NADP}^+$  как в случае мочевины или креатинина (см. описание реакций выше). Скорость окисления восстановленных никотинамидадениндинуклеотидных коферментов пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два или несколько измерений оптической плотности при 340 нм через четко фиксированные отрезки времени на линейном участке кинетической кривой.

Таким образом определяют изменение оптической плотности в минуту и рассчитывают концентрацию аналита относительно калибровочного раствора определяемого аналита.

### **Основные правила работы с ферментами**

Работа с ферментами требует соблюдения простых правил, вытекающих из общих для всех ферментов свойств.



1. Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образования пены при их перемешивании, так как ферменты при этом могут инактивироваться в результате воздействия на них кислорода воздуха.

2. Растворенные, лиофильно высушенные реагенты, контрольные материалы и контрольные сыворотки, содержащие ферменты, перед использованием следует выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент приобрел конформационно активное состояние.

Необходимо строго соблюдать условия ферментативной реакции, указанные в инструкции: время и температуру инкубации, соотношение реагент/сыворотка.

3. Время начала и окончания ферментативной реакции следует фиксировать по секундомеру, причем в случае определения активности ферментов и кинетических методов определения аналитов для каждой отдельной пробы, а не для серии целиком, иначе результаты анализа будут неверными. Началом реакции считается момент добавления сыворотки (или стартера) в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная.

4. Перед началом ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо довести до значения, указанного в инструкции, и обеспечивать его поддержание в течение всего времени анализа с точностью  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . В случае ферментативных методов анализа желательно, а при определении активности ферментов обязательно использовать водяную баню (водяной термостат). Так как теплопроводность воды значительно выше теплопроводности воздуха, водяной термостат быстрее и надежнее обеспечивает установку и поддержание заданной температуры реакционной смеси.

5. Нельзя изменять соотношение рабочий реагент/сыворотка. Его уменьшение в целях экономии может привести к сужению линейной области определения в случае определения активности фермента и к неполному превращению аналита в случае ферментативных методов анализа, т.е. к получению заниженных результатов. При увеличении соотношения рабочий реагент/сыворотка снижается чувствительность метода.

6. Также нельзя разбавлять рабочий реагент в целях экономии, так как при этом условия реакции (концентрация буфера, активаторов и т.д.) отклоняется от оптимальных, что приведет к занижению результатов анализа как в случае определения активности ферментов, так и в случае определения аналитов ферментативными методами.

7. Если концентрация фермента или другого аналита превышает верхнюю границу линейности набора, то исследуемую пробу необходимо разбавить

строго в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкции к набору (чем разбавлять в во сколько раз) Несоблюдение указаний может привести к серьезным ошибкам, так как в сыворотке присутствует огромное количество соединений, тем или иным образом влияющих на анализ и результат его определения (особенно это касается ферментов). Для получения точных и воспроизводимых результатов пробу вообще лучше не разбавлять, тем более что активность некоторых ферментов (например, АЛАТ и АсАТ) непропорционально уменьшается при разбавлении. В необходимых случаях надо стремиться разбавлять пробу минимально, желательно, в 2-3 раза (особенно при определении активности ферментов) и не больше, чем указано в инструкции. Для разведения нельзя использовать маленькие аликвоты (10-20 мкл); чтобы уменьшить ошибку разведения, лучше взять хотя бы 100 мкл пробы.

8. Фотометрирование следует проводить в указанном в инструкции диапазоне длин волн, отклонение может существенно снизить чувствительность метода. В случае расчета концентрации аналита или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции. *Так как коэффициент экстинкции – это оптическая плотность раствора вещества с концентрацией 1 мкмоль /л в кювете с длиной оптического пути в 1 см при данной длине волны, то для другой длины волны значение его будет иным и может значительно отличаться.*

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна соответствовать указанной в инструкции. Использование кюветы с меньшей длиной оптического пути снизит чувствительность метода.

10. Калибровочную пробу необходимо ставить для каждой серии анализов в 4-х параллелях.

11. Следует тщательно мыть посуду, пипетки, наконечники и многократно ополаскивать их дистиллированной водой. Для мытья посуды нельзя использовать моющие средства, содержащие биодобавки; содержащиеся в них протеазы даже в следовых количествах могут разрушать ферменты в реакционной среде. Особенно тщательно нужно отмывать перекись водорода, используемую для обеззараживания пробирок и наконечников.

12. Необходимо следить за качеством дистиллированной воды, используемой в процессе анализа. Избыток некоторых ионов, входящих в её состав, может ингибировать ферменты.

13. При работе с ферментными наборами реагентов желательно, а при дозировании малых объёмов проб, реагентов (10-30 мкл) обязательно следует пользоваться поверенными автоматическими микродозаторами. Наконечники

для них повторно лучше не использовать, особенно те, которыми проводили отбор сыворотки и затем обеззараживали перекисью водорода.

14. Для получения достоверных результатов очень важен преаналитический этап. Рекомендуется как можно быстрее отделять сыворотку от сгустка (гемолиз, например, завышает результаты определения ЛДГ, АлАТ). Хранение сыворотки также неблагоприятно сказывается на результатах определения активности многих ферментов (они, обычно, занижаются), поэтому следует измерять активность ферментов в сыворотке в день взятия крови у пациента.

Соблюдение этих и некоторых других правил работы гарантирует высокую точность и воспроизводимость результатов анализа.

Но прежде чем приступить к определению активности ферментов в изучаемых тканевых субстратах, необходимо еще:

1. Для определения зависимости активности от pH -выбрать оптимальную реакцию среды для проявления активности изучаемого фермента.

2. Для построения графика зависимости активности фермента от времени его инкубации с субстратом-выбрать для работы те сроки инкубации, при которых сохраняется линейная зависимость между величиной активности фермента и временем его инкубации.

3. Для определения зависимости величины активности от концентрации белка в пробе-выбрать такие концентрации фермента, при которых величина активности фермента была бы пропорциональна его концентрации. Следует учитывать, что в тканевых экстрактах и биологических жидкостях могут присутствовать ингибиторы протеолитических ферментов. При разведении пробы их концентрация снижается, а протеолитических - увеличивается. Определяя “фактор разведения”, можно одновременно с подбором оптимальных условий для определения протеолитической активности выявить и наличие ингибитора.

4. При определении активности фермента необходимо работать при постоянной скорости ферментативной реакции, достигаемой при полном насыщении фермента субстратом, при так называемой максимальной скорости ферментативной реакции. В каждом отдельном случае максимальную скорость необходимо найти экспериментально, измерив активность препарата при разных концентрациях субстрата, при постоянных концентрациях белка и времени инкубирования.

#### **Методы:**

##### **-определения активности протеиназ по белковому субстрату.**

К 0.5 мл субстрата в соответствующем буферном растворе добавляют 0.5 мл пробы, содержащей фермент (экстракт, биологическую жидкость),

инкубируют установленное опытным путем время, после чего белки в пробе осаждают 5 мл 10% трихлоруксусной кислотой. Отделяют осадок центрифугированием, а надосадочную жидкость (ТХУ-центрифугат) подвергают дальнейшей обработке. Контрольные пробы - пробы, где реактив добавлен в обратном порядке: к 3 мл 10% раствора ТХУ добавляют 0.5 мл раствора, содержащего фермент и 0.5 мл субстрата. Рекомендуется ставить пробу на автолиз субстрата: к 0.5 мл субстрата добавляют 0.5 мл прокипяченного раствора, содержащего фермент, инкубируют вместе с опытными пробами и осажденной ТХУ.

#### **--определение содержания аргинина в ТХУ-центрифугантах по модифицированной реакции Сакагучи.**

К 0.5 мл ТХУ-центрифуганта добавляют 0.5 мл 2.5мМ раствора  $\text{CuSO}_4$ , 0.5 мл 5 Н. КОН, 0.5 мл раствора ДХН (2,4-дихлор-1-нафтол). Раствор встряхивают и вносят 0.5 мл гипобромита натрия, мгновенно возникает ярко-розовая окраска. Раствор встряхивают и через 20-30 секунд стабилизируют пробы добавлением 0.2 мл раствора 2-тиогликоля (чтобы предотвратить разрушение окрашенного продукта избытком гипобромита натрия. После добавления 2-тиодигликоля в пробы как опытные, так и контрольные, появляется желтоватое окрашивание за счет побочного продукта реакции между избыточной ТХУ и гипобромита натрия. Побочный продукт также стабилизируется 2-тиодигликолем. Оптическая плотность пробы измеряется спектрофотометром при 520 нм в кювете толщиной 1 см.

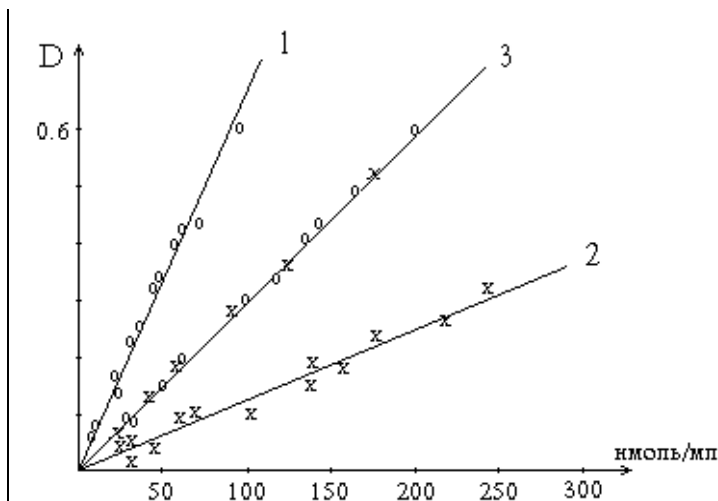
#### **-Определение активности протеиназ по реакции с реактивом Фолина.**

К 0.5 мл того же ТХУ-центрифуганта добавляют 0.5 мл 2.5 мМ раствора  $\text{CuSO}_4$ , 4 мл 0.5 н. раствора NaOH и 1.5 мл разбавленного в три раза реактива Фолина. Через 30 минут измеряют на спектрофотометре оптическую плотность при 760 нм.

Калибровочные кривые по пепсиновому гидролизату окисленного лизоцима: 30 мг окисленного лизоцима растворяют в 50 мл подкисленной воды (40 мл  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 мл 0.3 н. раствора HCl. и к полученном раствору добавляют 0.5 мг пепсина. Смесь оставляют при комнатной температуре на сутки. По истечении этого срока инкубации препарат не дает осадка с ТХУ. Этот препарат используют наряду с растворами аргинина и тирозина в качестве стандарта для построения калибровочных кривых. Приготавливают разведения с содержанием от 60 до 600 мкг/мл исходного лизоцима. В пробы вводят соответствующее опытным пробам количество ТХУ. Приготавливают также растворы свободного аргинина и тирозина с концентрациями от 0.04 до 0.25 мкмоль/мл. Из каждой пробы берут по 0.5 мл (в трех параллельных пробах) для определения содержания аргинина и тирозина по Фолину.

**Калибровочные кривые:** Определение количества аминокислоты или ее остатка в гидролизате в наномолях на 1 мл.

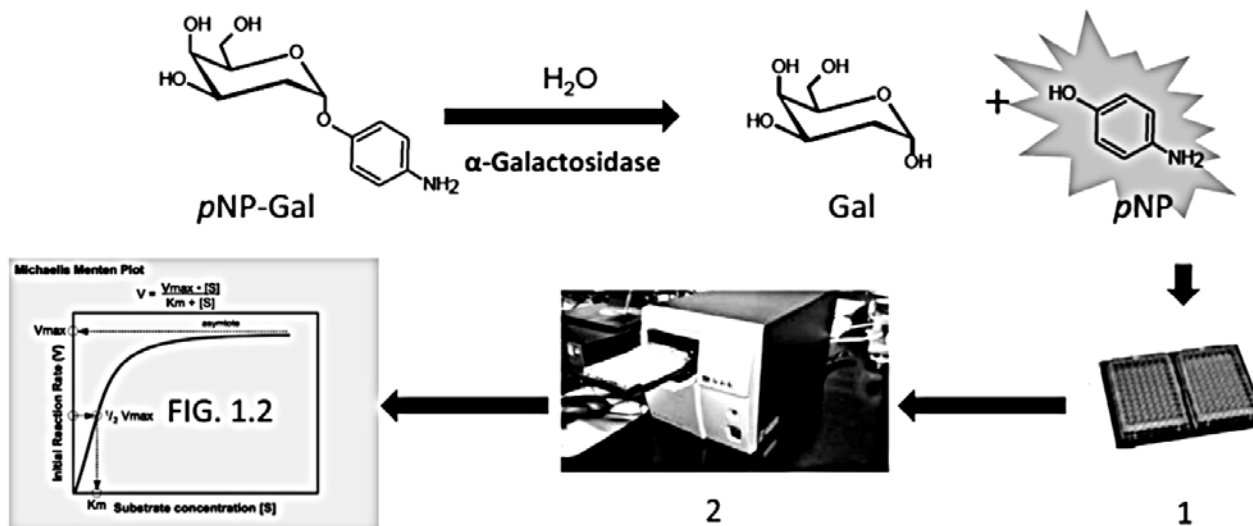
Кривая 3 получена с помощью микрометода на основе реакции Сакагучи (520 нм) по растворам аргинина (x) и по пептидному гидролизу лизоцима (o); 1 и 2 - с помощью реакции Фолина (760 нм): 2 - по растворам тирозина, 1 - по пептидному гидролизу лизоцима.



Значение оптической плотности проб, измеренные при 520 нм или 760 нм, нанесены на график против концентрации аргинина или тирозина или их остатков в пепсиновом гидролизате лизоцима. Кривая 1, проходящая выше кривой 2, получена при реакции реактива Фолина с растворами тирозина эквивалентной концентрации. Кривая 3 получена в результате реакции Сакагучи как со свободным аргинином, так и с его остатками, содержащимися в пептидах пепсинового гидролизата лизоцима. Расположение опытных точек точно по прямой свидетельствует о том, что в гидролизате, осажденном ТХУ, весь аргинин полностью реагирует с реактивом Сакагучи.

Воздействие Фолина на тирозин не специфично. Кроме тирозина в пептидах с этим реактивом реагируют триптофан, цистеин. Образующие медью с тетрапептидами и полипептидами биуретовые комплексы облегчают такое взаимодействие. Следовательно, выражение величины активности протеолитических ферментов в тирозиновых эквивалентах и по Фолину, как это иногда делают, неправильно.

**Определение активности  $\alpha$ -Галактозидазы**  $\alpha$ -Галактозидаза (para-nitrophenyl- $\alpha$ -galactoside, pNP-Gal) катализирует гидролиз концевой остатка галактозы у  $\alpha$ -галактозидов. Обычно активность этого фермента определяют при использовании синтетического аналога субстрата pNP-Gal, который гидролизует до галактозы (Gal) и пара-нитрофенола (para-nitrophenyl, pNP) pNP-Gal это бесцветное вещество, тогда как его продукт pNP окрашен в желтый цвет и его концентрацию можно определить по поглощению A при 405 нм при помощи фотометра (ридера) для микропланшетов (см. рисунок).



На рисунке представлено схематическое изображение определения активности галактозидазы: содержание pNP определяется при помощи фотометра для микропланшетов (2), который измеряет поглощение (A) при 405 нм. Для определения ферментативной активности используется калибровочный график (стандартная кривая) зависимости поглощения от концентрации продукта. Цифра 1-микропланшет (Материал G).

### Контрольные вопросы

1. Активность нативных ферментов. Роль третичной и четвертичной структур молекулы фермента.
2. Специфические факторы, повышающие активность ферментов.
3. Регуляция количества молекул фермента в клетке.
4. Регуляция скорости ферментативной реакции доступностью молекул субстрата и коферментов.
5. Регуляция каталитической активности ферментов.
6. Аллостерическая регуляция;
7. Регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий;
8. Регуляция путём фосфорилирования/дефосфорилирования молекулы фермента;
9. Регуляция частичным (ограниченным) протеолизом
11. Оксидоредуктазы. Общая характеристика класса. Ферменты, действующие на спиртовую, альдегидную, кетонную и другие группы.
12. Трансферазы. Общая характеристика класса. Ферменты, переносящие метильные, ацетильные, гликозильные, аминные, фосфатные и другие группировки.
13. Гидролазы. Общая характеристика класса. Ферменты, гидролитически расщепляющие сложно-эфирные, гликозильные, пептидные и другие связи.
14. Лиазы. Общая характеристика класса. Ферменты, расщепляющие связь углерод-углерод, углерод-азот, углерод-кислород и др.
15. Изомеразы. Рацемазы и эписомеразы. Цис-транс-изомеразы. Внутримолекулярные трансферазы.

16. Лигазы. Ферменты, осуществляющие синтетические реакции, образующие связь С-О, С-N, С-S.

## Тема 9 - Энзимопатологии

План

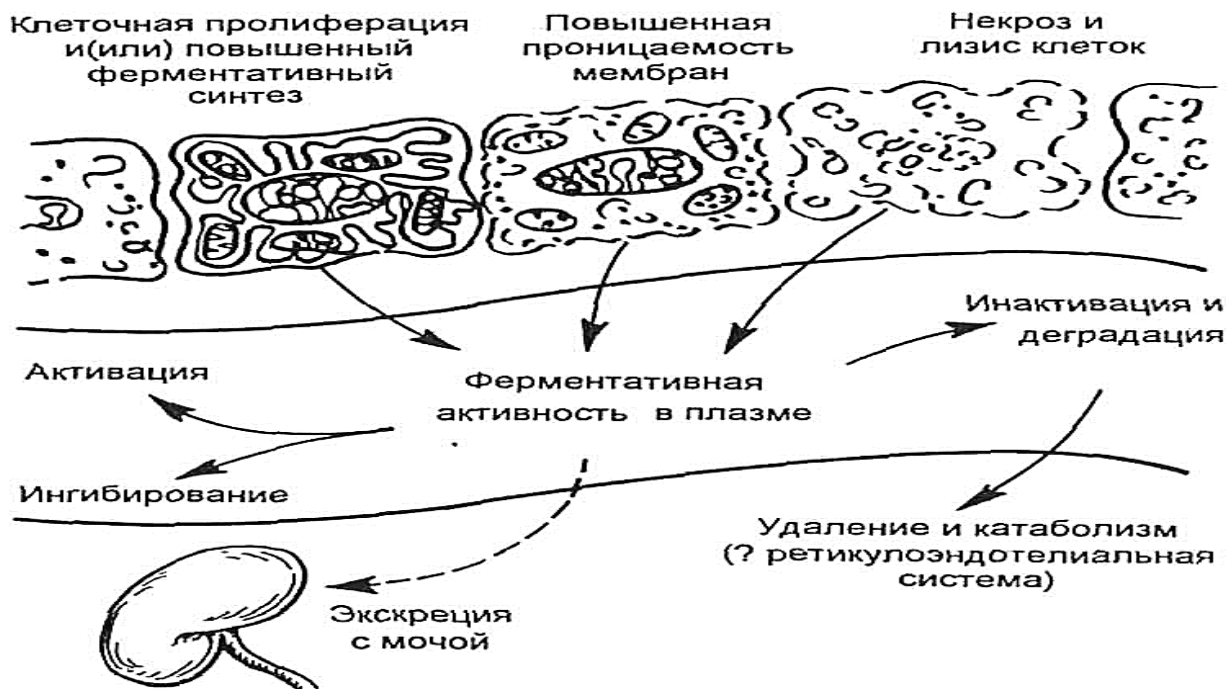
1. Факторы, влияющие на уровень ферментов во внеклеточной жидкости
2. Ферменты в медицине:
  - Энзимопатология.
  - Энзимодиагностика.
  - Энзимотерапия: лекарственные средства на основе ферментов, проблема их адресной доставки к органу-мишени.
3. Белковая инженерия в повышении эффективности лечения заболеваний.
4. Имобилизованные ферменты. Имобилизация ферментов как путь повышения их стабильности и расширения возможностей использования.
5. Биосенсоры с ферментативным компонентом: общие принципы строения и функционирования. ИФА

Достижения энзимологии находят все большее применение в медицине, в частности в профилактике, диагностике и лечении болезней.

Успешно развивается новое направление энзимологии – **медицинская энзимология**, которая имеет свои цели и задачи, специфические методологические подходы и методы исследования.

*Факторы, влияющие на уровень ферментов во внеклеточной жидкости*

Метаболизм ферментов складывается из их синтеза, функционирования и распада. Эти процессы идут непрерывно и одновременно и обеспечивают определённый уровень активности ферментов в тканях. Как показано, активность не функциональных ферментов плазмы крови в норме небольшая. Однако количество таких ферментов значительно увеличивается при повреждении мембран клеток, их усиленной пролиферации или гибели. Многие факторы способны повышать проницаемость мембран и таким образом вызывать появление внутриклеточных ферментов в плазме. К таким факторам относятся недостаток притока кислорода в клетку, снижение концентрации глюкозы в крови, присутствие многих лекарственных и химических веществ, блокирующих гликолиз, работу ЦТК и окислительное фосфорилирование. Патогенные бактерии, бактериальные токсины и вирусы воздействуют непосредственно на мембрану. Кроме того, существуют генетически обусловленные нарушения структуры мембран. На рисунке показаны факторы, влияющие на активность ферментов в плазме крови:



Утечка ферментов, то есть выход внутриклеточных ферментов в кровь, может быть обратимой или прогрессировать до необратимой стадии.

При выделении ферментов скорость их появления в крови зависит от трёх основных факторов.

Прежде всего, от градиента концентрации, обеспечивающего движение ферментов через мембрану. Величина его различна для разных ферментов и типов тканей. Например, активность ЛДГ в клетках печени примерно в 3000 раз, в эритроцитах – в 200 раз выше, алкогольдегидрогеназы – в 20000, аспартат- и аланинаминотрансфераз – в 10000 раз выше, чем в плазме крови. Чем выше градиент, тем быстрее фермент появляется в крови.

Второй фактор – размер молекул фермента. Более мелкие молекулы диффундируют с большей скоростью, чем крупные, и выделяются на ранней стадии повреждения мембраны.

Третий фактор – внутриклеточная локализация ферментов. В первую очередь в плазму выходят цитоплазматические ферменты, а при некрозе клетки, когда разрушаются внутриклеточные органеллы, – и митохондриальные. Примером может служить увеличение в крови активности аспаратаминотрансферазы (АсАт). И цитоплазматическая, и митохондриальная форма фермента имеет одинаковую молекулярную массу, а митохондриальная выходит в кровь значительно медленнее.

Кроме этого, изменение активности ферментов в сыворотке крови может быть обусловлено присутствием во внеклеточной жидкости активаторов или ингибиторов ферментов, обструкцией (непроходимостью) путей секреции ферментов в полости, а также удалением ферментов из циркуляторного русла.



О механизмах удаления ферментов из системы циркуляции известно мало. Большинство ферментов, по-видимому, катаболизируются плазменными протеазами и удаляется ретикулоэндотелиальной системой. Часть ферментов выделяется со слюной, желчью и другими секреторными жидкостями. Через почечный фильтр выводятся небольшие молекулы с Mr не более 60-70 кДа, поэтому в норме, количество экскретируемых ферментов невелико. Например, фермент амилаза имеет Mr = 48кДа и может выводиться почками.

Нужно отметить, что наиболее важными, с диагностической точки зрения, являются те изменения, которые возникают в результате нарушения скорости образования специфических ферментов вследствие либо повышения их синтеза клетками, либо увеличения количества таких клеток. Имеет значение также увеличение количества ферментов в крови, связанное с выделением их из повреждённых или мёртвых клеток.

