

Лекция 2. Ф Е Р М Е Н Т Ы. КОФЕРМЕНТЫ

1. **Общие понятия энзимологии.** Ферменты (энзимы) – это биокатализаторы преимущественно белковой природы (иРНК тоже имеют ферментативную активность), которые принимают участие в химических реакциях в организме.

Слово «фермент» происходит от слова «*fermentatio*» - брожение, а энзим – от «*enzyme*», что означает закваска в дрожжах. Наука, изучающая ферменты, называется энзимологией или ферментологией.

Принятые обозначения в энзимологии:

E – фермент, энзим (“enzyme”).

S – субстрат – вещество, на которое действует фермент.

P – продукт реакции – вещество, образовавшееся в результате ферментативной реакции

Значение ферментов: ферменты принимают участие в большинстве процессов происходящих в организме – 1) реакциях синтеза и распада веществ, 2) процессах переваривания и всасывания, 3) освобождения энергии, 4) обеспечивают координацию биохимических реакций. Нарушение синтеза или активности ферментов приводит к возникновению болезней.

2. **История энзимологии:** В 1814 году Кирхгоф открыл, что солод ячменя вызывает брожение крахмала. Дальнейшее развитие ферментологии связано с именами Либиха, Пастера, Манасеиной, Лебедева. В 1913 году Ментен и Михаэлис выдвинули теорию механизма действия ферментов. В 1926 году (год рождения ферментологии как науки) Самнер выделил кристаллическую уреазу и доказал ее белковую природу. В 1969 году Меррифильд (Нью-Йорк) синтезировал искусственно рибонуклеазу.

3. **Номенклатура ферментов** принята V Международным конгрессом биохимиков (1961).

1. Систематическая номенклатура. Название фермента включает: химическое название субстрата; тип химической реакции (в соответствии с международной классификацией ферментов); суффикс «-аза». Например: L-Лактат:НАД⁺ - оксидоредуктаза.
2. Рабочая номенклатура. Название фермента образуется из химического названия субстрата с добавлением суффикса «-аза» либо из названия химического превращения субстрата с добавлением суффикса «-аза». Например: lipos (жир), фермент катализирующий его превращение называется «липаза». Лактатдегидрогеназа - это рабочее название фермента L-Лактат:НАД⁺ - оксидоредуктазы.
3. Тривиальное (исторически сложившиеся) название. Не дает представления о субстрате или типе химического превращения. Пример - пепсин, тромбин, трипсин, ренин.

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

4.Классификация ферментов (построена по типу химических реакций):

1.класс – оксидоредуктазы: катализируют окислительно-восстановительные процессы - (дегидрогеназы, оксидазы, цитохромы).

2.класс – трансферазы: катализируют реакции переноса химических групп, название берут от группы, которую переносят (метилтрансферазы, сульфотрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы, ацилтрансферазы).

3.класс – гидролазы: катализируют реакции гидролиза, т.е. расщепление субстрата с участием воды (пептидазы, эстеразы, фосфатазы, гликозидазы).

4.класс – лиазы: катализируют реакции расщепления ковалентных связей между атомами C, O, N, S негидролитическим путем (декарбоксилазы, альдолазы, дегидратазы).

5.класс – изомеразы: катализируют реакции изомеризации (эпимеразы, рацемазы, изомеразы).

6.класс – лигазы: (синтетазы) катализируют реакции синтеза молекул за счет энергии АТФ (АТФ-синтаза, пируваткарбоксилаза).

5. **Клеточная организация ферментативной активности