Медицинская энзимология развивается по трем главным направлениям, в частности в области энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии.

*Область исследований энзимопатологии является теоретической, фундаментальной частью патологии.*

Она призвана изучать молекулярные основы развития патологического процесса, основанные на данных нарушения механизмов регуляции активности или синтеза индивидуального фермента или группы ферментов. Обладая высокой каталитической активностью и выраженной органотропностью, ферменты могут быть использованы в качестве тонких и избирательных инструментов для направленного воздействия на патологический процесс.

Из более чем 5000 наследственных болезней человека молекулярный механизм развития выяснен только у 2-3 десятков. Считают, что развитие болезни чаще всего связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза одного-единственного фермента в организме больного. Такие болезни называют также энзимопатиями.

В основе многих заболеваний лежат нарушения функционирования ферментов в клетке - **энзимопатии**.

Различают первичные (наследственные) и вторичные (приобретённые) энзимопатии. Приобретённые энзимопатии, как и вообще протеинопатии, по-видимому, наблюдаются при всех болезнях

По классификации академика Покровского энзимопатии делятся на:  
- наследственные (генетически детерминированы - точечные мутации, хромосомные aberrации ---> серповидноклеточная анемия, фенилкетонурия, галактоземия, альбинизм);

- алиментарные - связаны с пищевыми факторами: дефицит белка, микроэлементов, гипо- и авитаминозы, несбалансированное питание. Употребление недоброкачественной пищи (красители, консерванты);

- токсические - связаны с ингибированием ферментов пестицидами, гербицидами, лекарствами, выбросами машин, заводов (например тетрациклин блокирует рибосомальный цикл гепатоцитов в печени).

По современной классификации различают:

- первичные (врожденные, наследственные);
- вторичные (приобретенные: алиментарные и токсические).

*Причины первичных энзимопатий:*

- точечные мутации гена, кодирующего фермент.
- наличие ингибитора или отсутствие активатора при синтезе фермента.
- генетические дефекты синтеза кофермента.
- нарушение процессинга белка.
- патология или отсутствие матрицы ДНК и РНК.

*Причины вторичных энзимопатий:*

- нарушения энергообеспечения (уменьшение АТФ, ГТФ - нарушение синтеза апофермента).
- недостаток аминокислот (белковое голодание).
- отсутствие или недостаток кофермента: витаминов, микроэлементов, нарушение ресорбции витаминов в ЖКТ.
- все причины гиповитаминозов.
- клеточная деструкция разного генеза.

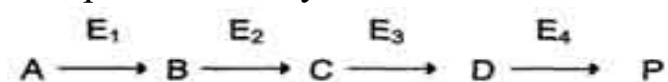
Все инфекционные болезни (вирусные, бактериальные и паразитарные) протекают с расстройством ферментных систем, это связано с выделением экзо- и эндотоксинов, блокирующих ряд ферментов.

Другой причиной является гипо- и гиперфункция эндокринных желез.

Также причиной может быть резкое изменение условий среды, в которой работает фермент. (*Ацидоз или алколоз*).

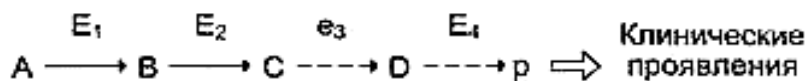
*При первичных энзимопатиях* дефектные ферменты наследуются, в основном, по аутосомно рецессивному типу. Гетерозиготы, чаще всего, не имеют фенотипических отклонений.

Первичные энзимопатии обычно относят к метаболическим болезням, так как происходит нарушение определённых метаболических путей. При этом развитие заболевания может протекать по одному из ниже перечисленных "сценариев". На рисунке представлена условная схема метаболического пути:



Вещество А в результате последовательных ферментативных реакций превращается в продукт Р. При наследственной недостаточности какого-либо фермента, например фермента Е3, возможны разные нарушения метаболических путей:

*Нарушение образования конечных продуктов.* Недостаток конечного продукта этого метаболического пути (Р) (при отсутствии альтернативных путей синтеза) может приводить к развитию клинических симптомов, характерных для данного заболевания:



*Клинические проявления.* В качестве примера можно рассмотреть альбинизм. При альбинизме нарушен синтез пигментов - *меланинов* в меланоцитах.

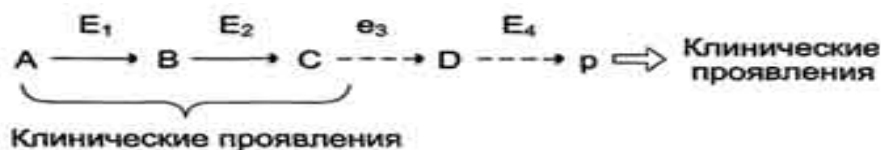
*Меланин* находится в коже, волосах, радужке, пигментном эпителии сетчатки глаза и влияет на их окраску. При альбинизме наблюдают слабую пигментацию кожи, светлые волосы, красноватый цвет радужки глаза из-за просвечивающих капилляров. *Проявление альбинизма связано с недостаточностью фермента тирозингидроксилазы (тирозинызы)* - одного из ферментов, катализирующего метаболический путь образования меланинов.

*Накопление субстратов - предшественников.* При недостаточности фермента Е3 будут накапливаться вещество С, а также во многих случаях и предшествующие соединения. Увеличение субстратов-предшественников дефектного фермента - ведущее звено развития многих заболеваний:



Например, заболевание *алкаптонурия*, при котором нарушено окисление гомогентизиновой кислоты в тканях (гомогентизиновая кислота - промежуточный метаболит катаболизма тирозина). У таких больных наблюдают недостаточность фермента окисления гомогентизиновой кислоты - диоксигеназы гомогентизиновой кислоты, которая приводит к развитию заболевания. В результате увеличиваются концентрация гомогентизиновой кислоты и выведение её с мочой. В присутствии кислорода гомогентизиновая кислота превращается в соединение чёрного цвета - алкаптон. Поэтому моча таких больных на воздухе окрашивается в чёрный цвет. *Алкаптон* также образуется и в биологических жидкостях, оседая в тканях, коже, сухожилиях, суставах. *При значительных отложениях алкаптона в суставах нарушается их подвижность.*

*Нарушение образования конечных продуктов и накопление субстратов предшественников.* Отмечают заболевания, когда одновременно недостаток продукта и накопление исходного субстрата вызывают клинические проявления:



Например, у людей с *болезнью Гирке* (гликогеноз I типа) наблюдают *снижение концентрации глюкозы в крови (гипогликемия)* в перерывах между приёмами пищи. Это связано с нарушением распада гликогена в печени и выходом из неё глюкозы вследствие дефекта фермента глюкозо-6-фосфатфосфатазы. Одновременно у таких людей увеличиваются размеры печени (гепатомегалия) вследствие накопления в ней не используемого гликогена.

Другое заболевание- *галактоземия* – наследственное заболевание, при котором наблюдается ненормально высокая концентрация галактозы в крови.

Болезнь развивается в результате наследственного дефекта синтеза фермента гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, катализирующего превращение галактозы в легкометаболизируемую глюкозу.

Причиной другого наследственного заболевания – *фенилкетонурии* (фенилпировиноградная олигофрения), сопровождающейся расстройством психической деятельности, является потеря клетками печени способности синтезировать фермент (фенилаланингидроксилаза), катализирующий превращение фенилаланина в тирозин.

*Этиология и патогенез* Открытие фенилкетонурии связывают с именем норвежского врача Ивара Асбьёрна Фёлинга, описавшего в 1934 году гиперфенилаланинемию, ассоциированную с задержкой умственного развития. В Норвегии заболевание известно под названием 'болезни Фёлинга' в честь открывателя (краткая история - [www.pkuworldlink.org/history.html](http://www.pkuworldlink.org/history.html)).

Частота возникновения фенилкетонурии встречается в пределах от 1:5000 до 1:10 000. Это число гораздо выше в северных европейских странах из-за частых браков между родственниками. Болезнь встречается и у мальчиков, и у девочек в одинаковой пропорции. Часто новорожденные с фенилкетонурией рождаются у здоровых родителей. Обусловлено это тем, что болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу: при присутствии одного мутантного гена оно себя не проявляет, но если у малыша в наличии два дефектных гена - заболевание развивается.

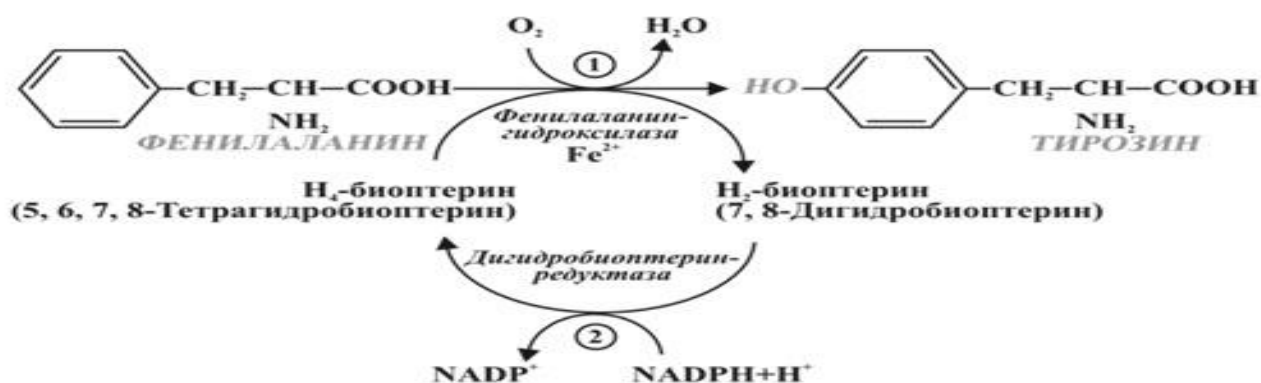
Основные *причины* возникновения фенилкетонурии следующие:

Близкородственные браки, повышают вероятность рождения ребенка больного фенилкетонурией и мутация гена. Ген, кодирующий ФАГ, локализован в длинном плече 12-й хромосомы (12q22-q24.2).

Основной тип мутаций в гене, обозначаемом PAH - это однонуклеотидные замены, которые локализованы в 7, 9 и 12 экзонах. Показано, что в различных странах Европы и Азии встречается определенный спектр мутаций, одна из которых - мажорная. В России и странах Восточной Европы мажорной является однонуклеотидная замена в 12 экзоне, приводящая к замене аргинина на триптофан (R408W). С ней связаны 70% случаев. В Японии и Китае данной мутации нет. Это свидетельствует о том, что замена аргинин-триплета на триптофан-триплет произошла уже после разделения рас.

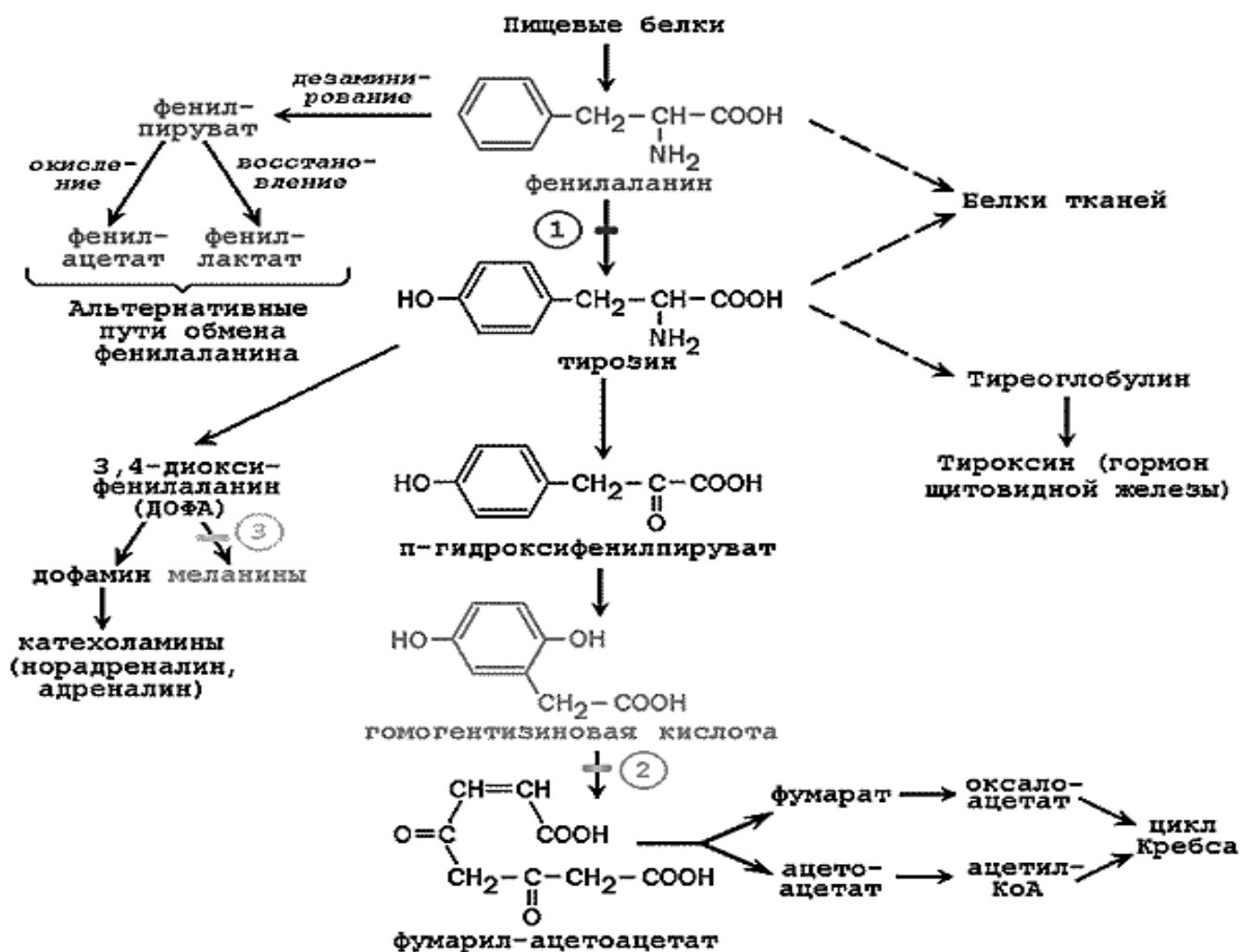
Успешное лечение впервые было разработано в Англии (Бирмингемский детский госпиталь) группой медиков под руководством Х. Биккеля в начале 50г XX века. Настоящий успех пришел после широкого применения ранней диагностики фенилкетонурии по повышенному содержанию фенилаланина в крови у новорожденных (метод Гатри, внедренный в 1958—1961 гг). Со временем стало ясно, что это гетерогенное заболевание, вызываемое множеством мутаций в разных генах. Выделены и описаны атипичные формы ФКУ, разработаны новые методы лечения. В ближайшей перспективе — генотерапия этого тяжелого заболевания, ставшего классическим образцом успешного оказания медицинской и организационной помощи при наследственной патологии.

**Патогенез.** Фенилаланин - незаменимая аминокислота, которая совершенно не может синтезироваться в организме человека из иных аминокислот. Фенилаланин – незаменимая аминокислота.



Используется в организме только в 2-х процессах: субстрат для синтеза белков, вторая часть (большая по объему) превращается при помощи печёночного фермента фенилаланин-4-гидроксилазы в тирозин, из которого в дальнейшем образуются катехоламины и меланин. Превращение Фен в Тир необходимо, в первую очередь, для удаления избытка Фен, т.к. его высокие концентрации токсичны для клеток. В Тир превращается ~ 90% Фен.

В результате мутации гена, контролирующего синтез фенилаланин-гидроксилазы, развивается метаболический блок, т.е. на этапе превращения фенилаланина в тирозин. В результате основным путем преобразования фенилаланина становится дезаминирование и синтез токсических производных - *фенилтировиноградной, фенилмолочной и фенилуксусной кислот*. На рисунке цифрами показаны блокированные реакции при заболеваниях: 1 - фенилкетонурия; 2 - алкаптонурия; 3 - альбинизм.



Образуются почти полностью отсутствующие в норме *фенилэтиламин и ортофенилацетат*, избыток которых вызывает нарушение метаболизма липидов в головном мозге.

Окончательно механизм развития нарушений функций мозга при фенилкетонурии остается неясным.

Среди причин также предполагается дефицит нейромедиаторов мозга, вызванный относительным снижением количества тирозина и других аминокислот, конкурирующих с фенилаланином при переносе через гематоэнцефалический барьер, и прямое токсическое действие фенилаланина.

Если не предпринято своевременное лечение, то больные на всю жизнь остаются глубокими инвалидами. В крови и тканях значительно увеличивается содержание фенилаланина (до 0,2 г/л и более при норме 0,01-0,02 г/л).

### *Виды фенилкетонурии*

Выделяют фенилкетонурию I, II и III типов, которые отличаются с точки зрения проявлений и методов лечения.

*Фенилкетонурия I типа* – наиболее распространенная классическая форма болезни (98% случаев). В основе возникновения данной формы фенилкетонурии лежит дефицит фермента фенилаланин-4-гидроксилазы, который обеспечивает превращение аминокислоты фенилаланина в тирозин.

Частота классической ФКУ среди новорожденных по данным массового скрининга в среднем колеблется от 1:5000 до 1:10000 по разным регионам России.

В патогенезе ФКУ имеют значение следующие механизмы:

- Прямое токсическое действие на ЦНС фенилаланина и его производных;
- Нарушение в обмене белков, липо- и гликопротеидов;
- Расстройства транспорта аминокислот;
- Нарушение метаболизма гормонов;
- Нарушение обмена моноаминовых нейромедиаторов (катехоламинов и серотонина);
- Нарушение функции печени - диспротеинемия, генерализованная гипераминоацидемия, повышение ДФА, метаболический ацидоз, нарушение окислительной и белковосинтезирующей функций клеточных органелл.

*Фенилкетонурия II типа* – Впервые атипичная ФКУ описана I.Smith, 1974г. Заболевание связано с дефицитом дигидроптеридинредуктазы. Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно. Генный дефект локализуется в коротком плече 4 хромосомы, участке 4p15.3. В результате недостаточности дигидроптеридинредуктазы нарушается восстановление активной формы тетрагидробиоптерина, участвующего в качестве кофактора в гидроксилировании фенилаланина, тирозина и триптофана. Частота заболевания составляет 1:100000 новорожденных.

Рано начатое лечение способствует нормализации фенилаланина в крови, однако не предупреждает появление клинической симптоматики, которая развивается в начале второго полугодия жизни. При данной форме болезни преобладает тяжелая умственная отсталость, судороги.

Фенилкетонурия II типа очень быстро прогрессирует и приводит к смерти ребенка в 2-3 летнем возрасте. Фенилкетонурию 2 называют диеторезистентной фенилкетонурией.

Фенилкетонурия III типа – Этот вариант болезни описал S. Kaufman в 1978г. Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно и связано с недостаточностью 6-пирувоилтетрагидроптерин синтетазы, участвующей в процессе синтеза тетрагидробиоптерина. Развивающиеся при этом расстройства сходны с нарушениями, наблюдаемыми при ФКУ-2. Частота болезни составляет 1:30000 новорожденных. Фенилкетонурия-3 также диеторезистентна.

*Материнская фенилкетонурия.* Заболевание развивается у потомков женщин, страдающих ФКУ и не получающих диету в зрелом возрасте. Патогенез мало изучен, предполагается, что он сходен с патогенезом остальных форм ФКУ. Тяжесть поражения плода коррелирует с уровнем фенилаланина в плазме матери. Так как эмбрион особенно чувствителен к тератогенным воздействиям, рекомендуется начинать диету еще до наступления беременности. В суточном рационе использовать менее 15-20 мг/кг фенилаланина. При этом важно избегать дефицита незаменимых аминокислот.

*Клиническая фенилкетонурия.* При рождении больные фенилкетонурией не отличаются от других новорожденных. Манифестация ФКУ происходит обычно в возрасте 2-6 месяцев.

#### *Лечение фенилкетонурии и прогноз*

Если ничего не предпринимать, фенилкетонурия приводит к весьма тяжелым последствиям - развивается олигофрения. Но тяжелую форму можно предотвратить, если поставить правильный диагноз при рождении. Главным способом лечения является *диетотерапия, ограничивающая поступление в организм фенилаланина*. Приступить к ней нужно немедленно после установления диагноза. При ранней диагностике это гарантирует нормальное нервно-психическое развитие ребенка. Диетотерапия, как единственный эффективный метод лечения ФКУ, должна применяться с первых месяцев жизни ребенка, тогда поражение мозга не разовьется.

*Важно ограничить количество потребляемого фенилаланина* таким образом, чтобы обеспечить его поступление в организм в количествах, необходимых и достаточных для роста и развития, но предотвратив его накопление в жидкостях тела. Кроме диетотерапии необходим постоянный медицинский контроль за умственным и физическим развитием ребенка.

Очень важно! Соблюдение диетотерапии приводит к тому, что по достижении 12-14 лет такие дети могут переходить на нормальное питание и никаких признаков отравления фенилаланином у них не наблюдается.

*Однако женщина, которая в детстве переболела ФКУ, должна снова перейти на диету и употреблять только продукты с пониженным*



*содержанием фенилаланина перед зачатием, и оставаться на этой диете во время беременности и кормления грудью.* Если она не сделает этого, то ее ребенок подвергается риску замедленного физического и умственного развития, даже если его отец не является носителем гена ФКУ.

Единственным лечением, способным предотвратить развитие слабоумия является диета, исключая поступление в организм фенилаланина сверх того минимального количества, которое необходимо для образования собственных белков организма и его роста.

Поэтому смысл диетического лечения сводится к резкому ограничению естественного белка с пищей. Для такого ограничения приходится полностью исключить из питания ребенка такие богатые белками продукты как мясо, колбасы, рыбу, бульоны, яйца, творог, сыр, мучные изделия, каши из естественных круп, фасоль, орехи, шоколад. Меню для детей составляется из фруктов, овощей, крахмальных изделий, жиров, со строгим учетом содержания в них фенилаланина.

Назначают белковые гидролизаты (цимогран, лефаноллак, берлофен, гипофенат) или аминокислотные смеси, лишенные фенилаланина, которые становятся главными продуктами питания, обеспечивающими потребность в белке: "Лофенолак", "Фенилфри" (США), "Берлофен", "Апonti", "Гипофенат" у детей до 4-5 лет и "Нофелан" - у детей старше 5 лет. Белковые гидролизаты вводят с фруктовыми и овощными соками, пюре, супами.

С исключением из рациона высокобелковых продуктов неизбежен дефицит жиров, который восполняется за счет сливочного и растительного масел, а у детей первого года жизни — и за счет рыбьего жира. Содержание жиров в диете составляет до 35%. Содержание углеводов в диете составляет 60% от общей калорийности

К допустимым естественным продуктам относятся малобелковые крупы, кукурузные хлопья, грибы, подсолнечное масло, овощи, фрукты, соки, мед, джемы.

Атипичные формы не поддаются диетотерапии и лечатся только введением препаратов тетрагидробиоптерина или его синтетических аналогов. Лечение медикаментами при фенилкетонурии имеет синдромный характер и содержит применение препаратов против судорог, также препаратов, которые стимулируют интеллектуальную деятельность.

В лечении фенилкетонурии используются следующие лекарства:

-Препараты кальция, фосфора, железа.

-Витамины.

-Препараты, улучшающие мозговое кровообращение (ноотропы—церебролизин.

-Препараты, улучшающие тканевой обмен (АТФ, рибоксин).

-Препараты, улучшающие микроциркуляцию (трентал, теоникол, пентоксифиллин). Полезна лечебная физкультура – массаж, гимнастика.

Диетическое лечение детей проводят под строгим контролем содержания фенилаланина в крови. Оптимальный показатель фенилаланина должен быть в пределах 3-6 мг% (другими словами-0,03-0,04 г/л), при его значительных колебаниях проводят коррекцию белка в рационе ребенка больного фенилкетонурией каждый месяц. В первые месяцы жизни малыша контроль за содержанием фенилаланина в сыворотке крови проводят в начале лечения – еженедельно, а затем при нормализации показателей – ежемесячно в течении первого года жизни, у детей старше года при нормальных показателях – 1раз в 2-3 месяца. Все дети, больные фенилкетонурией должны находиться под наблюдением психоневролога и педиатра.

#### *Профилактика фенилкетонурии*

1. Выявление гетерозиготных носителей. Большое значение имеет специальное наблюдение за семьями риска, т. е. за такими семьями, где уже имелись дети с фенилкетонурией. Новорожденные из этих семей должны быть подвергнуты обязательному биохимическому исследованию и при показаниях к раннему лечению.

2. Внедрение программ массового скрининга новорожденных для раннего выявления ФКУ и своевременного назначения диетотерапии. Выявление и лечение детей по программам массового скрининга также позволяет предупредить развитие тяжелой психической инвалидности.

3. Пренатальная диагностика: Предложен ДНК-зонд для пренатальной диагностики фенилкетонурии в семьях высокого риска.

#### **Применение ферментов в медицине. Энзимодиагностика**

Ферментные препараты широко используют в медицине. Ферменты в медицинской практике находят применение в качестве диагностических (энзимодиагностика) и терапевтических (энзимотерапия) средств.

Кроме того, ферменты используют в качестве специфических реактивов для определения ряда веществ. Так, глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови. Фермент уреазу используют для определения содержания количества мочевины в крови и моче. С помощью различных дегидрогеназ обнаруживают соответствующие субстраты, например пируват, лактат, этиловый спирт и др.

Энзимодиагностика заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека.

*Принципы энзимодиагностики основаны на следующих позициях:*

-при повреждении клеток в крови или других биологических жидкостях (например, в моче) увеличивается концентрация внутриклеточных ферментов повреждённых клеток;

-количество высвобождаемого фермента достаточно для его обнаружения;

-активность ферментов в биологических жидкостях, обнаруживаемых при повреждении клеток, стабильна в течение достаточно длительного времени и отличается от нормальных значений;

- ряд ферментов имеет преимущественную или абсолютную локализацию в определённых органах (органоспецифичность);

- существуют различия во внутриклеточной локализации ряда ферментов.

### **Причины, приводящие к увеличению количества ферментов в крови**

Две группы ферментов плазмы крови:

1-относительно небольшая группа ферментов активно секретируется в плазму крови определёнными органами. Например, печень синтезирует неактивные предшественники ферментов свёртывающей системы крови.

2- большая группа ферментов, высвобождающихся из клеток во время их нормального функционирования. Обычно эти ферменты выполняют свою функцию внутри клетки и не имеют физиологического значения в плазме крови здорового человека. Активность ферментов 2 группы в плазме низкая и достаточно постоянная, так как постоянно соотношение скоростей высвобождения их из клеток и скоростей разрушения.

При многих заболеваниях происходит повреждение клеток, и их содержимое, в том числе и ферменты, высвобождаются в кровь. К причинам, вызывающим высвобождение внутриклеточного содержимого в кровь, относят нарушение проницаемости мембраны клеток (при воспалительных процессах) или нарушение целостности клеток (при некрозе). Определение в крови активности ряда ферментов хорошо налажено в биохимических лабораториях, что используют для диагностики заболеваний сердца, печени, скелетной мускулатуры и других тканей. *Уровень активности ферментов в плазме коррелирует со степенью повреждения клеток.*

*Для энзимодиагностики имеют большое значение знания о субклеточной локализации ферментов:*

- Появление в плазме крови ферментов, имеющих только цитозольную локализацию, свидетельствует о воспалительном процессе;

- При обнаружении митохондриальных или ядерных ферментов можно говорить о более глубоких повреждениях клетки, например о некрозе.

Однако повышение концентрации ферментов не всегда связано с повреждением тканей. При избыточной клеточной пролиферации, например при онкопролиферативных процессах, при повышенной скорости синтеза

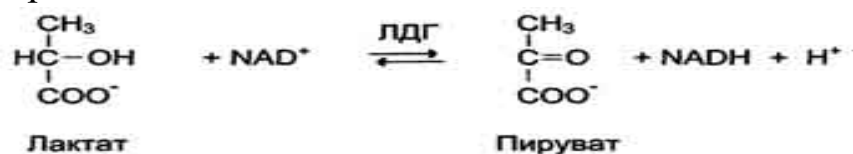
некоторых ферментов в клетках или при нарушении клиренса (способности выводиться почками) наблюдают повышение концентрации в крови определённых ферментов. Врачам следует учитывать, что нормальные значения активности ферментов в крови детей и беременных женщин отличаются от показателей, характерных для взрослых здоровых людей.

**Изоферменты** - ферменты, катализирующие одну и ту же химическую реакцию, но отличающиеся по первичной структуре белка, называют **изоферментами**, или **изоэнзимами**. Они катализируют один и тот же тип реакции с принципиально одинаковым механизмом, но отличаются друг от друга кинетическими параметрами, условиями активации, особенностями связи апофермента и кофермента.

Природа появления **изоферментов** разнообразна, но чаще всего обусловлена различиями в структуре генов, кодирующих эти **изоферменты**. Следовательно, **изоферменты** различаются по первичной структуре белковой молекулы и, соответственно, по физико-химическим свойствам. На различиях в физико-химических свойствах основаны методы определения **изоферментов**.

По своей структуре **изоферменты** в основном являются олигомерными белками. Причём та или иная ткань преимущественно синтезирует определённые виды протомеров. В результате определённой комбинации этих протомеров формируются ферменты с различной структурой - **изомерные формы**. Обнаружение определённых **изоферментных форм** ферментов позволяет использовать их для диагностики заболеваний.

**Изоформы лактатдегидрогеназы**. Фермент **лактатдегидрогеназа (ЛДГ)** катализирует обратимую реакцию окисления молочной кислоты до

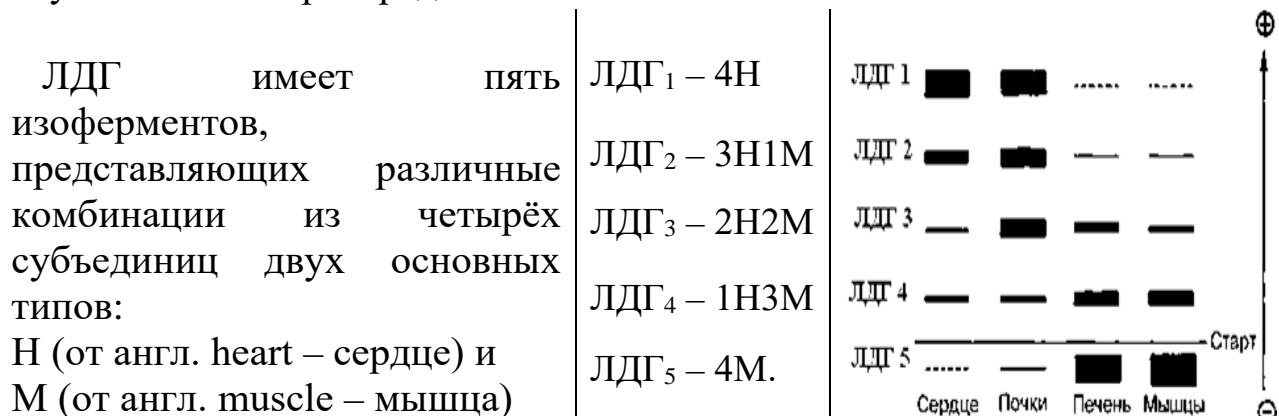


пировиноградной кислоты.

**Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, L-лактат: NAD-оксидоредуктаза; К.Ф. 1.1.1.27)** – цитоплазматический, Zn-содержащий гликолитический фермент, обратимо катализирующий восстановление пировиноградной кислоты в молочную кислоту:  $\text{пируват} + \text{NADH} \xleftarrow{\text{ЛДГ}} \text{лактат} + \text{NAD}^+$

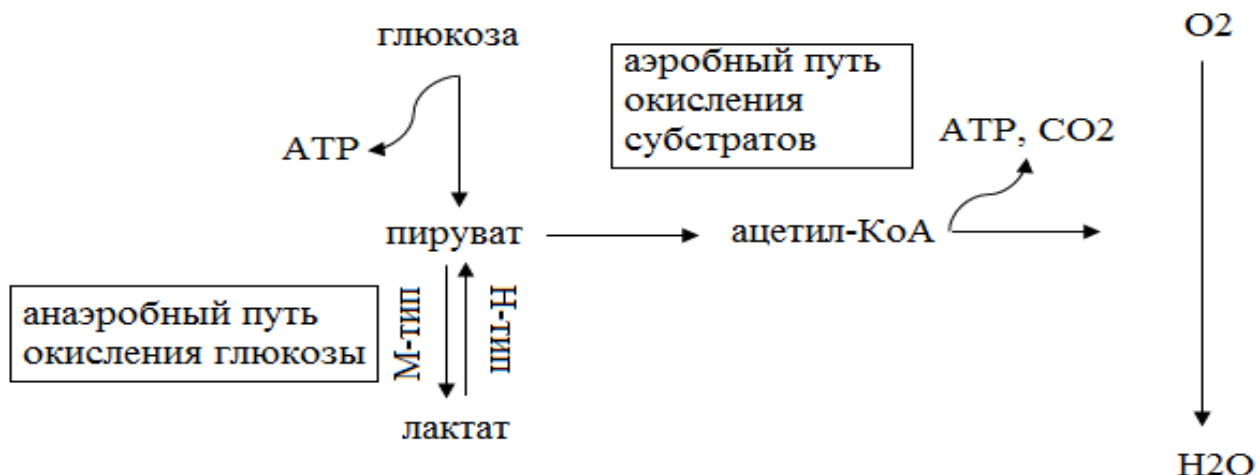
Фермент широко распространён в организме человека. По степени убыли активности ЛДГ органы и ткани можно расположить в следующей последовательности: почки, сердце, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезёнка, печень, лёгкие, сыворотка крови. ЛДГ содержится в значительном количестве в эритроцитах, поэтому исследуемая сыворотка не должна содержать следов гемолиза. **Изоферменты ЛДГ** нумеруются в

соответствии с электрофоретической подвижностью по направлению к аноду. На рисунке показано распределение и относительное количество



изоферментов ЛДГ в различных органах. Экстракты нанесены на линию, отмеченную надписью «Старт». При заданных условиях опыта (рН) 4 изофермента ЛДГ движутся к аноду, а один (ЛДГ<sub>5</sub>) к катоду.

Протекание прямой реакции превращения пирувата в лактат обеспечивает М субъединица ЛДГ, протекание обратной реакции обеспечивает Н субъединица.



Изоферментный спектр и тип обмена веществ в ткани коррелируют между собой. Так, в тканях с преимущественно аэробным обменом веществ (мозг, сердце, почки и др.) наибольшей активностью обладают ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>, в тканях с выраженным анаэробным обменом веществ (печень, скелетная мускулатура и др.) преобладают ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub>. Наиболее высокое содержание ЛДГ<sub>3</sub> отмечают в лимфоидной ткани, тромбоцитах и опухолях. Это распределение имеет большой биологический смысл.

Изофермент ЛДГ<sub>1</sub> *in vitro* активен при низкой концентрации пирувата и ингибируется его избытком, в то время как ЛДГ<sub>5</sub> сохраняет активность при сравнительно высоких концентрациях пирувата. Поскольку восстановление пирувата в лактат, катализируемое ЛДГ<sub>1</sub>, сильно ингибируется уже небольшими концентрациями пирувата, то в ткани, богатой этим изоферментом, например в сердце, пируват подвергается преимущественно

аэробному окислению. Кроме активной переработки собственного (эндогенного) лактата, сердечная мышца способна поглощать лактат из крови, затем превращать его в пировиноградную кислоту и подвергать дальнейшему окислению для пополнения запасов АТФ.

С другой стороны, в тканях, где преобладают изоферменты ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> (печень, скелетная мускулатура), АТФ в значительной степени образуется за счёт гликолиза. Высокая активность ЛДГ<sub>5</sub> в них обеспечивает быстрое превращение пирувата в лактат, который затем выбрасывается в кровь, поскольку в скелетной мускулатуре дальнейшее превращение лактата почти не осуществляется. Однако в некоторых тканях нет зависимости между типом обмена и изоферментным спектром. Так в эритроцитах, тромбоцитах, хрусталике глаза, где преобладает анаэробный обмен, фермент представлен в основном изоферментами ЛДГ<sub>1</sub> ЛДГ<sub>2</sub>.

Появление в эволюции различных изоформ ЛДГ обусловлено особенностями окислительного метаболизма тканей.

Изоферменты ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> (М-типы ЛДГ) работают эффективно в анаэробных условиях, ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub> (Н-типы) - в аэробных, когда пируват быстро окисляется до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О, а не восстанавливается до молочной кислоты.

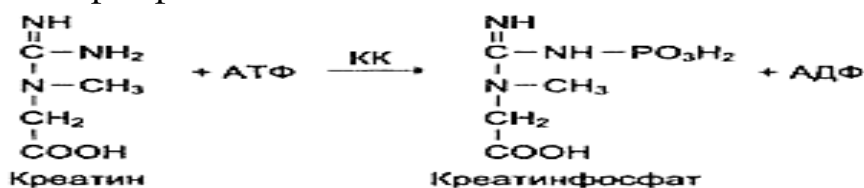
#### *Клиническое значение определения ЛДГ.*

Рост общей активности ЛДГ сыворотки крови не несёт достаточно специфической информации. Можно отметить, что общая активность ЛДГ резко повышена при миелобластных и пернициозных анемиях, обширных опухолевых процессах, вирусных гепатитах, шоке и гипоксии. Выраженное повышение наблюдается при циррозах печени, заболеваниях почек, опорно-мышечного аппарата, опухолях, при сердечной недостаточности. Активность фермента повышается при любых патологических процессах, связанных с цитолизом клеток органов и тканей (например, при инфарктах миокарда, лейкозах, гемолитических анемиях, гепатитах и др.). Определение отдельных изоферментов ЛДГ в сыворотке крови имеет большую диагностическую значимость, чем определение суммарной активности. Активность ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub> увеличивается при инфаркте миокарда, различных видах анемий, острых поражениях (некрозах) почечной ткани. Уровень ЛДГ<sub>1</sub> повышается при опухолевых заболеваниях яичников. Повышение активности ЛДГ<sub>5</sub> выявляется при повреждении скелетных мышц, любых воспалительных или дегенеративных заболеваниях скелетных мышц, многих заболеваниях печени (циррозе, всех типах гепатитов) и при раковых опухолях. Повышение активности изоферментов средней зоны, то есть ЛДГ<sub>2</sub> и ЛДГ<sub>3</sub> ЛДГ<sub>4</sub> встречается при массивном разрушении тромбоцитов (эмболия лёгочной артерии, массивная гемотрансфузия) и вовлечении в патологический процесс

лимфатической системы, например, при таких заболеваниях, как инфекционный мононуклеоз, лимфомы, лимфоцитарный лейкоз.

Соотношение изоформ может изменяться как при адаптации к меняющимся условиям среды, так и в ходе онтогенеза. Эмбрионы всех млекопитающих проходят стадию развития, когда митохондрии ещё не готовы к окислению субстратов. В этих условиях особенно велика роль анаэробного гликолиза. Как показано для развивающихся мышечных тканей, на стадии эмбриона основной формой фермента является тетрамер типа М4. После рождения постепенно нарабатываются другие формы ЛДГ, и к периоду, соответствующему взрослому организму, устанавливается соотношение разных изоформ, типичное для каждой ткани. У здоровых новорожденных, в первые дни жизни содержание ЛДГ2 ниже, а содержание ЛДГ5 выше чем у взрослого человека. Максимальная активность фермента наблюдается на 2-4 день жизни. К 6-7 годам соотношение фракций ЛДГ примерно соответствует таковому у взрослого человека.

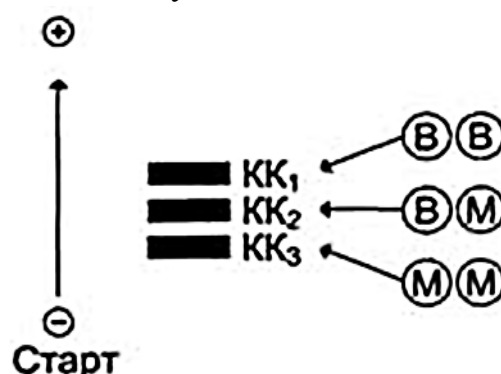
**Изоформы креатинкиназы.** Креатинкиназа (КК) катализирует реакцию образования креатинфосфата:



Молекула КК - димер, состоящий из субъединиц двух типов: М (от англ, *muscle* - мышца) и

В (от англ, *brain* - мозг).

Из этих субъединиц образуются 3 изофермента - ВВ, МВ, ММ. Изофермент ВВ находится преимущественно в головном мозге, ММ - в скелетных мышцах и МВ - в сердечной мышце. Изоформы КК имеют разную электрофоретическую подвижность:



Активность КК в норме не должна превышать 90 МЕ/л. Определение активности КК в плазме крови имеет диагностическое значение при инфаркте миокарда (происходит повышение уровня МВ-изоформы).

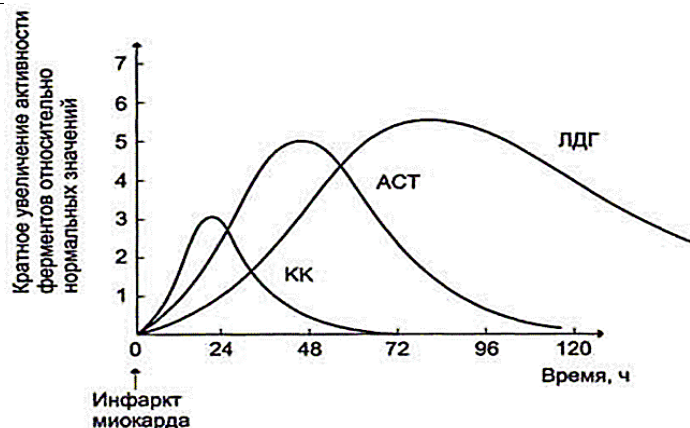
Количество изоформы ММ может повышаться при травмах и повреждениях скелетных мышц. Изоформа ВВ не может проникнуть через гематоэнцефалический барьер, поэтому в крови практически не определяется даже при инсультах и диагностического значения не имеет.

**Энзимодиагностика при инфаркте миокарда.** Примерно 30% больных инфарктом миокарда имеют атипичную клиническую картину этого

заболевания. Поэтому необходимо проводить дополнительные методы исследования для подтверждения повреждения сердечной мышцы.

Типичную кривую изменения активности этих ферментов можно видеть на рисунке:

При инфаркте миокарда наблюдают достоверные изменения в крови активности ферментов КК, ЛДГ и аспартатаминотрансферазы - АСТ, которые зависят от времени, прошедшего от начала развития инфаркта и от зоны тканевого повреждения.



После закупорки (окклюзии) коронарного сосуда в крови вначале отмечают повышение активности КК изоформы МВ, однако фермент быстро удаляется из кровотока. Обнаружение *повышенной активности КК в плазме крови - основной энзимодиагностический критерий инфаркта миокарда*. Если у пациента с загрудинными болями не обнаружено изменения в активности КК, диагноз инфаркта миокарда маловероятен.

Дополнительным подтверждением диагноза инфаркта миокарда служит обнаружение активностей ферментов АСТ и ЛДГ в крови больных. Динамика изменений этих активностей также представлена на этом рисунке. Активность АСТ в норме составляет 5-40 МЕ/л. При инфаркте миокарда активность АСТ повышается через 4-6 ч; максимум активности наблюдают в течение 2-3 дней. Уровень ЛДГ также увеличивается в плазме крови через несколько часов после закупорки кровеносного сосуда; максимум активности наблюдают на 3-4-й день, затем наступает постепенная нормализация активности. Уровень повышения активности ЛДГ коррелирует с размерами повреждения сердечной мышцы.

**Применение ферментов в качестве лекарственных средств.** Использование ферментов в качестве терапевтических средств имеет много ограничений вследствие их высокой иммуногеничности. Тем не менее энзимотерапию активно развивают в следующих направлениях:

-заместительная терапия - использование ферментов в случае их недостаточности;

-элементы комплексной терапии - применение ферментов в сочетании с другой терапией.

Заместительная энзимотерапия эффективна при желудочно-кишечных заболеваниях, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных



соков. Например, пепсин используют при ахилии, гипо- и анацидных гастритах. Дефицит панкреатических ферментов также в значительной степени может быть компенсирован приёмом внутрь препаратов, содержащих основные ферменты поджелудочной железы (фестал, энзистал, мезим-форте и др.).

*Элементы комплексной терапии.* В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют при ряде заболеваний. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) применяют при местном воздействии для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток, для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей.

Ферментные препараты рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу используют в качестве противовирусных препаратов при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герпетических кератитов.

Ферментные препараты стали широко применять при тромбозах и тромбоэмболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, стрептодеказы, урокиназы.

Фермент гиалуронидазу (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты, используют подкожно и внутримышечно для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций (гиалуроновая кислота образует сшивки в соединительной ткани) .

*Ферментные препараты используют при онкологических заболеваниях.* Признание получило применение в онкологической клинике ферментов бактериальной природы в качестве лекарственных средств. Широко используется L-аспарагиназа (выпускается в промышленных количествах и L-глутамин(аспарагин)аза для лечения острых и хронических форм лейкозов и лимфогранулематозов.

Более десятка описанных в литературе бактериальных ферментов испытаны в основном на животных с перевивными опухолями или на раковых клетках опухолей человека и животных, выращенных в культуре ткани.

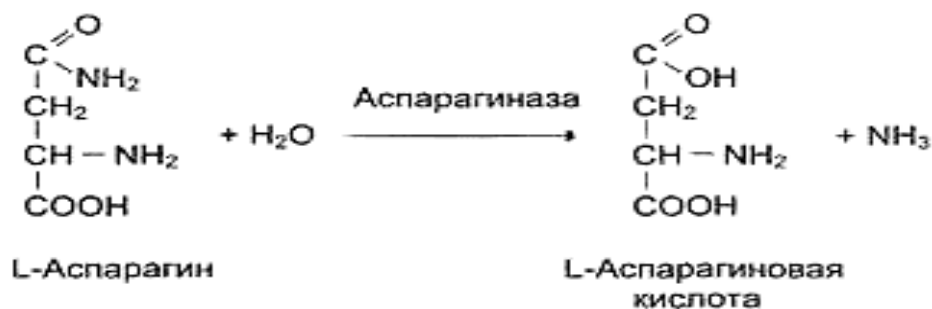
Основными постулатами применения ферментов в онкологии являются различия в метаболизме клеток опухолей по сравнению с обменом в нормальной, здоровой, клетке. В частности, современные стратегия и тактика энзимотерапии опухолевых поражений учитывают разную чувствительность нормальных и опухолевых клеток к недостатку (дефициту) незаменимых (так называемых эссенциальных) факторов роста.

К таким рост стимулирующим факторам относятся не только пищевые факторы (витамины, незаменимые аминокислоты, макро-и микроэлементы), но

и ряд так называемых заменимых веществ, включая заменимые аминокислоты, к недостатку которых опухолевая клетка оказывается в силу особенностей ее обмена более чувствительной, чем нормальная.

Лечебный эффект, например, L-аспарагиназы и L-глутамин(аспарагин)азы при лейкозах, вероятнее всего, объясняется необратимым распадом как аспарагина, так и глутамина.

Аспарагиназа, катализирует реакцию катаболизма аспарагина:



Предпосылкой анти-лейкемического действия аспарагиназы послужило обнаружение в лейкозных клетках **дефектного фермента аспарагинсинтетазы**, катализирующего реакцию синтеза аспарагина.



Лейкозные клетки **не могут** синтезировать аспарагин и получают его из плазмы крови. Если имеющийся в плазме аспарагин разрушать введением аспарагиназы, то в лейкозных клетках наступит дефицит аспарагина и в результате - нарушение метаболизма опухолевой клетки.

Итак, опухолевые клетки для своего роста и размножения нуждаются в аминокислотах из организма, т.к. сами лишены способности синтезировать амиды аминокислот, в то время как нормальные клетки наделены этой способностью. Был сделан вывод о том, что амидный азот глутамина и аспарагина выполняет в клетках ряд уникальных функций, которые лучше выяснены для глутамина. В частности, амидный азот глутамина оказался абсолютно необходимым и не заменимым другими аминокислотами источником атома азота минимум в 10 реакциях синтеза, например, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, соответственно ДНК и РНК, АТФ, гексозаминов, гистидина и др.

Таким образом, не лишена основания *гипотеза, что любой фермент или агент, катализирующий необратимое расщепление незаменимого для опухолевой клетки пищевого фактора (включая аминокислоты), может в принципе быть применен в энзимотерапии опухолей*, если будут устранены ограничения, связанные с белковой природой фермента.

В оценке эффективности ферментов в экспериментальной и клинической онкологии имеется немало противоречий и очень много пробелов. Положительные результаты, отмеченные в ряде случаев, вселяют надежду, что приготовление стандартных ферментных препаратов (включая создание иммобилизованных форм) в промышленных масштабах и их разумное применение в клинике, организованное на строгой научной основе, несомненно дадут в руки врачей еще одно ценное оружие в борьбе с опухолевыми заболеваниями человека.

**Белковая инженерия** — активно развивающееся междисциплинарное направление в науке, расположенное на стыке биотехнологии, биоинформатики (вычислительных методов в биологии), биохимии, генной инженерии и др. Белки/ферменты, которые встречаются в природе, оптимизированы эволюцией для выполнения своих функций в физиологических условиях живого организма. Многие природные биополимеры могут быть полезны и вне клетки, например, как эффективные катализаторы для экологически более чистого и безопасного (по сравнению с химическим синтезом) производства антибиотиков в промышленных условиях. Однако возможности белков «дикого типа» очень ограничены с точки зрения их эффективного использования на практике в производстве — они характеризуются низкой стабильностью, недостаточно высокой активностью, узкой субстратной специфичностью и т.д.

Целью белковой инженерии является разработка/улучшение полезных/ценных белков, например, за счет внесения точечных мутаций в их структуру. Такие препараты, практически ценные функции которых существенно улучшены по сравнению с белками «дикого типа», активно применяются во многих биокаталитических и биомедицинских промышленных процессах. Однако многие проблемы остаются нерешенными, а новые задачи, диктуемые временем, становятся все более сложными.

Исторически важную роль в этой области играли стохастические методы (например, т.н. «направленная эволюция», за разработку которой в 2018 году была присуждена Нобелевская премия по химии) и методы эмпирического (экспертного) рационального дизайна. Спустя десятилетия после начала применения этих подходов на практике не осталось сомнений в их невысокой эффективности. Отказ от неэффективных стохастических и эмпирических

подходов и стремление к большему пониманию механизмов действия белков/ферментов как необходимому условию развития методов белковой инженерии стало ключевой тенденцией в последние 10 лет.

Активно развиваются систематические подходы к решению задач белковой инженерии, основанные на анализе всей доступной информации о последовательностях и 3D-структурах белков в рамках функционально разнообразных суперсемейств, методах молекулярного моделирования и теоретической химии, что стало возможным благодаря развитию компьютерных технологий и накоплению информации о белках в публичных базах данных.

Таким образом, несмотря на выраженный прикладной (практический) аспект белковой инженерии, ее фундаментальная значимость не вызывает сомнений. Цели и задачи белковой инженерии являются площадкой для эффективного взаимодействия фундаментальной и коммерческой науки, стимулом для все более активного изучения структурно-функциональных взаимосвязей в белках, а предлагаемые решения – систематически отобранные конкретные изменения (мутации) в структурах белков, направленные на улучшение полезных свойств – являются важнейшим способом проверки нашего понимания механизмов действия природных биополимеров.

**Иммобилизованные ферменты** – основа одного из главных направлений современной биотехнологии. Сегодня с их помощью уже производятся в больших количествах многие важные продукты. В первую очередь это разнообразные биологически активные вещества. Например, в медицине широко используются индивидуальные *аминокислоты*; но при их химическом синтезе получается смесь природной и неприродной – левой и правой форм аминокислоты, а организм может усваивать только природную, левую форму. Разделить такие смеси проще всего с помощью ферментов.

Широко используется в медицине способность ферментов реагировать на строго определенные вещества – на этом основаны новые, *высокочувствительные методы анализа*, применяемые, в частности, в диагностике. Например, если человек болен, то его иммунная система вырабатывает определенные антитела – с помощью ферментов можно их определить; обнаруживать и самих возбудителей заболевания.

Ферменты значительно *упрощают анализ крови*: если сегодня для биохимического анализа нужно взять целую пробирку крови, то созданный в самые последние годы иммуноферментный метод позволяет ограничиваться всего одной каплей, чтобы определить содержание около 50 веществ одновременно.

Иммобилизованные ферменты находят применение и непосредственно как *лекарственные препараты*. Группа ученых под руководством академика Чазова Е.И. создали иммобилизованный ферментный препарат стрептодеказу для растворения тромбов при лечении инфаркта миокарда. После введения данного препарата тромб, если его захватить вовремя, почти бесследно исчезает. Это очень важное и серьезное достижение ферментной технологии.

*1.Использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических  $\beta$ -лактамных антибиотиков.*

Очень большое влияние оказало на развитие медицины открытие пенициллина. Природный пенициллин вырабатывается некоторыми видами зеленой плесени (*Penicillium*). Все эти соединения – производные *б – АПК (б-аминопеницилла новая кислота)*, а именно амиды, образованные различными кислотами RCOOH и аминогруппой б-АПК. Сама б-АПК обладает лишь незначительной антибиотической активностью.

Важный элемент строения б-АПК – наличие  $\beta$ -лактамного цикла, характерного и для других антибиотиков, например цефалоспоринов.

Из-за этого структурного элемента рассматриваемые соединения относят к классу  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Изменение группы R приводит к заметным изменениям свойств пенициллинов, в частности их биологической активности.

Оказалось, что при введении в среду, на которой растет *Penicillium chrysogenum*, карбоновых кислот или их производных преимущественно образуется тот пенициллин, который содержит боковую цепь введенной кислоты. Полученные таким способом пенициллины называют биосинтетическими. Метод достаточно эффективен. В присутствии фенилуксусной кислоты и пара-оксифенилуксусной кислоты (кислот с высокими выходами) получают бензил- и п-оксибензилпенициллины соответственно, а в присутствии феноксиуксусной кислоты – феноксипенициллин, который обладает ценным свойством: он устойчивее к расщеплению под действием кислот, и поэтому его можно принимать внутрь в виде таблеток.

Однако многие перспективные пенициллины получить биосинтетическим путем не удастся из-за того, что вводимые предшественники вовлекаются в неконтролируемые побочные процессы. Выход был найден, когда биохимики предложили получать полусинтетические пенициллины. б-АПК вступает в реакцию ацетилирования хлорангидами карбоновых кислот, и дает при этом любые требуемые аналоги пенициллина.

Химический синтез б-АПК слишком трудоемок для промышленного использования. Достаточно дешевый источник б-АПК - биосинтетический

бензилпенициллин, гидролиз которого давал бы 6-АПК. Однако химический гидролиз бензилпенициллина идет не по амидной связи с 6-аминогруппой, а по более лабильной амидной связи напряженного  $\beta$ -лактамного кольца. Здесь на помощь приходит уникальная специфичность ферментного катализа: под действием фермента пенициллинамидазы идет расщепление только требуемой связи и не затрагивается  $\beta$ -лактамное кольцо.

Были изучены кинетика и механизм действия пенициллинамидазы, способы ее иммобилизации и стабилизации. Этот фермент легко включается в полиакриламидный гель, модифицированный глутаровым альдегидом, и обладает в нем достаточно высокой стабильностью.

Процесс с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы внедрен в производство в последние годы. Это открыло доступ к широкомасштабному производству многих полусинтетических пенициллинов, обладающих высокой устойчивостью в кислых средах, высокой активностью по отношению к большому количеству микробов, низкой токсичностью для организма человека, устойчивостью к ферменту  $\beta$ -лактамазе, гидролизующему в отличие от пенициллинамидазы расщепление лактамного кольца, что приводит к полной потере антибиотической активности. Первое крупнотоннажное производство в СССР, основанное на применении иммобилизованных ферментов, вступило в строй в 1976 г. на Саранском заводе медицинских препаратов: здесь с помощью пенициллинамидазы был налажен выпуск 6 – аминопенициллановой кислоты, необходимой для синтеза ряда антибиотиков пенициллинового ряда. В создании этой технологии принимали участие сотрудники ВНИИантибиотиков, Таллиннского политехнического института, МГУ, а также специалисты Рижского и Саранского заводов медпрепаратов.

Пенициллинамидазе присуща уникальная специфичность и по отношению к гидролизу цефалоспоринов: отщепляется только боковая группа, а  $\beta$ -лактамный цикл остается не тронутым. Это использовано для создания второго технологического процесса – получения 7-АДЦК (7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислоты) гидролизом соответствующего фенилацетатного производного. Таким образом, открывается путь к получению очень перспективных лекарственных средств на основе «полусинтетических» цефалоспоринов.

Пенициллинамидаза, как и любой химический катализатор, не смещает равновесия, а только увеличивает скорость его достижения. Фермент катализирует как прямую реакцию – гидролиз, так и обратную – синтез антибиотика. Это обстоятельство и используется ферментативного синтеза.

Водный раствор, содержащий 6-АПК или 7-АДЦК, а также соответствующую кислоту, приводят в контакт с иммобилизованной пенициллинамидазой. Через некоторое время в растворе образуется равновесное количество антибиотика. Преимущество метода в его простоте; например, можно использовать непосредственно кислоту, а не ее хлорангидрид. Основной недостаток – низкая скорость реакции для большинства R. Причина этого кроется в его высокой специфичности.

*2.Разделение рацематов аминокислот.* Аминокислоты используют в медицине, сельском хозяйстве, прикладной микробиологии и во многих отраслях науки. Они необходимы как компонент питания при недостаточности какой-либо из природных аминокислот, как составная часть внутреннего питания больных людей, для создания лекарственных и биохимических соединений и т.д. Все аминокислоты усваиваются только в L-форме, а попадание в организм D-формы крайне не желательно.

L- и D-формы – это *энантиомеры*, разновидность изомеров, являющихся зеркальными отражениями друг друга. Смесь L- и D-форм в равных количествах называют *рацемической*. Ей присущи все свойства чистого вещества, ибо L- и D-изомеры во всех отношениях идентичны, кроме тех случаев, когда они вступают во взаимодействие с другим асимметрическим объектом.

Химический синтез всех аминокислот – давно решенная задача. Однако химические методы дают всегда рацемическую смесь аминокислот, и, следовательно, необходима дополнительная стадия разделения энантиомеров. Чисто химически это сделать очень трудно. В то же время ферменты способны «узнавать», а значит и по-разному реагировать на L- и D-формы аминокислот или их производные. Преимущественное расщепление одного из энантиомеров под действием ферментов настолько предпочтительно, что, как правило, они быстро реагируют с L-изомером, совершенно не затрагивая D-изомер. Это обстоятельство, т.е. энантиоселективность, и было положено в основу ферментативного разделения рацемических смесей аминокислот.

Вероятно, первым реактором, где использовали иммобилизованный фермент в промышленном масштабе, был именно реактор для разделения рацемических смесей D,L-аминокислот, он был введен в эксплуатацию в Японии (1969 г.) на аминоксилазе, иммобилизованной на сефадексе.

С 1969 г. таким путем осуществляется промышленное производство незаменимых аминокислот: L-метионина, L-фенилаланина, L-валина, L-аланина. Промышленный процесс выглядит следующим образом. Исходными веществами служат модифицированные по аминоксигруппе D,L-аминокислоты, полученные в результате химического синтеза. На эту смесь воздействуют

иммобилизованной аминоксилазой. Фермент гидролизует амидную связь только у L-изомера. В результате образуется свободная L-аминоксила, обладающая более высокой растворимостью, чем ацильное производное. Образовавшаяся смесь свободной L-аминоксила и ацилированной D-аминоксила разделяют простыми физическими методами, пользуясь их различной растворимостью. Оставшийся после разделения D-изомер обычно при повышенной температуре рацемизируют, т.е. превращают в исходную D,L-смесь и снова пускают в реакцию с ацилазой. В итоге добиваются высокой концентрации L-аминоксила. Фермент аминоксилаза мало чувствителен к типу аминоксила, и поэтому одна установка с иммобилизованным ферментом может использоваться для получения разнообразных L-аминоксилот.

Иммобилизацию аминоксилазы проводят адсорбцией на специально подобранном полимерном носителе. Когда ее активность падает, в реактор добавляют, свежую порцию фермента, которая тут же адсорбируется на носителе.

*3.Иммобилизованные ферменты и лечебное питание.* Иммобилизованные ферменты успешно используются также и в химических процессах пищевой промышленности, в частности для получения глюкозы из крахмала, для получения глюкозо-фруктозного сиропа, для улучшения качества молока путем удаления из него лактозы и т.п.

Благодаря ферментным методам начинает стираться грань между привычными пищевыми технологиями и промышленностью тонкого органического синтеза. Так, фирма «Cetus Corporation» в США разработала процесс, в результате которого образуется *фруктоза* (пищевой продукт) и *окиси алкенов* (полупродукт органического синтеза). Для этого глюкозу, полученную из крахмала, окисляют в присутствии иммобилизованного фермента, пиранозо-2-оксидазы до глюкозона, который затем с помощью водорода на палладиевом катализаторе превращают во фруктозу. На первой стадии в качестве побочного продукта образуется перекись водорода, используемая далее для микробиологического окисления этилена или пропилена в соответствующие эпоксиды. Таким образом, в данном технологическом цикле тесно переплетены между собой 3 синтетических метода: ферментативный (первая стадия), химический (вторая стадия) и микробиологический (третья стадия). Именно сочетание разных методов обеспечивает высокую экономичность производства.

*Удаление лактозы из молока с помощью иммобилизованных ферментов.* Малосладкий дисахарид – лактоза, присутствующий в молоке, легко усваивается детьми, особенно в младенческом возрасте, а вот у взрослых



людей иногда наблюдается интолерантность к молоку, что обусловлено отсутствием лактазы в тонком кишечнике. Молочный сахар (лактоза) не расщепляется до глюкозы и галактозы. После потребления молока такие люди страдают расстройствами желудка, вздутием и болями в нижней части живота. До сих пор нет ясности, является ли отсутствие лактазы наследственным. Такое заболевание особенно широко распространено в развивающихся странах, а ведь именно население этих стран особенно нуждается в таком дешевом и одновременно полноценном продукте питания, как молоко. Чтобы у людей с подобными отклонениями молоко усваивалось, оно было ферментативно обработано с помощью иммобилизованной лактазы.

Итак, проблема была решена, когда молоко стали предварительно обрабатывать иммобилизованной лактазой. Такое лактозное молоко уже получают по соответствующему биотехнологическому процессу.

В Италии с 1975 г. работает завод по переработке молока с помощью иммобилизованной лактазы в диетическое безлактозное молоко. Ежедневно предприятие выпускает 800 л данного диетического продукта.

Более того, разрабатывают ферментативный гидролиз лактозы как дополнительный путь получения глюкозы. Дело в том, что при свертывании молока до 75% лактозы остается в сыворотке, которую пропускают через колонну с иммобилизованной лактазой и получают после дополнительной очистки водный раствор смеси глюкозы и галактозы, которую непосредственно можно использовать в пищевой промышленности.

*Превращение глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы.* Фруктоза слаще глюкозы почти в 2 раза. Фруктоза – это изомер глюкозы. Она имеет ту же самую химическую формулу. Использование фруктозы вместо сахара сулит массу преимуществ. Из-за большей сладости ее можно применять в меньших количествах, что ведет к снижению калорийности продуктов, а это важно для диетологии. Фруктозу в отличие от глюкозы и сахарозы могут потреблять больные диабетом. Дело в том, что пути превращения фруктозы в человеческом организме совершенно иные, нежели глюкоза, и не связаны с наличием инсулина. К тому же фруктоза менее вредна для зубов.

Не смотря на все эти положительные факторы, фруктозу до последнего времени применяли крайне ограниченно из-за отсутствия разработок ее промышленного производства. Для того чтобы увеличить сладость глюкозы в 2 раза, достаточно было бы ее просто химически превратить во фруктозу, но все попытки осуществить изомеризацию глюкозы во фруктозу химическим путем с помощью промышленных катализаторов окончились неудачей, поскольку при этом неспецифически образовывались темно окрашенные

побочные продукты с плохим вкусом. Очистка фруктозы от них была бы слишком дорогой.

Положение изменилось в 70-х гг., когда в производстве стали применять фермент глюкоизомеразу, который катализирует взаимопревращения глюкозы во фруктозу.

В 1957 г. была открыта глюкоизомераза – внутриклеточный фермент, выделяемый из различных микроорганизмов.

В 1960 г. в США запатентован ферментативный процесс превращения глюкозы во фруктозу.

В 1966 г. японская исследовательская лаборатория фирмы «Шива сити» описала промышленный процесс с использованием растворимой глюкоизомеразы. При промышленной изомеризации глюкозы в качестве конечного продукта получают не одну фруктозу, а смесь глюкозы и фруктозы (сироп), обладающей высокой сахаристостью.

В 1967 г. американская фирма «Клинтон крон процессинг компани» приступила к производству глюкозо-фруктозного сиропа из глюкозы с помощью растворимой глюкоизомеразы. Но сироп содержал всего 15 % фруктозы. Кроме того, выяснилось, что процесс с участием глюкоизомеразы может быть рентабельным только при многократном использовании дорогостоящего фермента. Глюкоизомераза оказалась идеальным ферментом для иммобилизации: стабильная при высоких температурах, а т.к. субстрат (глюкоза) и продукт реакции (фруктоза) – очень небольшие молекулы, то не возникает проблем с их движением по колонке с иммобилизованным ферментом. Ни глюкоза, ни фруктоза не несут электростатического заряда, поэтому глюкоизомеразу можно было адсорбировать на заряженных группировках целлюлозы.

В 1968 г. концерн «Клинтон» предложил периодический метод превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованного фермента, при котором выход фруктозы составлял 42 %.

В 1978 г. начался новый этап в развитии этого производства. Благодаря применению новых способов разделения удалось получить 55 % фруктозного сиропа.

*Технология превращения глюкозы во фруктозу:* В колонку высотой до 5 м загружают иммобилизованный фермент, например, в виде гранул и затем непрерывным потоком пускают водный раствор глюкозы. На выходе получают так называемый глюкозо-фруктозный сироп – довольно концентрированный водный раствор примерно равных количеств глюкозы и фруктозы. Этот сироп можно использовать непосредственно или, отделив фруктозу, а оставшуюся глюкозу вновь подвергнуть изомеризации до смеси фруктозы и глюкозы, и т.д.

*4 Ферментные электроды на основе иммобилизованных ферментов.* Мобилизованные ферменты нашли применение и для аналитических целей в виде *ферментных электродов* (датчиков или *биосенсоров*). В любом ферментном электроде обязательно есть собственно электрод, слой иммобилизованного тем или иным способом фермента и, зачастую, диализная полупроницаемая мембрана, предотвращающая диффузию фермента в раствор, но пропускающая низкомолекулярные соединения к поверхности электрода. Достаточно внести электрод в раствор, содержащий специфическое по отношению к ферментному электроду вещество (субстрат), и в приэлектродном слое происходит ферментативная реакция, ее продукты определяют с помощью того или иного электрохимического устройства.

Присутствие на электроде фермента-биокатализатора с высокой специфичностью действия – позволяет определять наличие и концентрацию в сложной по составу смеси подчас одного – единственного вещества. В настоящее время с помощью биосенсора можно определить 10 соединений: глюкозу, лактат, этанол, лактозу, галактозу, сахарозу,  $\alpha$ -амилазу,  $\alpha$ -лизин, мочевую кислоту, холин.

Иммобилизованные ферменты применяются в автоматическом анализе биологических субстратов и лекарственных веществ. Они являются рабочей частью автоматических проточных анализаторов. Ферментные электроды позволяют проводить непрерывный анализ веществ. На основе проточных анализаторов с иммобилизованными ферментами и ферментных электродов созданы биохимические автоматы, позволяющие в короткие отрезки времени проводить обследование больших контингентов людей. Иммобилизованные ферменты (ферментные электроды) применяют для непрерывного контроля загрязненности окружающей среды токсическими веществами.

В будущем иммобилизованные ферменты найдут значительно более широкое применение, в составе ферментсодержащих электродов, используемых для мониторинга *in vitro* и *in vivo*. Много подобных систем уже сконструировано, но в клинике пока не применяется.

Был разработан *электрод с глюкозооксидазой*. В устройстве Апдайка и Хикса глюкозооксидаза нанесена на поверхность обычного платинового электрода. Чем больше кислорода потребляется в реакции:



тем меньше количество его регистрируется внутренней частью электрода. Недостаток устройства – ненадежность, что не позволяет использовать его как имплантируемый аппарат для постоянной регистрации содержания глюкозы. Эти проблемы связаны с наличием конкурентных отношений между глюкозой

и кислородом в жидкостях тела, инактивацией фермента *in vivo*, сложностью калибровки и дрейфом характеристик электрода.

Ведущиеся исследования позволяют надеяться, что, усовершенствовав такие электроды с ферментами, удастся со временем создать датчик глюкозы для автономно работающего, полностью автоматического и небольшого по размеру протеза поджелудочной железы, нужного для лечения больных диабетом. В этой связи особенно важны последние достижения в области разработки ферментсодержащих электродов. Исследователи, работающие в Крэнфилдском технологическом институте Оксфордского университета и в госпитале Гая в Лондоне, разрабатывают *глюкозный электрод*, в котором для переноса электронов от протетической группы глюкозооксидазы на графитовый электрод используется органический медиатор (например, ферроцен), т.е. процесс идет без участия кислорода, который обычно выступает в роли конечного акцептора электронов. Работа этого электрода, таким образом, не связана с кислородом и поэтому он может оказаться полезным при создании имплантируемого, способного работать *in vivo* устройства для больных диабетом.

По-видимому, основные усилия в ближайшие несколько лет будут направлены на развитие технологии биодатчиков. Ферменты могут оказаться весьма полезными для контроля за концентрацией разнообразных веществ, интересующих клиницистов промежуточных метаболитов, лекарственных препаратов и гормонов.

Не менее важными направлениями исследований являются *иммобилизация клеток* и создание методами генотехники (генного инженерного конструирования) промышленных штаммов микроорганизмов – продуцентов витаминов и незаменимых аминокислот. В качестве примера медицинского применения достижений биотехнологии можно привести иммобилизацию клеток щитовидной железы для определения тиреотропного гормона в биологических жидкостях или тканевых экстрактах.

*«Ферментные комбинаты».*

Очень перспективная область ферментной технологии – создание ферментных систем, когда на одном и том же носителе, в непосредственной близости друг от друга, иммобилизуется два или большее количество ферментов, работающих последовательно. При этом можно добиться того, чтобы активные центры ферментов были определенным образом ориентированы относительно друг друга. Таким путем удастся значительно повысить эффективность их работы: образуемые под действием одного фермента промежуточные продукты в такой системе сразу же поступают на другой фермент, что особенно важно, когда промежуточные продукты

неустойчивы и легко разрушаются в окружающей среде: в такой системе они не выходят наружу, а сразу же перерабатываются.

Усовершенствование методов иммобилизации ферментов позволяет намного увеличить их стабильность. Например, если прикрепить фермент к носителю не в одной точке, а во многих, у него заметно повышается термоустойчивость: так, если обычно фермент не выдерживает увеличение температуры более чем до 65 – 66 °С, то теперь он может работать при 80 °С и более. Таким путем можно сделать ферменты более устойчивыми и к высокому содержанию в среде солей или органических растворителей – последнее особенно важно для увеличения эффективности синтеза пептидов.

Для работы некоторых ферментов нужны коферменты – небелковые соединения, присутствие которых является обязательным условием активности фермента. Эти вещества имеют сложное строение и получение их дорогостоящий процесс, а добавлять их в реакционную среду приходится в большом избытке. В последнее время разрабатываются методы, позволяющие прикреплять молекулу кофермента непосредственно к молекуле фермента. Больше того, кофермент можно «посадить» на гибкой «ножке» - небольшой линейной молекуле – рядом с активным центром фермента: «ножка» изгибается, кофермент приближается к активному центру, срабатывает там, а потом «ножка» разгибается, кофермент окисляется в среде или на электроде и снова готов к работе. В данном случае кофермента требуется гораздо меньшее количество, т.к. он используется намного эффективнее; к тому же такая система гораздо устойчивее к ингибиторам реакции, поскольку кофактор «сидит» в непосредственной близости от активного центра фермента.

#### *Иммобилизация целых клеток микроорганизмов и растений.*

Непревзойденным «мастером» иммобилизации является живая клетка. Ферменты, связанные в клетке естественным путем, без труда превосходят все искусственно иммобилизованные ферменты по активности и стабильности. Последовательное «включение» ферментных реакций в мультиферментных системах или регенерация коферментов не представляет для клетки никаких трудностей. При этом каждый фермент имеет в клетке оптимальную среду. Лишь после иммобилизации ферментов биотехнологам пришла в голову мысль сходными методами иммобилизовывать целые микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Поэтому нет принципиальных различий между иммобилизацией ферментов и клеток. Иммобилизуются как живые, так и мертвые клетки микроорганизмов, но в последнем случае ферменты должны быть еще активными.

Особые успехи в области иммобилизации клеток достигнуты в Японии. Профессору Сибате принадлежат пионерские работы не только по иммобилизации ферментов, но и по фиксированию на носителях целых клеток. Например, его группой разработан процесс синтеза *аспарагиновой кислоты* из фумаровой с помощью иммобилизованных в геле клеток *E.coli*. Таким образом, ежегодно получают 600 т. аспарагиновой кислоты. Лишь через 120 суток активность аспартазы бактерий уменьшается вдвое.

Сходный процесс с иммобилизованными клетками *Brevibacterium* позволяет получить *L- яблочную кислоту* из фумаровой; таким путем ежегодно производится 180 т. яблочной кислоты.

В этих случаях используется один-единственный бактериальный фермент (аспартаза и фумараза).

Естественно, еще более пригодны иммобилизованные микроорганизмы для многоступенчатых процессов, например, широкие возможности открываются при производстве спирта с помощью иммобилизованных дрожжей. Этанол образуется из глюкозы в анаэробных условиях в результате многоступенчатой реакции, в которой используются системы регенерации АТФ и НАДФ. Японская компания «Киова Хакко» длительное время на опытных заводских установках с иммобилизованными клетками дрожжей получает 2400 л. спирта в день из тростниково-сахарной массы. Производительность такого полностью автоматизированного процесса в 20 раз выше по сравнению с традиционными реакторами периодического действия, причем затраты на электроэнергию и рабочую силу существенно ниже.

Возможности иммобилизованных клеток велики. Их можно использовать практически во всех известных сегодня биотехнологических процессах. По сравнению со свободноживущими клетками иммобилизованные клетки обладают преимуществами, например, при производстве аспарагиновой кислоты из фумаровой с помощью иммобилизованных клеток издержки производства снизились на 40%, благодаря повышению производительности труда, экономии фондов заработной платы, автоматизации и повышению выхода продукта.

Преимущества иммобилизованных клеток заключаются, прежде всего, в том, что отпадает необходимость в очистке ферментов, причем активность и стабильность иммобилизованных клеток очень высоки, с их участием легко осуществляются многоступенчатые процессы, при которых требуется регенерация коферментов, но с участием иммобилизованных клеток не удается расщепить высокомолекулярные субстраты (например, крахмал), т.к. они не могут преодолеть такого барьера, как клеточная мембрана. В этом случае можно было бы одновременно использовать клетки и внеклеточные ферменты.

Для аналитических целей можно подключить иммобилизованные клетки к сенсорам, но время измерения с помощью бактериальных сенсоров значительно больше, чем в случае ферментных, вследствие длительной диффузии субстрата через мембраны клеток, кроме того, бактериальные сенсоры менее чувствительны и часто не столь специфичны, как ферментные сенсоры. Это делает ферментные сенсоры особенно удобными при определении таких сложных параметров, как, например, общее число соединений, подвергающихся биологической деградации. Для контроля состояния окружающей среды при определениях содержания кислорода в сточных водах в Японии используют микробиологический сенсор. Этот анализ занимает всего несколько минут вместо 5 дней, необходимых при традиционных определениях. Недостатком микроорганизмов является то, что в отличие от изолированных ферментов это сложные системы, причем в результате происходящего в них обмена веществ могут образовываться побочные продукты, которые должны быть в последствии удалены. Кроме того, при применении ферментов на 1 г можно иммобилизовать приблизительно в 10 раз большую активность, чем при иммобилизации клеток, т.е. при том же количестве носителя преобразовывать больше субстрата.

Таким образом, иммобилизованные клетки в ближайшем будущем не смогут заменить иммобилизованные ферменты. Скорее, обе формы иммобилизованных на носителях биокатализаторов дополняя друг друга, будут играть важную роль в промышленности завтрашнего дня.

*Соиммобилизация.* Под соиммобилизацией понимают совместную иммобилизацию различных биокатализаторов: двух или более ферментов, видов клеток, комбинаций ферментов и другие варианты.

Иммобилизация нескольких ферментов позволяет осуществить многостадийные процессы *in vitro*. Многостадийные процессы могут осуществлены также с использованием нескольких видов соиммобилизованных клеток, в частности смешанных культур микроорганизмов. Так, трансформация сорбозы в 2-кето-L гулоновую кислоту, легко переводимую в результате химического окисления в аскорбиновую кислоту, происходит при участии соиммобилизованных клеток *Glucanobacter melanogenes* и *Pseudomonas syringia*.

Большое внимание уделяют *соиммобилизации ферментов и клеток*. При этом возможны два варианта:

1-Клетки имеют ту же каталитическую активность, что и совместно с ней иммобилизованный фермент. Использование такой системы позволяет значительно ускорить реакцию и стабилизировать каталитическую активность.

2-Клетки и фермент катализируют разные реакции. В этом случае возможно поэтапное преобразование субстрата в целевой продукт.

В настоящее время развивается новая отрасль науки – *промышленная энзимология*, являющаяся основой биотехнологии. Фермент, ковалентно присоединенный («пришитый») к любому органическому или неорганическому полимерному носителю (матрице), называют иммобилизованным. Техника иммобилизации ферментов допускает решение ряда ключевых вопросов энзимологии: обеспечение высокой специфичности действия ферментов и повышения их стабильности, простоту в обращении, возможность повторного использования, применение их в синтетических реакциях в потоке. Применение подобной техники в промышленности получило название инженерной энзимологии.

Ряд примеров свидетельствует об огромных возможностях инженерной энзимологии в различных областях промышленности, медицины, сельского хозяйства. В частности, иммобилизованную  $\beta$ -галактозидазу, присоединенную к магнитному стержню-мешалке, используют для снижения содержания молочного сахара в молоке, т.е. продукта, который не расщепляется в организме больного ребенка с наследственной непереносимостью лактозы. Обработанное таким образом молоко, кроме того, хранится в замороженном состоянии значительно дольше и не подвергается загустеванию.

Разработаны проекты получения пищевых продуктов из целлюлозы, превращения ее с помощью иммобилизованных ферментов – целлюлаз – в глюкозу, которую можно превратить в пищевой продукт – крахмал. С помощью ферментной технологии в принципе можно также получить продукты питания, в частности углеводы, из жидкого горючего (нефти), расщепив его до глицеральдегида, и далее при участии ферментов синтезировать из него глюкозу и крахмал. Несомненно, имеет большое будущее моделирование при помощи инженерной энзимологии процесса фотосинтеза, т.е. природного процесса фиксации  $\text{CO}_2$ ; помимо иммобилизации, этот жизненно важный для всего человечества процесс потребует разработки новых оригинальных подходов и применения ряда специфических иммобилизованных коферментов.

В качестве примера иммобилизации ферментов и использования их в промышленности приводим схему непрерывного процесса получения аминокислоты аланина и регенерации кофермента (в частности, НАД) в модельной системе. В этой системе исходный субстрат (молочная кислота) подается при помощи насоса в камеру-реактор, содержащий иммобилизованные на декстране НАД<sup>+</sup> и две НАД-зависимые дегидрогеназы: лактат- и аланиндегидрогеназы; с противоположного конца реактора продукт



реакции – аланин – удаляется с заданной скоростью методом ультрафильтрации.

Подобные реакторы нашли применение в фармацевтической промышленности, например при синтезе из гидрокортизона антиревматоидного препарата преднизолона. Кроме того, они могут служить моделью для применения с целью синтеза и получения незаменимых факторов, поскольку при помощи иммобилизованных ферментов и коферментов можно направленно осуществлять сопряженные химические реакции (включая биосинтез незаменимых метаболитов), устраняя тем самым недостаток в веществах при наследственных пороках обмена. Таким образом, при помощи нового методологического подхода наука делает свои первые шаги в области «синтетической биохимии».

### **Контрольные вопросы:**

- 1.Функционирование ферментов в нашем организме. Примеры.
- 2.Проблемы и перспективы применения ферментов в медицине. Три основных направления исследований в области медицинской энзимологии: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.
- 3.Применения новейших научных достижений энзимологии в диагностике и лечении онкологических, нейродегенеративных, эндокринологических, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний.
- 4.Проблемы использования ферментов в медицине. Нестабильность в физиологических условиях, антигенность, токсичность.
- 5.Конструирование биокаталитических систем с улучшенными биофармацевтическими свойствами.
- 6.Методы создания лекарств пролонгированного действия.
- 7.Системы адресной доставки лекарств.
8. Ферменты в научно-исследовательской работе (рестриктазы, селективные протеазы и др.)
9. Наследственные (первичные) энзимопатии: нарушение обмена при алкаптонурии, фенилкетонурии, гипераммониемии.
10. Вторичные энзимопатии. Измерение активности ферментов с целью диагностики болезней.

## Практическая часть

### Тестовые задания

#### 1. Структура и свойства фермента

1.1. Какой фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату:

а) химотрипсин, б) папаин, в) уреазы, г) аргиназа, д) лизоцим?

1.2. Какой оптимум рН имеет фермент пепсин: а) 1.5-2.5, б) 4.-5, в) 4-7,

г) 8-9, д) 10-11?

1.3. Какой оптимум рН имеет фермент аргиназа: а) 1.5-2.5, б) 4.-5, в) 4-7,

г) 8-9, д) 10-11?

1.4. Какой оптимум рН имеет фермент амилаза: а) 1.5-2.5, б) 4.-5, в) 4-7,

г) 8-9, д) 10-11?

1.5. Какой из протеолитических ферментов обладает эстеразной активностью:

а) трипсин, б) карбоксипептидаза, в) аминопептидаза, г) химотрипсин, д) пепсин?

1.6. При каком рН большинство ферментов проявляет максимальную активность: а) кислом - рН 1.5-2 , б) щелочном-рН 8-9, в) близком к нейтральному, г) только при рН -7?

1.7. При какой температуре ферменты денатурируют: а) 0 °С, б) 80-100°С, в) 20-30 °С, г) 30-40 °С?

1.8. Какая температура является оптимальной для действия большинства ферментов: а) 0 °С, б) 80-100 °С, в) 20-30 °С, г) 30-40 °С?

1.9. Какой фермент обладает стереоспецифичностью: а) альдолаза,

б) пируватдегидрогеназа, в) α-глюкозидаза, г) фумаратгидратаза, д) липаза?

1.10. Приведите схему, поясняющую ступенчатый характер действия амин- и карбоксипептидаз.

*Решите задачи и проведите соответствующие превращения*

1.11. Молекулярная масса пируваткарбоксилазы  $M=183$ . Рассчитайте молекулярную активность фермента, если его удельная активность составляет  $1.2 \times 10^3$  Е.

1.12. Рассчитайте удельную активность каталазы ( $M=252000$ ) и лактатдегидрогеназы ( $M=45000$ ), если молекулярная активность этих ферментов при температуре 25°С, при оптимальном рН и полном насыщении субстратом равна  $5 \times 10^6$  и  $3.7 \times 10^4$ , соответственно.

1.13. Рассчитайте удельную активность карбоангидразы ( $M=30000$ ), гексокиназы ( $M=45000$ ) и альдолазы ( $M=142000$ ), если их молекулярная активность равна  $0.96 \times 10^8$ ,  $1.7 \times 10^4$ ,  $4.3 \times 10^3$ .

1.14. Рассчитайте активность каталитических центров каталазы, лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы (молекулярная активность их соответственно равна -  $5 \times 10^6$ ,  $3.7 \times 10^4$ ,  $2.7 \times 10^4$ ), если число каталитических центров у первых двух ферментов равно четырем, а у последних – двум.

1.15. Определите удельную активность (а) пируваткиназы ( $M=2370000$ ), (б) цитохромС-редуктазы ( $M=75000$ ) и (в) бутирил-КоА-дегидрогеназы ( $M=2000000$ ), исходя из значений их молекулярной активности:  $6 \times 10^3$ ,  $1.3 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ , соответственно.

1.16. В каком состоянии находится HS-группа цистеина ( $pK_a = 8.33$ ) и имидазольный радикал гистидина ( $pK_a = 7.12$ ) в молекуле гексокиназы в условиях оптимального pH (8.3-8.6) действия этого фермента.

1.17. Число нейтральных, основных и кислых аминокислотных остатков в составе лизоцима, рибонуклеазы и цитохрома с таково:

Наименование фермента	Аминокислотные остатки			
	Всего	Нейтральные	Основные	Кислые
Лизоцим куриного яйца	129	38	17	37
Рибонуклеаза из поджелудочной железы быка	124	36	18	27
Цитохом из плесневого гриба	107	45	18	21

Рассчитайте долю (в процентах) нейтральных, основных и кислых аминокислотных остатков от общего числа для указанных белков и выведите закономерности состава перечисленных ферментов в этом отношении.

1.18. Рассчитайте концентрацию меди (в процентах) в медьсодержащем ферменте аскорбатоксидазе ( $M=150000$ ), если каждая молекула содержит 6 атомов меди.

1.19. Рассчитайте концентрацию меди (в процентах) в гемоцианине - медьсодержащем белке крови омара, если известно, что  $M=780000$  и на одну молекулу приходится 20 атомов меди.

1.20. Рассчитайте молекулярную массу протомера кристаллической каталазы, представляющего протеид с активной группой в виде железо-порфирированного комплекса с одним атомом железа, если концентрация железа в кристаллической каталазе равна 0.12%.

1.21. Массовая концентрация лейцина и изолейцина в рибонуклеазе составляет 1.65 и 2.48%, соответственно. Рассчитайте ее минимальную массу.

1.22. Парциальный удельный объем рибонуклеазы равен  $0.707 \text{ см}^3 \times \text{г}^{-1}$ , коэффициент диффузии (при 20 °C) равен  $13.1 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \times \text{с}^{-1}$ . Константа

седиментации рибонуклеазе, также приведенная к воде при 20 °С, равна 2.05. Плотность воды при 20°С составляет  $0.998 \times \text{см}^{-3}$ . Используя уравнение Сведберга, вычислите молекулярную массу рибонуклеазы.

1.23. Имеется раствор NaCl (0.1 моль/л) и такой же концентрации раствор серной кислоты, ацетона ( $pK'=4.76$ ), малата ( $pK'=3.86$ ), фосфорной кислоты ( $pK'=7.2$ ) и хлорида аммония ( $pK'=9.25$ ). Как приготовить буфер с pH 5.4 для опытов с ферментами, приводящими к образованию кислоты ?

1.24. Какой объем HCl (0.1 моль/л) необходимо добавить к 20 мл фосфатного буфера (0.04 моль/л) с pH 6.5, содержащего уреазу, чтобы уменьшить активность фермента на 50% в условиях, когда лимитирующим фактором является pH? Буферной емкостью самой урказы можно пренебречь. Максимальная активность уреазы (100%) при pH 6.5, а 50% ее активности при pH 5.

1.25. Активный центр фермента представляет собой "карман" на поверхности фермента, выстланный боковыми цепями аминокислот, необходимыми для связывания субстрата и катализа его химического превращения. Молекула карбоксипептидазы, последовательно отщепляющей С-концевые аминокислотные остатки от субстратов (пептидов), состоит из одной полипептидной цепи (307 аминокислотных остатков). Три главные каталитические группы в активном центре – это аргинин 145, тирозин 248 и глутаминовая кислота 270 (номер указывает положение аминокислоты в цепи).

а) Если бы карбоксипептидаза представляла собой идеальную  $\alpha$ -спираль, то на каком расстоянии (в нм) друг от друга находились бы аргинин 145 и тирозин 248, аргинин 145 и глутаминовая кислота 270?

б) Объясните, каким образом эти три аминокислоты, расположенные далеко друг от друга в полипептидной цепи, могут катализировать реакцию, участниками которой занимают пространство размером в несколько десятых долей нанометра.

в) Если в процессе гидролиза участвуют только эти три каталитические группы, для чего ферменту необходимо иметь так много аминокислотных остатков?

1.26. Дана смесь белков:

Название белка	Молекулярная масса	pI белка
Церулоплазмин	151 000	4.4
$\gamma$ -Глобулин	150 000	6.3
$\beta$ -Лактоглобулин	37 100	5.2

Предложите методы разделения белков и укажите последовательность их выделения из смеси.

1.27. Из экстракта, содержащего 500 мг общего белка и 100 ед. активности фермента, получен препарат, содержащий 2 мг белка и 80 ед. активности. С каким выходом (по активности) получен фермент и какова степень его очистки?

1.28. При каких значениях рН наиболее целесообразно электрофоретическое фракционирование: а) миозина и гемоглобина; б) уреазы и гемоглобина; в) щелочной фосфатазы, сывороточного альбумина и уреазы; г) цитохрома с и гемоглобина, если изоэлектрическая точка миозина – 5.4; щелочной фосфатазы – 4.5; гемоглобина – 6.8; уреазы – 5.0; цитохрома С – 10.65?

1.29. Используя обозначения: К – катод, А – анод, С – линия старта, укажите направление перемещения при электрофорезе следующих белков:

а) тропомиозина – в буферной системе с рН 5.1; б) гемоглобина – рН 4.8;

в) рибонуклеазы – рН 4.2; 9.5; 11.3; учитывая, что изоэлектрическая точка тропомиозина – 5,1; гемоглобина – 6.8; рибонуклеазы – 9.45.

1.30. Как изменится электрофоретическая подвижность белка (изоэлектрическая точка его равна 6,8; фракционирование ведется при рН 7,0), если в его молекуле: а) глу заменен на вал; б) лиз заменен на глу; в) глу заменен на лиз; г) вал заменен на глу; д) гис заменен на арг?

1.31. Токсический эффект тяжелых металлов, например  $Cd^{2+}$  и  $Hg^{2+}$ , объясняется тем, что они могут замещать  $Zn^{2+}$  в активном центре определенных ферментов. Приведите примеры ферментов, в активном центре которых содержатся металлы, и объясните: а) как при этом изменяется активность ферментов и почему; б) почему при этом изменяется скорость транскрипции, а также снабжение клеток кислородом.

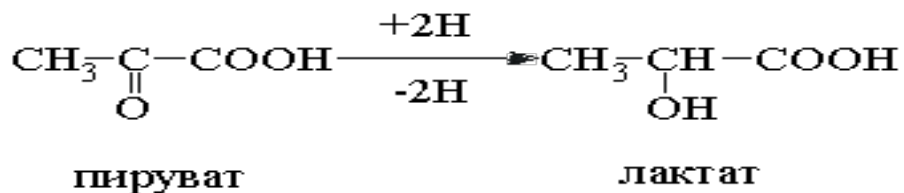
1.32. В двух пробах за 10 мин гидролизовалось равное количество крахмала: в первой пробе количество амилазы 2 мг, во второй – 5 мг. Одинакова ли активность амилазы в обеих пробах?

1.33. В гомогенатах печени двух крыс обнаружена одинаковая удельная активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Одинаковое ли количество этого фермента содержится в 1 г печени обеих крыс? Почему вы так считаете?

а) дайте определение удельной активности фермента, объясните, какова размерность этой величины;

б) напишите реакцию, которую катализирует фермент, назовите вещества, которые могут повлиять на активность этого фермента в печени.

1.34. Рассмотрите схему ферментативной реакции. Сравните структурные формулы субстрата и продукта:



а) Назовите класс фермента, катализирующего данную реакцию.

б) С участием какого кофермента протекает реакция? Напишите формулу витамина, входящего в его состав.

в) Рассчитайте удельную активность фермента, если за 30 с 1 мг фермента при оптимальных условиях инкубации (рН 7.2; 37 °С) превращает 50 мкмоль пирувата.

1.35. Добавление адреналина к гомогенату или препарату разрушенных клеток здоровой печени приводит к увеличению активности гликогенфосфорилазы. Однако если гомогенат предварительно центрифугировать при высокой скорости и затем к прозрачной надосадочной жидкости добавить адреналин или глюкагон, то увеличения фосфорилазной активности не наблюдается. Объясните причину данного явления.

1.36. Назовите по рациональной номенклатуре ферменты, катализирующие гидролиз: а) дипептида; б) лактозы; в) сахарозы; г) амилозы.

1.37. Инкубационная проба объёмом 3 мл содержит 2.75 мл буфера, 200 мкл субстрата с конечной концентрацией 0.3 мМ и 50 мкл кофермента с конечной концентрацией 0.2 мМ. Рассчитайте начальные концентрации субстрата и кофермента.

## 2. Механизм действия, регуляция активности и компарментализация ферментов

2.1. У каких ферментов в активном центре обнаружена серин-гистидиновая пара: а) лизоцим, б) α-химотрипсин, в) ацетилхолинэстераза, г) цитохромоксидаза, д) трипсин?

2.2. У каких ферментов в активном центре находятся гистидин и цистеин: а) гексокиназа, б) алкогольдегидрогеназа, в) трипсин, г) креатинкиназа?

2.3. У каких ферментов в активном центре находятся два остатка гистидина: а) пепсин, б) рибонуклеаза, в) лизоцим, г) фумаратгидратаза, д) фосфоглюкомутаза?

2.4. У каких ферментов в активном центре обнаружен фосфосерин: а) фосфоглюкоутазы, б) гексокиназы, в) фосфатазы, г) пируваткиназы, д) карбоксипептидазы?

2.5. У каких ферментов в активных центрах обнаружены аминокислоты глутамат и аспарат: а) пируватдегидрогеназа, б) лизоцим, в) пепсин, г) уреазы, д) карбоксипептидаза?

2.6. Какие ферменты относятся к группе «сериновых»: а) пепсин, б)  $\alpha$ -химотрипсин, в) трипсин г) ацетилхоллинэстераза, д) лизоцим?

2.7. Какой вид катализа может осуществлять имидазольное кольцо гистидина: а) нуклеофильный, б) общий основной, в) общий кислотный, г) электрофильный, д) специфический основной?

2.8. Какая из функциональных групп ферментативных белков образует альдиминную связь: а) гидроксильная группа серина, б)  $\epsilon$ -аминогруппа лизина, в) имидазольное кольцо гистидина, г) сульфгидрильная группа цистеина, д) фенольная группа тирозина?

2.9. Какие соединения являются алкилирующими для сульфгидрильных групп: а) *n*-хлормеркурибензоат серина, б) акриламид, в) уксусный ангидрид, г) диазосоединения, д) метильная группа?

2.10. Какие соединения используются для количественного определения сульфгидрильных групп: а) *o*-иодобензоат, б) диизопропилфторфосфат, в) *n*-хлормеркурибензоат, г)  $\text{HgCl}_2$ , д) *N*-этилендиамид?

2.11. В каких реакциях вступают дисульфидные связи: а) с ионами металла, б) ацилирования, в) алкилирования, г) восстановления боргидридом натрия, д) тиол-дисульфидного обмена?

2.12. Какой фермент Дж.Самнер в 1926 году впервые получил в кристаллическом виде: а) пепсин, б) гексокиназу, в) уреазу, г) аргиназу, д) амилазу?

2.13. Как называется участок молекулы фермента ответственный одновременно и за присоединение вещества, подвергающегося ферментативному действию, и за осуществление ферментативного катализа: а) гидрофобный центр, б) каталитический центр, в) активный центр, г) адсорбционный центр, д) аллостерический центр?

2.14. Для каких ферментов активатором являются ионы  $\text{Mg}^{2+}$ : а) фосфорилазы, б) амилазы, в) гексокиназы, г) креатинкиназы, д) карбоксипептидазы?

2.15. Для каких ферментов активатором являются ионы  $\text{Zn}^{2+}$ : а) карбоксипептидазы, б) карбоангидразы, в) глутаматдегидрогеназы, г) лактатдегидрогеназы, д) аминоксидазы?

2.16. Какой ион необходим для действия киназ (фосфотрансфераз), катализирующих образование *O*-фосфорных эфиров: а)  $\text{Mg}^{2+}$ , б)  $\text{Co}^{2+}$ , в)  $\text{Ca}^{2+}$ , г)  $\text{Na}^{2+}$ , д)  $\text{K}^{2+}$ ?

а) Какой из ферментов является железосодержащим флавопротеидом: а) нитратредуктаза, б) липоилдегидрогеназа, в) сукцинатдегидрогеназа, г) малатдегидрогеназа, д) оксидаза L-аминокислот?

### 3. Коферменты

3.1. Для какого класса ферментов коферментом является тиамин пирофосфат: а) трансфераз, б) оксидоредуктаз, в) гидролаз, г) лиаз, д) лигаз?

3.2. Тетрагидрофолиевая кислота принимает участие в активации и переносе различных групп. Кажите каких именно: а) метильных,

б) ацетильных, в) одноуглеродных, г)  $\text{CO}_2$ , д) фосфорильных?

3.3. Какие коферменты содержат витамин  $\text{B}_2$ : а) никотинамидные, б) пиридоксальные, в) флавиновые, г) кофермент А, д) кобамидные?

3.4. Для какого класса ферментов коферментом является CoA: а) гидролаз, б) трансфераз, в) оксидоредуктаз, г) лигаз, д) лиаз?

3.5. Какие реакции в организме катализирует глутатион:

а) перенос метильных групп, б) окисление  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, в) контроль обратимых превращений дисульфидных групп в сульфгидрильные в белках, г) превращение глиокселей в  $\alpha$ -гидроксикислоты, д) перенос фосфатных групп?

3.6. Какие коферменты содержат витамины  $\text{B}_{12}$ : а) пиридоксальные, б) флавиновые, в) кобамидные, г) никотинамидные, д) железопорфириновые?

3.7. Для какого класса ферментов коферментом является убихинон: а) оксидоредуктаз, б) трансфераз, в) гидролаз, г) изомераз, д) лиаз?

3.8. S-аденозилметионин принимает участие в переносе различных групп. Укажите каких именно: а) ацетильных, б) метильных, в) фосфорильных, г) одноуглеродных, д)  $\text{CO}_2$ ?

3.9. Какие коферменты содержат витамин  $\text{B}_6$ : а) кобамидные, б) пиридоксальные, в) флавиновые, г) никотинамидные, д) железопорфириновые?

3.10. Для какого класса ферментов коферментом являются фосфаты углеводов: а) оксидоредуктаз, б) гидролаз, в) трансфераз, г) лиаз, д) изомераз)?

3.11. Биотин принимает участие в активации и переносе определенной групп – какой: а) ацетильной, б) метильной, в)  $\text{CO}_2$ , г) фосфорильной, д) аденозильной)?



3.12. Какие коферменты содержат витамины В1: а) флавинадениндинуклеотид, б) тиаминпирофосфат, в) никотиनाмидадениндинуклеотид, г) пиродоксальфосфат, д) кобаламин?

3.13. Производные уридина принимают участие в активизации и переносе соединений. Укажите каких: а) аминокислот, б) глюкозильных остатков, в) фосфолипидов, г) жирных кислот, д) холина?

3.14. Какие коферменты содержат никотиновую кислоту: а) тиаминпирофосфат, б), флавинаденинмононуклеотид, в) никотиनाмидадениндинуклеотид, г) пиродоксальфосфат?

3.15. Какое соединение выполняет активную функцию в СоА:

а) аденозин-3'-фосфат, б), пантотеновая кислота, в) β-меркаптоэтиламин, г) β-аланин?

3.16. Какой кофермент принимает участие в превращении аминокислот: а) тетрагидрофолевая кислота, б), пиродоксаль-5-фосфат, в) тиаминпирофосфат, г) флавинадениндинуклеотид, д) никотинамидадениндинуклеотид?

3.17. В какой мультиферментный комплекс входят следующие коферменты-тиаминпирофосфат, липоевая кислота, СоА: а) синтетазы жирных кислот, б), α-кетоглутаратдегидрогеназный, в) изоцитратдегидрогеназы, г) дигидролипоилгидрогеназы, д) сукцинатдегидрогеназы, ж) пируватдегидрогеназной системы?

3.18. Каковы спектральные характеристики НАДН<sub>2</sub>: а) полоса поглощения при 280нм, б), поглощение при 280нм, в) сильная флуоресценция в области 440нм, г) появление полосы поглощения при 340нм, д) полоса поглощения при 450нм?

3.19. Каковы спектральные характеристика ФАД: а) полоса поглощения при 340нм, б), широкая полоса поглощения при 370нм, в) полоса поглощения при 450нм, г) сильная флуоресценция, д) полоса поглощения при 260нм?

3.20. В какой кофермент входит пантотеновая кислота:

а) флавинаденинмононуклеотид, б), кофермент А, в) уридиндифосфатглюкоза, г) никотинамидадениндинуклеотид, д) цитидиндифосфатхолин?

3.21. Какой кофермент принимает участие в биосинтезе всех углеводородных остатков жирных кислот: а) уридинфосфатглюкоза, б), цитидиндифосфатхолин, в) кофермент А, г) пиродоксаль-5-фосфат, д) аденозинтрифосфат?

3.22. Для какого фермента коферметом является липоевая кислота: а) пируватдегидрогеназы, б), сукцинатадегидрогеназы, в)

дигидролипоилтрансферазы, г) изоцитратдегидрогеназы, д) дигидролипоилдегидрогеназы?

3.23. Для какого класса ферментов коферментом является АТФ:

а) оксидоредуктаз, б) трансфераз, в) изомераз, г) лиаз, д) гидролаз?

3.24. Какие коферменты являются гетероциклическими соединениями:

а) коэнзимы, б), пиридоксальные, в) тиаминпирофосфат А, г) тетрагидрофолевая кислота, д) НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>?

3.25. Какие коферменты относятся к алифатическим соединениям:

а) производные нуклеотидов и нуклеозидов, б), глутатион, в) производные фолиевой кислоты, г) биотин, д) липоевая кислота?

3.26. Какие коферменты связаны с классом ферментов трансфераз:

а) фосфаты углеводов, б), глутатион, в) кофермент ацелирования, г) биотин?

3.27. Какие коферменты связаны с классом ферментов оксидоредуктаз:

а) тиаминпирофосфат, б), НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>, в) ДМН и ФАД, г) глутатион, д) убихиноны?

3.28. Какие коферменты связаны с классом лигаз (синтетаз): а) биотин, б), кобамидные, в) производные нуклеотидов, г) тиаминпирофосфат, д) глутатион?

3.29. Какой фермент содержит кобальт: а) тиаминпирофосфат, б), липоилдегидрогеназа, в) сукцинатдегидрогеназа, г) малатдегидрогеназа, д) оксидаза L-аминокислот ?

3.30. Какие из указанных металлопорфиринов являются ферментами:

а) гемоглобин, б), миоглобин, в) каталаза, г) пероксидаза, д) цитохромы ?

#### 4. Классификация и номенклатура ферментов

*Напишите систематические и рабочие названия, укажите класс фермента, катализирующего реакцию*

4.1. *D*-глюкозо-1-фосфат + H<sub>2</sub>O = *D*-глюкоза + ортофосфат.

4.2. *L*-аспарагин + H<sub>2</sub>O = *L*- аспарат + NH<sub>3</sub>.

4.3. Седугептулозо-7фосфат + *D*-глицеральдегид-3-фосфат = *D*-рибозо-5-фосфат + *D*-ксилулозо-5-фосфат.

4.4. Ацетил-СоА + ортофосфат = СоА + ацетилфосфат.

4.5. Оксалат *D* формиат + СО<sub>2</sub>.

4.6. (1,4- $\alpha$ -*D*-глюкозил)<sub>*n*</sub> + ортофосфат = (1,4- $\alpha$ -*D*-глюкозил)<sub>*n*-1</sub> + - $\alpha$ -*D*-глюкозо-1-фосфат.

4.7. *L*-лизин = кадаверин + СО<sub>2</sub>.

4.8. *L*-метионин = *D*-метионин.

- 4.9. АТФ + *D*-гексоза = АДФ + *D*-гексозо-6-фосфат.  
 4.10. АТФ + ацетат + СоА = АМФ + пирофосфат + ацетилСоА.  
 4.11. УДФ-глюкоза + (1,4- $\alpha$ -*D*-глюкозил)<sub>*n*</sub> = УДФ + (1,4- $\alpha$ -*D*-глюкозил)<sub>*n+1*</sub>.  
 4.12. АТФ + протеин = АДФ + фосфопротеид.  
 4.13. АТФ + креатин = АДФ + фосфокреатин.  
 4.14 *L*-глутамат = *D*-глутамат.  
 4.15. *L*-аспартат + 2-оксоглутарат = оксалоацетат + *L*-глутамат.  
 4.16. АТФ + *D*-глюкоза = АДФ + *D*-глюкозо-6-фосфат.  
 4.17. Мочевина + Н<sub>2</sub>О = 2NH<sub>3</sub> + СО<sub>2</sub>.  
 4.18. Пирофосфат + Н<sub>2</sub>О = 2ортофосфа.  
 4.19. *L*-глутамат + Н<sub>2</sub>О + НАД<sup>+</sup> = 2оксоглутарат + NH<sub>3</sub> + НАДН.  
 4.20. Ксантин + Н<sub>2</sub>О + О<sub>2</sub> = урат + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>.

*Написать реакцию, катализируемую ферментом, указать рабочее название и шифр фермента:*

- 4.21. Алкаголь: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза.  
 4.22. *L*-лактат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза.  
 4.23. *L*-малат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза.  
 4.24. *Альдегид*: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза  
 4.25. *L*-аланин: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза.  
 4.26. *L*-аминокислота: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая).  
 4.27.  $\beta$ -*D*-глюкоза: кислород 1-оксидоредуктаза.  
 4.28. Пируват: кислород оксидоредуктаза (фосфорилирующая).  
 4.29. *L*-аминокислота: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая).  
 4.30. *L*-аскорбат: кислород оксидоредуктаза.  
 4.31. Перекись водорода: перекись водорода оксидоредуктаза.  
 4.32. Донор: перекись водорода оксидоредуктаза.  
 4.33. УДФ-глюкоза: *D*-фруктоза-6-фосфат 2- $\alpha$ -глюкозилтрансфераза.  
 4.34. АТФ: тиамин пирофосфотрансфераза.  
 4.35. Ацетилхолин-ацетилгидролаза.  
 4.36. *D*-глюкозо-6-фосфат фосфогидролаза.  
 4.37. Карбокси-лиаза 2-оксокислот.  
 4.38. АТФ-пирофосфат-лиаза (циклизирующая).  
 4.39. Аланинрацемаза.  
 4.40. *L*-аланин: тРНК<sup>*ала*</sup>- лигаза (образующая АМФ)  
 4.41. Напишите схемы реакций, назовите ферменты, ускоряющие

указанные реакции, и определите класс ферментов:

- А) Глюкоза + АТР  $\rightarrow$  Глюкозо-6-фосфат;  
 Б) Глюкозо-1-фосфат  $\rightarrow$  Глюкозо-6-фосфат;

В) Молочная кислота +  $\text{NAD}^+ \rightarrow$  Пировиноградная кислота +  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ;

Г) Аланин +  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  Молочная кислота +  $\text{NH}_3$ .

Укажите, какой из приведенных ответов правильный.

4.42. К какому классу относится фермент пируваткиназа: а) лигаз, б) гидролаз, в) оксидоредуктаз, г) трансфераз, д) изомераз?

4.43. К какому классу относится фермент ацетил-СоА-карбоксилаза: а) лиаз, б) гидролаз, в) трансфераз, г) лигаз (синтетаз), д) изомераз?

4.44. К какому классу относится фермент уреазы: а) оксидоредуктаз, б) трансфераз, в) гидролаз, г) лиаз, д) изомераз?

4.45. К какому классу относится фермент альдолаза: а) трансфераз, б) оксидоредуктаз, в) гидролаз, г) лиаз, д) лигаз (синтетаз)?

4.46. Какую реакцию катализируют оксидазы: а)  $\text{H}_2\text{O} + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$ , б)  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}' \rightarrow \text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O}$ , в)  $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$ ?

4.47. Какую реакцию катализирует фермент каталаза: а)  $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$ , б)  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , в)  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$ ?

4.48. Какую реакцию катализируют гидралазы: а)  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}' \rightarrow \text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O}$ , б)  $\text{AH}_2 + \text{B} \rightarrow \text{A} + \text{BH}_2$ , в)  $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$ ?

4.49. Какую реакцию катализируют дегидрогеназы: а)  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , б)  $\text{AH}_2 + \text{B} \rightarrow \text{A} + \text{BH}_2$ , в)  $\text{AH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$ ?

4.50. Какую реакцию катализируют эстеразы: а) не гидролитические реакции распада органических соединений по связи углерод-кислород, б) действие на сложно-эфирные связи, в) окисление органических соединений молекулярным кислородом с образованием гидроксильной группы?

4.51. Какую функцию выполняют пептид-пептидгидролазы: а) действуют на сложноэфирные связи, б) используют восстановленные НАД и НАДФ в качестве субстратов, в) катализируют гидролиз небольшого числа внутренних пептидных связей в белковой молекуле?

4.52. Какую реакцию катализируют изомеразы: а)  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ , б) УДФ-глюкоза  $\rightarrow$  УДФ-галактоза, в) лактат + НАД<sup>+</sup>  $\rightarrow$  пируват + НАДН +  $\text{H}^+$ ?

4.53. Какую реакцию катализирует метилтрансфераза: а) *L*-тирозин + 2-оксоглутарат  $\rightarrow$  *n*-оксифенилпируват + *L*-глутамат, б) *S*-аденозилметионин + гистамин  $\rightarrow$  *S*-аденозилгомоцистеин + 1-метилгистамин, в) АТФ + НАД<sup>+</sup>  $\rightarrow$  НАДН +  $\text{H}^+$  + АДФ.

4.54. Какой фермент специфически ускоряет реакцию разрыва пептидных связей, начиная с С-концевой аминокислоты: а) трипсин, б) химотрипсин, в) карбоксипептидаза, г) пепсин, д) аминопептидаза?

4.55. Какой фермент является эндопептидазой, расщепляющей пептидные связи, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы лизина и аргинина: а) химотрипсин, б) папаин, в) пепсин, г) трипсин, д) карбоксипептидаза?

4.56. Какие из указанных ферментов являются амидазами: а) липаза, б) аспарагиназа, в) глутаминаза, г) аминаза, д) уреаза?

4.57. Какие из указанных ферментов являются гликозидазами: а) сахараза, б) гексокиназа, в) амилаза, г) липаза, д) мальтаза?

4.58. Какой фермент является углерод-кислород-лиазой: а) альдолаза, б) фумаратгидратаза, в) пантотеинатсинтетаза?

4.58. Как называются ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос групп: а) киназы, б) мутазы, в) рацемазы, г) оксигеназы, д) трансферазы?

4.60. С участием каких аминокислот пептидные связи избирательно гидролизуются химотрипсином: а) дикарбоновых аминокислот, б) аргенина и лизина, в) ароматических аминокислот, г) лейцина и глицина, д) метионина?

4.61. Как называются реакции, протекающие в соответствии с уравнением  $R_1-O_2-R_2 + H_3PO_4 \rightarrow R_1OPO_3H_2 + R_2OH$ : а) изомеризации, б) гидролиза, в) фосфоролиза, г) протеолиза, д) оксидоредукции?

4.62. Какую функцию выполняют ферменты гидроксилазы: а) переносят атомы водорода с одной молекулы  $H_2O_2$  на другую, б) ускоряют реакцию включения одного атома кислорода в субстрат в процессе биологического окисления, в) это-гемопротейд, обеспечивающий ускорение реакции переноса электронов за счет изменения валентного состояния атомов железа, г) переносят атом водорода с субстрата на пероксид водорода?

## 5. Кинетика ферментов

*Решите задачи и дайте объяснения:*

5.1. Покажите, что для ферментативной реакции величина  $K_m$  численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции вдвое меньше максимальной?

5.2. Полупериод реакции первого порядка равен 0.3с. Чему равна константа скорости  $k$ ?

5.3. В реакции первого порядка  $A \rightarrow B$  концентрация вещества А в начальный период была равна 0.50ммоль/л. Спустя 2 с она стала равной 0.25 ммоль/л. Какой она станет спустя 5 с?

5.4. В реакции второго порядка  $A + B \rightarrow C$  в начальный момент концентрация вещества А была равна 5.0 ммоль/л, В – 4.0 ммоль/л. Спустя 1 с

концентрация вещества А стала равной 4.0 ммоль/л, В – 3 ммоль/л. Каким будет отношение концентраций веществ А и В спустя 3 с?

5.5. Влияние концентрации субстрата на активность печеночной 6-фосфоглюконатдегидрогеназы при двух значениях рН изучали следующим образом: 0.9 мл буфера с рН 7.6 и 0.2 мл раствора НАДФ (0.3 ммоль/л) добавляли в пять спектрофотометрических кювет шириной 1 см. Затем в четыре кюветы добавляли различные количества раствора 6-фосфоглюконата (0.25 ммоль/л). Пятую кювету – без субстрата – использовали как контрольный образец. Объем проб в кюветах доводили дистиллированной водой до 2.9 мл и в определенный момент, принимаемый за нулевой, начинали реакцию, путем добавления 0.1 мл раствора фермента. Через каждые 30 с измеряли оптическую плотность при  $\lambda=340$  нм по отношению к контрольной кювете. Опыт проводили также при рН 9.0. Полученные данные представлены в таблице:

Активность 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в зависимости от концентрации 6-фосфоглюконата:

Время, мин	Оптическая плотность при объеме 6-фосфатглюконата, мл							
	0.2		0.3		0.6		1.8	
	рН 7.6	рН 9.0	рН 7.6	рН 9.0	рН 7.6	рН 9.0	рН 7.6	рН 9.0
0.5	0.011	0.004	0.014	0.010	0.014	0.013	0.02	0.022
1.0	0.022	0.009	0.026	0.016	0.027	0.023	0.054	0.040
1.5	0.031	0.013	0.037	0.022	0.040	0.033	0.060	0.056
2.0	0.041	0.017	0.047	0.028	0.051	0.042	0.063	0.067
2.5	0.050	0.021	0.057	0.033	0.062	0.051	0.076	0.089

Дайте возможно более полное и строгое объяснение влияния различных концентраций субстрата на активность фермента. Молярный коэффициент поглощения восстановленного НАДФ при  $\lambda = 340$  нм равен 6220. 6-фосфоглюконатдегидрогеназа катализирует окислительное декарбоксилирование своего субстрата. В процессе окислительного декарбоксилирования освобождается CO<sub>2</sub>, поэтому не требуется никаких специальных методических приемов для смещения равновесия реакции.

5.6. В одно-солевые экстракты двух органов (печени и сердца) взятых у одного животного, окисляли L-лактат с восстановлением НАД. Ниже приведены результаты, и полученные при изучении влияния различных концентраций субстрата на активность реакции, катализируемой лактатдегидрогеназами из этих экстрактов. Перед опытами тканевые экстракты диализировали против дистиллированной воды. Дайте полное и строгое обоснование своего ответа о кинетике лактатдегидрогеназной реакции.

Ход эксперимента: В кювету для спектрофотометра диаметром 1 см добавляли 0.5 мл экстракта ткани, 0.3 мл раствора НАД (10 ммоль/л), 0.2 мл раствора семикарбазида (30 ммоль/л) и 1.0 мл натрийфосфатного буфера, рН

Затем в кювету добавляли раствор L-лактата натрия (100ммоль/л) в количествах, указанных в таблице.

Доводили объем пробы в кюветах до 3 мл. Сразу после добавления лактата содержимое кювет перемешивали и измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре при  $\lambda=340$  нм. Затем оптическую плотность измеряли каждые 30 с. Результаты активности лактатдегидрогеназы из печени и сердца представлены в таблице:

Время после первого измерения, мин	Оптическая плотность при объеме добавленного L-лактата, мл			
	0.2	0.25	0.5	1.0
Экстракт печени				
0	0.016	0.012	0.023	0.031
0.5	0.050	0.052	0.080	0.106
1.0	0.084	0.092	0.137	0.174
1.5	0.117	0.131	0.208	0.252
2.0	0.140	0.169	0.249	0.328
2.5	0.180	0.207	0.305	0.397
Экстракт сердца				
0	0.013	0.030	0.023	0.015
0.5	0.052	0.074	0.082	0.084
1.0	0.090	0.119	0.137	0.155
1.5	0.127	0.162	0.196	0.222
2.0	0.163	0.204	0.258	0.290
2.5	0.199	0.245	0.315	0.350

Поглощение НАД при  $\lambda=340$  нм столь мало, что этой величиной можно пренебречь, тогда как восстановленная форма НАД при этой длине волны поглощает сильно(молярный коэффициент поглощения равен  $6.22 \times 10^3$ .)

В процессах с участием дегидрогеназ реакция, идущая в направлении восстановления НАД, часто оказывается термодинамически невыгодной. Поэтому при нейтральных значениях рН для смещения равновесия могут использоваться агенты, связывающие различные альдегиды или кетоны (в данном случае - семикарбазид).

5.7. Трансаминаза катализирует следующую реакцию: глутамат + оксалоацетат  $\alpha$ -кетоглутарат + аспатат. Коферментом этого каталитического процесса служит пиридоксальфосфат (ПФ). Рассчитайте величину  $K_m$  для комплекса апофермент-кофермент, исходя из приведенных ниже данных, при условии, что концентрация ПФ менялась, а все остальные параметры и, в частности, концентрации глутамата и оксалоацетата, оставались постоянными:

Скорость исчезновения глутамата, мг/мин <sup>-1</sup>	0.17, 0.27, 0.48, 0.65, 0.78, 0.79, 0.81
Количество добавленного ПФ, мкмоль/л	0.30, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0

5.8. Из приведенных ниже данных для ферментативной реакции определите, является ли действие ингибитора конкурентным или неконкурентным. Вычислите величину  $K_m$  для фермента и значение  $K_i$  для фермент-ингибирующего комплекса. Определите значение  $v_{max}$ :

Концентрация субстрата в, ммоль/л	2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 15.0
Скорость образования продукта в отсутствие ингибитора, мкг·ч <sup>-1</sup>	138, 179, 213, 313, 370
Скорость образования продукта в присутствии ингибитора (6 ммоль/л), мкг·ч <sup>-1</sup>	88, 121, 149, 257, 313

5.9. Салицилат ингибирует каталитическое действие глутаматдегидрогеназы. Определите путем графического анализа приведенных ниже данных, является ли ингибирование конкурентным или неконкурентным. Предполагается, что концентрация салицилата составляет 40 мкмоль/л и поддерживается на постоянном уровне. Вычислите величину  $K_m$  для фермента и значение константы диссоциации фермент-ингибирующего комплекса  $K_i$ :

Концентрация субстрата в, ммоль/л	1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 16.0
Скорость образования продукта в отсутствие салицилата, мг·мин <sup>-1</sup>	0.21, 0.25, 0.28, 0.33, 0.44, 0.40
Скорость образования продукта в присутствии салицилата, мг·мин <sup>-1</sup>	0.80, 0.10, 0.12, 0.13, 0.16, 0.18

5.10. Некоторые ионы могут активировать  $\alpha$ -амилазу слюны. Для изучения механизма активации фермента исследовали влияние pH среды на активность фермента, как в присутствии анионов, так и без них. Полученные данные по влиянию анионов на активность  $\alpha$ -амилазы слюны приведены в таблице:

pH	Скорость , усл. ед.		
	Без хлорида	Хлорид, 0.04 моль/л	Бромид, 0.04 моль/л
5.0	25	30	29
5.3	32	40	39
5.5	40	50	42
6.0	42	75	60
6.5	38	100	80
7.0	22	110	81
7.5	0.8	85	65
8.0	-	60	49
8.5	-	34	29
9.0	-	16	8

Что можно сказать о механизме активации  $\alpha$ -амилазы анионами,



основываясь на приведенных данных?

5.11. Для исследования влияния сульфата магния на активность фосфатазы (фермента, катализирующего гидролиз эфиров) был поставлен опыт. В ряд пробирок добавляли по 0.2 мл буфера, разные объемы раствора  $MgSO_4$  (10 ммоль/л) и раствор субстрата (100 ммоль/л). Объем пробы доводили дистиллированной водой до 1,8 мл. Пробы инкубировали в водяной бане при  $37^\circ C$ . С интервалом в 1 мин в каждой пробирке начинали реакцию, добавляли по 0.2 мл раствора фермента при помешивании. После 10 мин инкубации в водяной бане реакцию останавливали, добавляя по 10 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Пробы встряхивали и фильтровали.

Количество неорганического фосфата в фильтратах измеряли колориметрически. Фильтрат (5 мл) помещали в мерную колбу объемом 25 мл и добавляли 2,5 мл раствора молибдата, а также 15 мл Дистиллированной воды. Затем добавляли 1 мл восстановителя (0.1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты), объем доводили до метки водой и смесь перемешивали. Через 15 мин на фотоколориметре измеряли интенсивность окраски, используя красный фильтр. Результаты влияния магния на активность фосфатазы приведены в таблице:

Объем раствора $MgSO_4$ , мл	Показания колориметра при объеме субстрата, мл			
	0.06	0.10	0.20	0.50
0.10	0.84	1.35	2.14	3.03
0.20	1.18	2.00	2.84	4.25
0.40	1.47	2.42	3.52	5.00
1.00	1.75	3.03	4.35	6.55

Стандартная кривая была получена описанным выше методом, но вместо 5 мл фильтрата использовали разные объемы раствора  $KH_2PO_4$  (1 ммоль/л). Какие выводы вы можете сделать на основании результата?

5.12. По кинетическим точкам, снятым при разной концентрации субстрата, определите  $V_{max}$  и  $K_m$  для субстрата: cpm (counts per minute; импульсы распада в мин):

$[S] \times 10^{-4}$ М	0	5	10	15	20	30
1.00	20	500	1010	1470	2050	2700
1,43	10	754	1480	2230	2930	4420
1,70	10	937	1820	2631	3530	5270
2,33	15	1217	2380	3520	4720	7070
3.00	13	1400	2970	4520	6010	8400
5.00	17	2370	4820	7230	9550	14000
7.00	17	3010	5980	9060	11900	17000
10.0	23	1850	3680	5600	7390	10500
11,1	24	1710	3210	4900	6670	9669

12.0	21	1010	1990	3015	3900	5250
------	----	------	------	------	------	------

1) Рассчитайте величину  $V_{\max}$  при концентрации белка 0,015 мг/мл, если удельная активность субстрата 11000 срп/микромоль; аликвота для счета радиоактивности 10 мкл.

2) Рассчитать величину  $k_{\text{cat}}$ , если молекулярная масса белка 150 000.

5.13. Альфа-кетоглутарат является конкурентным ингибитором реакции окисления N-метил- L-глутамата, катализируемого N-метилглутамат-дегидрогеназой. Доказать, что ингибирование является конкурентным и определить константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор, исходя из данных таблицы:

Концентрация ингибитора, $\times 10^3$ , М	Концентрация субстрата, $\times 10^4$ , М	Скорость реакции, $\text{М} \times \text{мин}^{-1}$
0	4.10	2.08
	1,00	1,67
	0.625	1,43
	0,50	1,33
	0,417	1,25
	<u>0,264</u>	<u>1,00</u>
	4.1	1.96
	1,67	1,67
0,6	1,00	1,47
	0,625	1,18
	0,5	1,04
	<u>0,33</u>	<u>0,8</u>
	10.63	1.88
	5.0	1,56
3,0	1,67	1,00
	1,00	0,77
	0,667	0,57
	0,5	0,45

5.14. Фермент проявляет относительную специфичность. Определите, исходя из величины  $K_m$  тот субстрат, который будет подвергаться каталитическому превращению с наибольшей скоростью при концентрации субстрата, равной :

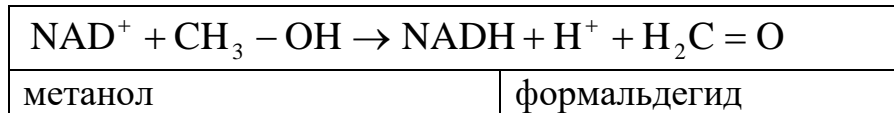
а)  $K_m=2 \times 10^{-1}\text{М}$ ; б)  $K_m= 2 \times 10^{-3}\text{М}$ ; в)  $K_m=2 \times 10^{-4}\text{М}$ ; г)  $K_m= 2 \times 10^{-6}\text{М}$ .

5.15. Сериновые протеазы проявляют групповую специфичность к субстратам. Эти ферменты имеют похожую структуру и общий каталитический механизм, но различаются по субстратной специфичности. Что определяет специфичность этих ферментов к субстрату, а что специфичность к пути превращения?

а) объясните название этих ферментов – «сериновые протеазы»;

б) сравните структуру каталитического и субстратсвязывающего участков активного центра химотрипсина, трипсина и эластазы.

5.16. Метанол (древесный спирт), который когда-то использовался как антифриз для автомобилей, очень токсичен; прием внутрь всего лишь 30 мл метанола может привести к смерти. Такая необычайно высокая токсичность метанола обусловлена действием не столько самого метанола, сколько продукта его метаболизма – формальдегида. Метанол быстро окисляется до формальдегида под действием фермента печени алкогольдегидрогеназы:

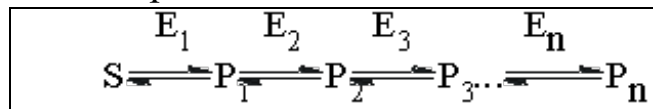


5.17. Один из методов лечения при отравлении метанолом состоит в том, что больному назначают этанол (этиловый спирт) либо внутрь, либо внутривенно в количествах, которые у здорового человека вызывают интоксикацию. Объясните, почему такое лечение оказывается эффективным?

*Регуляция активности и компартиментализация ферментов*

5.18. Чем отличается изменение ферментативной активности путем ковалентной модификацией от аллостерической регуляции?

5.19. В метаболической цепи реакций реакция, катализируемая ферментом E1, протекает с наименьшей скоростью.



а) Какой фермент может быть регуляторным в данной цепи реакций?

б) Какой из продуктов реакций (P1, P2, P3, Pn) может служить ингибитором метаболического пути? Объясните, почему.

в) Назовите тип регуляции.

г) Каковы структурные особенности регуляторного фермента?

5.29. Докажите, что быстрая и эффективная регуляция активности метаболического пути осуществляется аллостерическими ферментами, а не ферментами, подчиняющимися кинетике Михаэлиса.

5.21. Исследователям аденилатциклазной системы удалось выделить мутантные клетки мышинной лимфомы, способные связывать гормон и содержащие нормальное количество фермента аденилатциклазы. Однако присоединение гормона не приводило к повышению концентрации cAMP. Какой блок отсутствовал в цитоплазматической мембране мутантных клеток? Для ответа на вопрос:

а) приведите схему трансмембранной передачи сигнала;

б) укажите особенности строения этого белка;

в) объясните, какую роль играет этот белок в функционировании аденилатциклязной мессенджерной системы.

5.22. Для изучения инозитолфосфатной системы использовали мембраны клеток печени. В инкубационную среду добавили активатор рецептора и субстрат фосфолипазы С. Однако концентрация  $Ca^{2+}$  не возрастала. Что забыли добавить в инкубационную среду исследователи?

Для решения задачи:

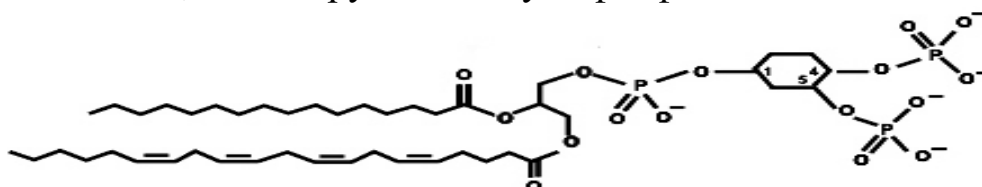
а) приведите схему инозитолфосфатной мессенджерной системы передачи сигнала; б) объясните, на каком этапе функционирования системы необходимо это вещество.

5.23. Существует выражение «сахарный диабет – это голод среди изобилия». Для обоснования этого выражения ответьте на вопросы и выполните задание:

а) в каких тканях протекает метаболизм по типу голодания на фоне гипергликемии; б) какие метаболические пути активируются и ингибируются в этих тканях; в) представьте схему одного из метаболических путей, скорость которого повышена в этих условиях; г) какие симптомы сахарного диабета отражают эти изменения метаболизма.

5.24. Изобразите схему передачи сигнала в фосфоинозитидной мессенджерной системе.

5.25. Назовите соединение, структурная формула которого изображена ниже, укажите связь, на которую действует фосфолипаза С.

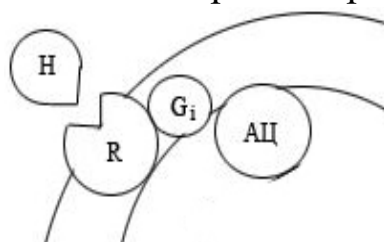


5.26. Объясните механизм стимулирующего действия кофеина.

5.27. Чем можно объяснить, что многие тирозинкиназные рецепторы вовлечены в процессы злокачественного роста?

5.28. Объясните причину ускорения инициации опухоли канцерогенами, при воздействии фибролитических эфиров.

5.29. В каком направлении будет изменяться активность аденилатциклазы в результате действия гормона на данный рецептор?



5.30. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) может приводить к нарушению основных функций биологических мембран. Одним из проявлений ПОЛ мембран является нарушение липид-белковых взаимодействий. Как это отразится на функциях белков мембран? Для ответа на этот вопрос:

а) объясните, какие компоненты молекул липидов подвергаются этой модификации; б) укажите, какие процессы, протекающие в клетке, могут быть источниками активных радикалов, иницирующих ПОЛ; в) приведите примеры мембранных белков и объясните влияние липидного окружения на их функции.

5.31. Молекула холестерина легко встраивается в бислою мембраны. Существует механизм защиты клеток от избытка ХС – это реакция его этерификации. Образованный продукт не удерживается в мембране. Как изменится содержание ХС в бислое при снижении активности этого фермента? Для решения задачи:

а) напишите схему реакции этерификации ХС, назовите фермент; б) укажите, какие изменения в структуре мембран наблюдаются при этом нарушении; в) объясните, как повышение содержания ХС будет влиять на функционирование мембранных ферментов.

5.32. Нарисуйте схему действия гидрофильных гормонов на примере адреналина.

5.31. Нарисуйте схему действия гидрофобных гормонов.

*Прикладное значение ферментов*

5.33. Составьте схему эксперимента по получению рекомбинантной гексозаминидазы А человека для ее использования в качестве лекарственного препарата.

5.34. Составьте схему эксперимента по сайт-специфическому мутагенезу глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы с заменой Arg132 на Ala.

5.35. Перечислите преимущества и недостатки рекомбинантных ферментов и рекомбинантных ферментативных систем перед природными.

5.36. Составьте схему эксперимента по изменению специфичности рестриктазы *esoi* методами генной инженерии.

5.37. Предложите конструкцию эффективного экспрессионного вектора.

5.38. Предложите схему эксперимента по созданию искусственного метаболического пути, объединяющего один бактериальный и один растительный фермент.

5.39. Предложите перечень методов с их краткой характеристикой, которые можно использовать для проверки того, что свойства ферментов действительно изменились после генно-инженерных манипуляций.

## Задания и упражнения для закрепления материала

### 6. Контрольные вопросы

#### 6.1. Структура и свойства ферментов

##### *Введение в энзимологию:*

1. Что такое катализатор реакции и в чем состоит его функция?
2. В чем сходство и различия механизмов химического и ферментативного катализа?
3. Какие методы используют для получения иммобилизованных ферментов?
4. Основные классы ферментов и примеры ферментативных реакций?
5. Прикладное значение ферментов?

##### *Методы регистрации ферментативной активности:*

1. Способы количественного выражения активности ферментов?
2. Определение активности ферментов: Характеристика стационарных методов определения активности ферментов?
3. Определение активности ферментов: Характеристика кинетических методов определения активности ферментов?
4. В чём отличия прямого и непрямого оптического теста Варбурга?
5. Способы расчёта ферментативной активности?
6. Что такое сопряженные реакции?
7. В чем состоит принцип колориметрического метода определения активности ферментов?
8. В чем состоит принцип билюминесцентного метода определения активности ферментов?

##### *Уровни структурной организации ферментов:*

1. Перечислите и подробно расскажите о стадиях сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию.
2. Что такое «расплавленная глобула»?
3. Что такое неспецифическая агрегация белка?
4. Какие известны механизмы регуляции процесса сворачивания полипептидной цепи внутри клетки?
5. Какие ферменты, участвуют в фолдинге белка?
6. Какие известны белки, увеличивающие эффективность сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию?
7. Чем шапероны отличаются от шаперонинов?
8. Что такое посттрансляционная модификация белка?

9. Роль доменов в пространственной организации молекул ферментов?

10. Увеличение числа доменов в ферменте и усложнение взаимодействий между ними?

11. Роль доменов в формировании активного центра фермента, в регуляции ферментативной активности и в связывании ферментов с мембранами?

12. Какие ферменты называют полифункциональными?

13. Расскажите о бифункциональных ферментах, катализирующих реакции одного метаболического пути.

14. Расскажите о бифункциональных ферментах, катализирующих противоположно направленные реакции.

### ***Топография активных центров простых и сложных ферментов:***

1. Как образуется активный центр у простых ферментов?

2. Радикалы, каких аминокислотных остатков наиболее часто встречаются в активных центрах ферментов?

3. Какие аминокислоты являются структурообразующими?

4. В чем сходство и отличие активных центров эластазы, трипсина и химотрипсина?

5. Как формируются активные центры сложных ферментов?

6. Какими методами можно изучать топографию активных центров ферментов?

7. В чем заключается метод химической модификации функциональных групп активных центров ферментов?

### ***Специфичность – уникальное свойство ферментов:***

1. Дайте определение специфичности.

2. Что такое относительная или групповая специфичность действия?

3. Как проявляют относительную специфичность сериновые протеазы?

4. Что такое абсолютная специфичность действия?

5. Что такое стереоспецифичность ферментов?

6. Расскажите о специфичности А- и В-классов NAD(P)-зависимых дегидрогеназ

7. Что такое концепция стерического соответствия «ключ-замок»?

8. Что такое концепция индуцированного соответствия?

## **6.2. Механизм действия, регуляция активности и компартиментализация ферментов**

### ***Ферменты в клетке и в организованных системах:***

1. Как можно выделить клеточные органоиды для определения в них активности ферментов?
2. Какие ферменты называют маркерными?
3. Какой фермент является маркером митохондрий?
4. В чем отличие мультиферментных комплексов от мультиферментных конъюгатов?
5. Какие преимущества имеет гликолитический метаболон по сравнению с неассоциированными в единую структуру гликолитическими ферментами?
6. В чем смысл наличия разных типов изоферментов лактатдегидрогеназы в скелетной и сердечной мышцах?

### ***Изостерические и аллостерические механизмы регуляции активности ферментов:***

1. Что такое зимоген?
2. Чем отличаются конститутивные и адаптивные ферменты?
3. Какие соединения могут выступать в качестве изостерических регуляторов активности ферментов?
4. В чем заключаются преимущества ферментов с положительной кооперативностью перед простыми ферментами?
5. Какие метаболические пути регулируются путем ретроингибирования?
6. Каким требованиям должен отвечать ключевой регуляторный фермент метаболического пути?
7. Что такое регуляторные энзимопатии, чем они отличаются от классических энзимопатий?

### ***Ковалентная модификация ферментов и ее типы:***

1. Какие известны типы ковалентной модификации ферментов?
2. Что такое зимоген?
3. В чем заключаются отличия функционирования протеинкиназы А и С?
4. Каким стимулом запускается ковалентная модификация ферментов?
5. В чем заключается ADP-рибозилирование?
6. Из каких компонентов состоит каскадный механизм регуляции



активности гликогенфосфоорилазы?

7. В чем особенности регуляции путем белок-белковых взаимодействий?

***Регуляция количества ферментов в клетке:***

1. Какими процессами определяется количество ферментов в клетке?
2. Каким образом осуществляется индукция синтеза ферментов?
3. Какие ферменты называют конститутивными?
4. В чем состоит особенность внутриклеточного протеолиза у прокариот?
5. Какие выявляются стадии протеолиза у прокариот?
6. Какой механизм убиквитин-протеосомного пути деградации белков у эукариот?
7. В чем состоит особенность строения 26S протеосомы?

***Факторы, определяющие эффективность действия ферментов:***

1. Чем гомогенный катализ отличается от гетерогенного?
2. В чём заключаются сходства и отличия ферментов с небиологическими катализаторами?
3. Расскажите о стадиях образования фермент-субстратного комплекса.
4. Природа сил, стабилизирующих различные конформационные состояния ферментсубстратного комплекса?
5. Какие взаимодействия называются электростатическими и почему?
6. Как образуются водородные связи?
7. При каких условиях возникают вандерваальсовы взаимодействия?
8. Что такое гидрофобные взаимодействия?
9. Какие факторы определяют эффективность и специфичность ферментативного катализа?
10. В чём заключаются физико-химические механизмы ферментативного катализа?

***Сходство и отличия мультиферментных комплексов от мультиферментных конъюгатов:***

1. Что такое мультиферментный комплекс?
2. Что такое мультиферментный конъюгат?
3. Пируватдегидрогеназный комплекс – это мультиферментный комплекс или конъюгат?
4. Синтаза жирных кислот – это мультиферментный комплекс или конъюгат?

5. В чём сходства и отличия мультиферментного комплекса и конъюгата?

***Белок-белковые взаимодействия в регуляции активности ферментов:***

1. Приведите примеры ферментов, в регуляции, активности которых принимают участие белок-белковые взаимодействия?

2. Какова структура протеинкиназы А?

3. Что такое псевдосубстратная последовательность в структуре протеинкиназы А?

4. Какое соединение является сигналом, приводящим к отделению регуляторных субъединиц от каталитических в протеинкиназе А?

5. В чём сходства и отличия мультиферментного комплекса и конъюгата?

### **6.3. Коферменты**

***Кофакторы ферментов и их роль в катализе:***

1. Классифицируйте кофакторы по структуре (коферменты, простетические группы, ионы металлов).

2. Классифицируйте кофакторы по функциональному признаку.

3. Функции кофакторов?

4. Рассказать о кофакторах окислительно-восстановительных процессов на примере никотинамидных кофакторов.

5. Рассказать о кофакторах переноса групп на примере коферментов – производных пиридоксина.

6. Рассказать о кофакторах процессов синтеза, изомеризации и расщепления С-С связей на примере биотина.

7. В чём заключается роль металлов в функционировании ферментов?

### **6.4. Классификация и номенклатура ферментов**

***Принципы классификации и номенклатуры ферментов:***

1. Оксидоредуктазы. Характеристика ферментов важнейших подклассов и подподклассов.

2. Трансферазы. Характеристика ферментов важнейших подклассов и подподклассов.

3. Гидролазы. Характеристика ферментов важнейших подклассов и подподклассов.

4. Лиазы. Характеристика ферментов важнейших подклассов и подподклассов.

5. Изомеразы. Характеристика ферментов важнейших подклассов и

подподклассов.

6. Лигазы (синтетазы). Характеристика ферментов важнейших подклассов и подподклассов.

7. Как используют молекулярный кислород в процессе реакции монооксигеназы?

8. Как используют молекулярный кислород в процессе реакции диксигеназы?

9. Какую функцию выполняет тетрагидробиоптерин в гидроксилазных реакциях?

10. Что является промежуточным переносчиком аминогрупп в реакциях, катализируемых аминотрансферазами?

11. К какому классу ферментов относится неорганическая пирофосфатаза?

12. Как формируется шифр фермента, если химизм реакции окончательно не установлен?

13. Почему каталаза не имеет рационального названия?

***Механизм действия карбоксипептидаз: карбоксипептидазы А – строение, свойства, механизм действия***

1. Какое место гидролазы занимают в общей классификации ферментов?

2. Классифицируйте гидролазы на типы по механизму действия.

3. Классифицируйте гидролазы на типы по строению активного центра.

4. Структура, свойства и биологическая роль карбоксипептидазы А?

5. Как происходит связывание субстрата карбоксипептидазой А?

6. Роль Липскомба с сотрудниками по установлению молекулярного механизма действия КПА?

7. Второй возможный механизм каталитического действия карбоксипептидазы А?

8. Какие методы используются для изучения механизма действия ферментов?

***Механизм действия оксидоредуктаз на примере алкогольдегидрогеназы:***

1. Какую реакцию катализирует алкогольдегидрогеназа?

2. Какой кофактор входит в активный центр алкогольдегидрогеназы?

3. Радикалы каких аминокислотных остатков осуществляют каталитическую и вспомогательную роль в активности алкогольдегидрогеназы?

4. Роль алкогольдегидрогеназы в метаболизме алкоголя?
5. Порядок взаимодействия субстрата и кофактора с активным центром алкогольдегидрогеназы?
6. Наблюдаются ли конформационные изменения в молекуле алкогольдегидрогеназы при взаимодействии с участниками ферментативного процесса?

***Специфичность сериновых протеиназ: механизм действия гидролаз на примере лизоцима:***

1. Строение, свойства и биологическая роль лизоцима?
2. Субстраты лизоцима?
3. Каким образом была построена модель, предсказывающая, как связывается с лизоцимом его эффективный субстрат гекса-NAG.?
4. В чём состоит суть гипотезы механизма каталитического действия лизоцима, предложенная Д. Филлипсом с сотрудниками?
5. Что такое ион карбония?
6. Каким образом электростатический фактор способствует промежуточному образованию иона карбония?
7. Каким образом геометрический фактор способствует промежуточному образованию иона карбония?

## **6.5. Ферментативный катализ**

***Факторы, определяющие эффективность действия ферментов***

1. Чем гомогенный катализ отличается от гетерогенного?
2. В чём заключаются сходства и отличия ферментов с небиологическими катализаторами?
3. Расскажите о стадиях образования фермент-субстратного комплекса.
4. Природа сил, стабилизирующих различные конформационные состояния ферментсубстратного комплекса?
5. Какие взаимодействия называются электростатическими и почему?
6. Как образуются водородные связи?
7. При каких условиях возникают вандерваальсовы взаимодействия?
8. Что такое гидрофобные взаимодействия?
9. Какие факторы определяют эффективность и специфичность ферментативного катализа?
10. В чём заключаются физико-химические механизмы ферментативного катализа?

### ***Создание ферментов с заданными свойствами путем сайт-специфического мутагенеза:***

1. Что такое сайт-специфический мутагенез?
2. В чём преимущества сайт-специфического мутагенеза перед другими классическими методами мутирования?
3. Какие мутации можно получить при использовании направленного мутагенеза?
4. В чём отличия сайт-специфический мутагенеза от сегмент-специфического?
5. Каким образом может быть использован сайт-специфический мутагенез для изучения механизмов катализа, субстратной специфичности ферментов, стабильности полипептидов?
6. Приведите пример создания фермента с заданными свойствами методом сайт-специфического мутагенеза с использованием эндонуклеаз рестрикции?
7. Приведите пример создания фермента с заданными свойствами методом сайт-специфического мутагенеза с использованием сайт-специфического олигонуклеотид-направленного мутагенеза?

В чём преимущества и недостатки использования сайт-специфического мутагенеза с применением эндонуклеаз рестрикции?

### ***Прикладное значение ферментов:***

1. Что такое иммобилизованный фермент?
2. Носители для иммобилизации ферментов.
3. В чем отличие физических и химических методов иммобилизации?
4. Каким критериям должны отвечать иммобилизованные ферменты, применяемые в качестве лекарственных средств?
5. Приведите примеры иммобилизованных ферментов, применяемых в медицине.
6. Можно ли использовать иммобилизованные ферменты как аналитические реагенты?

## 7. Тестовые задания и контрольные вопросы с ответами для самопроверки

### 7.1 Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ

**1. В присутствии фермента энергетический барьер реакции:**

1) снижается 2) повышается 3) не меняется

**2. Участок молекулы фермента, обеспечивающий его**

**взаимодействие с субстратом называется:**

1) кофермент 2) простетическая группа 3) апофермент 4) активный центр  
5) аллостерический центр

**3. В переносе водорода участвует кофермент:**

1) НАД<sup>+</sup> 2) ТПФ 3) ТГФКН 4) КоА

**4. Абсолютной специфичностью обладает фермент:**

1) липаза 2) лактаза 3) трипсин

**5. Изофермент ЛДГ1 представлен сочетанием субъединиц:**

1) НННН 2) НННМ 3) ННММ 4) НМММ 5) ММММ

**6. Активность пепсина желудочного сока при:**

$\text{pH} = 5$  1) повышена 2) снижена 3) в норме 4) отсутствует

**7. Величина константы Михаэлиса характеризует:**

1) зависимость от температуры 2) зависимость от  $\text{pH}$  3) сродство фермента и субстрата.

**8. Активация протеинкиназы а происходит за счет механизма регуляции:**

1) изостерический 2) аллостерический 3) белок-белок с изменением олигомерности 4) химическая модификация 5) ограниченный протеолиз

**9. ФОС являются ингибиторами ферментов, имеющих в активном центре:**

1) SH группу цистеина 2) OH группу серина 3)  $\text{Fe}^{3+}$

**10. Активация препепсина и протрипсина происходит путём:**

1) ограниченного протеолиза 2) фосфорилирования протеинкиназами 3) дефосфорилирования фосфатазами

**11. Дополнительное количество субстрата при конкурентном типе ингибирования скорость реакции:**

1) не меняет 2) увеличивает 3) снижает

**12. Ключевыми (регуляторными) ферментами в цепи реакций могут быть:**

1) первые 2) вторые 3) самые быстрые

**13. При нарушении синтеза тирозина из фенилаланина развивается заболевание:**

1) острый панкреатит 2) фенилкетонурия 3) серповидно-клеточная анемия

**14. При инфаркте миокарда в крови повышается активность:**

1) ЛДГ1, 2) ЛДГ2, 3) ЛДГ3, 4) ЛДГ4, 5) ЛДГ5.

**15. Для обработки гнойных ран применяется фермент:**

1) трипсин 2) сукцинатдегидрогеназа 3) амилаза 4) лактаза

**16. При отравлении цианидами тормозится активность фермента:**

1) липазы 2) амилазы 3) трипсина 4) цитохромоксидазы

**17. Участок молекулы фермента, при связывании с которым определенных веществ изменяется активность фермента называется:**

1) кофермент 2) простетическая группа 3) аллостерический центр 4) каталитический центр

**18. Не белковая часть фермента, соединенная прочной ковалентной связью с белковой называется:**

1) апофермент 2) простетическая группа 3) кофермент 4) кофактор

**19. Сульфаниламидные лекарственные препараты это конкурентные ингибиторы синтеза бактериями витамина:**

1) тиамин (В1) 2) рибофлавин (В2) 3) фолиевой кислоты 4) никотинамида (РР)

**20. Фермент, катализирующий реакцию**



**относится к классу:**

1) оксидоредуктазы 2) трансферазы 3) гидролазы 4) лиазы 5) изомеразы  
6) лигазы (синтетазы)

**21. К физическим механизмам регуляции активности фермента относят:**

1) изостерический 2) химическая модификация 3) ограниченный протеолиз 4) ацетилирование

**22. Фермент, катализирующий реакцию разрыва связи с участием молекулы воды, относится к классу:**

1) оксидоредуктазы 2) трансферазы 3) гидролазы 4) лиазы 5) изомеразы  
6) лигазы (синтетазы)

**23. Для особенностей живых организмов характерно:**

1) неустойчивое равновесие с окружающей средой 2) соподчиненность уровней организации 3) закрытая система с мембранами, ферментами и макроэргами 4) отсутствие самовоспроизведения и саморегуляции

**24. Для синтетических реакций необходимы:**

1) мононуклеотиды 2) макроэрги и восстановленные коферменты 3) окисленные коферменты 4) аденозин

**25. «Энергостанциями» клетки являются её органеллы: 1) рибосомы 2) ядро 3) митохондрии 4) лизосомы**

**26. Функцию синтеза белка выполняют органеллы клетки:**

1) митохондрии 2) лизосомы 3) гиалоплазма 4) рибосомы

**27. Конкурентные ингибиторы ферментов очень часто являются структурными аналогами:**

1) субстратов 2) конечных метаболитов 3) коферментов 34 4) простетических групп 2

**28. Коферменты – это:**

1) группа ферментов с одинаковой активностью 2) ферменты одного цикла 3) низкомолекулярные органические вещества (часто производные водорастворимых витаминов), необходимые для работы ферментов

**29. Значение ферментов для медицины заключается в:**

1) их участии в патогенезе заболевания 2) неиспользовании их в диагностике 3) невозможности применения ферментов и их ингибиторов как лекарств 4) участии их в сплайсинге

**30. Ферменты по химической природе – это:**

1) углеводы 2) липиды 3) белки 4) ДНК

**31. Ферменты – это:**

1) катализаторы 2) витамины 3) регуляторы 4) рецепторы

**32. Ферменты и неорганические катализаторы:**

1) не изменяются в процессе реакции 2) катализируют термодинамически невозможные реакции 3) сдвигают положение равновесия обратимых реакций 4) снижают энергию активации 5) обладают специфичностью

**33. Ферменты отличаются от неорганических катализаторов тем, что:**

1) действуют в жестких условиях 2) специфичны 3) не регулируются 4) снижают энергию активации

**34. Ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по составу и физико-химическим свойствам, называются:**

1) изоферментами 2) сопряженными ферментами 3) конкурирующими ферментами 4) лимитирующими ферментами

**35. Простой фермент состоит из:**

1) аминокислот 2) аминокислот и ионов металлов 3) аминокислот и витаминов 4) аминокислот и липидов

**36. Сложный фермент состоит из :**

1) аминокислот 2) аминокислот и кофактора 3) глюкозы и ионов металлов 4) нуклеотидов

**37. У простых ферментов в состав активного центра входят:**

1) нуклеиновые кислоты 2) ионы металлов 3) аминокислоты 4) углеводы

**38. У сложных ферментов химический состав активного центра представлен:**

1) только аминокислотами; 2) аминокислотами и кофактором; 3) аминокислотами и углеводами; 4) фосфолипидами

**39. Классов ферментов существует**

1) 5, 2)4, 3)8, 4)6

**40. Первый класс ферментов называется:**

1) трансферазы 2) гидролазы 3) оксидоредуктазы 4) лиазы



### Эталоны ответов:

1-7, 2-4, 3-1, 4-2, 5-1, 6-2, 7-3, 8-4, 9-2, 10-1, 11-3, 12-3, 13-2, 14-2, 15-1, 16-4, 17-3, 18-2, 19-3, 20-1, 21-1, 22-3, 23-2, 24-2, 25-3, 26-4, 27-1, 28-3, 29-1, 30-3, 31-1, 32-1, 33-2, 34-1, 35-1, 36-2, 37-3, 38-2, 39-4, 40-3

### 7.2 Контрольные вопросы

1. В каких условиях лучше хранить орган, приготовленный для пересадки: в термостате, при комнатной температуре, в холодильнике? Почему?

2. Ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, отличаются широкой субстратной специфичностью. Можно ли на этом основании считать, что они недостаточно совершенные ферменты?

3. Общая активность фосфатазы фруктозо-1,6-бисфосфата в гомогенатах печени двух крыс найдена одинаковой – 14 единиц на 1 г печени. Можно ли утверждать, что в 1 г печени обеих крыс содержится одинаковое количество молекул фермента?

4. Дайте современную биохимическую формулировку пословицам: «Яблоко от яблони недалеко падает» и «Если трясут яблоню, то с неё падают яблоки, а не груши».

5. При остром панкреатите у больных в крови резко увеличивается активность панкреатических ферментов. У больного взята кровь для определения активности панкреатической амилазы. Где следует хранить кровь до начала исследования и почему?

6. Почему не бывает лихорадки с температурой 70° С?

7. Ферменты, участвующие в переваривании белков в желудке и кишечнике, отличаются довольно широкой субстратной специфичностью. Можно ли на этом основании считать, что они недостаточно совершенные ферменты?

8. ЛДГ-- тетрамер из двух типов субъединиц М и Н. Сколько существует изоферментов ЛДГ? Почему определение изоферментов надёжнее в диагностике, чем определение суммарной активности ЛДГ?

9. По контракту Вы работаете в Африке. Можно ли до отвала накормить изголодавшегося ребенка? 10. Один из ингибиторов ферментов назначают 3 раза в сутки, другой - 1 раз в неделю. Почему?

11. У новорожденного в результате мутации отсутствует фермент лактаза, расщепляющий лактозу. Каковы проявления болезни? Как кормить ребёнка?

12. Одним из методов лечения при отравлении метанолом (приём внутрь 30 мл метанола может привести к смерти) является назначение этанола либо внутрь, либо внутривенно. Объясните, почему такое лечение является эффективным?

13. Для лечения длительно не заживающих ран используют мази, в состав которых входят трипсин, гиалуронидаза и другие ферменты. На чем основано их лечебное действие?

### **Ответы на контрольные вопросы**

1. Орган, приготовленный для пересадки, надо хранить в холодильнике, так как при этом лучше сохраняются нативные свойства (не активируются лизосомы, не разрушаются полимеры, не размножаются бактерии). Точнее – все это замедляется.

2. Нет, это не недостаток, а важное достоинство ферментов. Они могут метаболизировать очень многие ксенобиотики (ксенобиотики – чужеродные для организма вещества, в том числе большинство лекарств).

3. Нельзя, так как активность фермента зависит не только от количества молекул, активность ферментов регулируется. Большое количество молекул ингибированного фермента может иметь меньшую суммарную активность, чем меньшее количество высокоактивного фермента.

4. Эти пословицы отражают эмпирические наблюдения народа, что наследственные свойства передаются из поколения в поколение. На биохимическом языке это означает: ДНК→РНК→белок. Живым организмам присуще самовоспроизведение.

5. Хранить кровь до начала исследования следует в холодильнике. При низкой температуре протеазы крови будут неактивны и  $\alpha$ -амилаза не будет разрушена.

6. При повышении температуры выше 40°C многие ферменты начинают терять активность. При 70°C почти все белки, в том числе и ферменты, денатурируются.

7. Нет, это их важное достоинство: человек может переварить любую белковую пищу, в том числе и совершенно непривычную.

8. Существует 5 изоферментов ЛДГ: ЛДГ1 – НННН, ЛДГ2 – НННМ, ЛДГ3 – ННММ, ЛДГ4 – НМММ, ЛДГ5 – ММММ. В энзимодиагностике применяют тканеспецифичные ферменты, т.е. активные в каком-либо одном органе. ЛДГ не тканеспецифичный фермент, но его изоформы являются более 40 специфичными. Например, в сердечной мышце наиболее активна ЛДГ1, а в скелетных мышцах и в печени – ЛДГ5.

9. Нельзя. У голодающего репрессированы ферменты ЖКТ и в этих условиях не переваренная и полупереваренная пища вредны. Всасывание полипептидов может вызвать аллергические реакции от зуда и сыпи до коллапса. Выводить из голодания нужно путём постепенного увеличения пищи (субстрата), чтобы индуцировать ферменты, т.е. так же как вводят прикорм младенцу.

10. Несколько раз в день назначают обратимые ингибиторы, т.к. они действуют часы. Один раз в неделю можно назначать необратимые ингибиторы ( время их действия зависит от времени жизни белка).

11. Проявления: а/накопление не переваренной лактозы, в результате она сбрасывается в толстой кишке, что вызывает понос; б/ снижение всасывания углеводов приводит к нарушению питания – гипотрофии. Ребёнка следует кормить молочными смесями без лактозы, углеводы включать в рацион в виде глюкозы или фруктозы. Можно давать фермент лактазу как лекарственный препарат.

12. Токсичность метанола обусловлена формальдегидом, который образуется при действии алкогольдегидрогеназы. Этанол конкурентно связывается с активным центром алкогольдегидрогеназы, образуется ацетальдегид, который менее токсичен.

13. Лечебное действие мазей с добавлением трипсина и других ферментов основано на ферментативном разложении погибших клеток в гнойных ранах. В результате происходит очищение ран и уменьшение воспаления.

## Используемая литература

1. Основные понятия биохимии. Ферменты: учебное пособие для иностранных студентов / А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра химии и биохимии. – Иркутск: ИГМУ, 2014. –41с.  
Основные разделы биохимии. Краткий курс. Часть I: учебное пособие для студентов / И. Э. Егорова, А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра химии и биохимии. – Иркутск : ИГМУ, 2019. – 138 с.
2. Никульшина Л.Л. Использование достижений генной инженерии в терапии /Никульшина Л.Л., Панкова Е.Д// Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области 2018.- Т. 1, №2 (21) .-С.94-97
3. Основные понятия биохимии. Ферменты:учебное пособие для иностранных студентов / А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра химии и биохимии. – Иркутск: ИГМУ, 2014. –41с
4. Северин, Е. С. Биохимия: учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - Москва: ГЭОТАР- Медиа, 2019. - 768 с. - ISBN 978-5-9704-4881-6. - Текст: электронный // ЭБС 'Консультант студента' : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970448816.html> (дата обращения: 05.10.2022). - Режим доступа : по подписке.
5. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. - 3-е изд./ –М: ОАО «Изд-во «Медицина», 2012.-704 с.: ил.
6. Кленова, Н. А. Химия белка и ферментов [Электронный ресурс]. Часть 2. Ферменты: учебное пособие / Н. А. Кленова, О. Н. Макурина – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2015 – 32 с. - <http://repo.ssau.ru/handle/Uchebnye-posobiya-2/Nimiya-belka-i-fermentov-Ch-2-Fermenty-68272>.
7. Шлейкин А.Г. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н.— Электрон. текстовые данные.— СПб: Университет ИТМО, 2015.— 106 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/65803.html>.— ЭБС «IPRbooks»
8. Титова Н. М. Энзимология [Электронный ресурс]: методические указания к самостоятельной работе / сост.: Н.М. Титова, Т.Н. Субботина. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2012. – 62 с. — [bio.sfu-kras.ru/files/1895\\_SD.F.1\\_MY\\_CR\\_Enzimologiya\\_VN\\_2009\\_Titova.doc](http://bio.sfu-kras.ru/files/1895_SD.F.1_MY_CR_Enzimologiya_VN_2009_Titova.doc)
9. Гамаюрова В.С. Ферменты [Электронный ресурс]: лабораторный практикум/ Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е.— Электрон. текстовые данные.— Казань: Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2010.— 278 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/63527.html>.— ЭБС «IPRbooks»
10. Биохимия и молекулярная биология. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : конспект лекций / Н. М. Титова, А. А. Савченко, Т. Н. Замай и др. – Электрон. дан. (10 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. — [http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/175/u\\_lectures.pdf](http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/175/u_lectures.pdf)
11. Andryukov V.G. Biosensor technologies in medicine: from detection of biochemical markers to research into molecular targets (review). /Andryukov V.G., Lyapun I.N., Matosova E.V., Somova L.M //Sovremennye tehnologii v medicine.- 2020.-V.12,N.6.-P.70–85, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.09>
12. Филиппович Ю.Б. - Основы биохимии [Электронный ресурс]: М: Изд-во "Агар", 1999. -512 с. — <https://studfiles.net/preview/1726535/>
13. Nelson D.L., Cox M.M. Leninger Principles of Biochemistry (Fourth Edition). [Электронный ресурс]: [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru).
14. Аудиокурс Биохимия [Электронный ресурс]:

<https://search.rsl.ru/ru/record/01005494090>

15. <https://teach-in.ru/course/enzymology> -Лектор Асеев В.С. Основы энзимологии)
16. [64\\_Энзимология.pdf](#) Энзимология. Методические указания к лабораторным занятиям и самостоятельной работе студентов
17. Основные понятия биохимии. Ферменты:учебное пособие для иностранных студентов / А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра химии и биохимии. – Иркутск: ИГМУ, 2014. –41с.
18. [Ферменты в медицине и фармакологии.pdf](#)-
19. [Ферменты4.pdf](#)- Методические указания к лабораторным занятиям по теме “ФЕРМЕНТЫ”

## Содержание

Введение	3
Теоретический материал	
Тема 1 - Наука энзимология. Основные понятия и принципы механизма действия ферментов. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии. Значение энзимологии	4
Тема 2 - Организация ферментов в клетках и тканях. Основные свойства ферментов, лежащие в основе методов исследования ферментов. Методы изучения ферментов.	19
Тема 3 - Природа ферментов. Ферменты-сложные белки. Форма и динамика молекулы белка.	41
Тема 4 -Строение фермента. Домены. Активный центр фермента	
Тема 5 - Методические подходы к пониманию механизма действия ферментов. Механизм действия ферментов. Ферментативный катализ	77
Тема 6 - Ферменты-дирижеры. Активаторы и ингибиторы	101
Тема 7- Кофакторы и коферменты	117
Тема -8 Ферменты: Регуляция активности ферментов, локализация, классификация и номенклатура ферментов	132
Тема 9 – Энзимопатология	175
Практическая часть	
Тестовые задания	210
1. Структура и свойства фермента	210
2. Механизм действия, регуляция активности и компартментализация ферментов	214
3. Коферменты	216
4. Классификация и номенклатура ферментов	218
5. Кинетика ферментов	221
Задания и упражнения для закрепления материала	
6. Контрольные вопросы	230
6.1 Структура и свойства ферментов	230
6.2 Механизм действия, регуляция активности и компартментализация ферментов	232
6.3 Коферменты	234
6.4 Классификация и номенклатура ферментов	234
6.5 Ферментативный катализ	236
7.Тестовые задания и контрольные вопросы с ответами для самопроверки	
7.1Тестовые задания	238
7.2Контрольные вопросы	241
Используемая литература	244
Содержание	246

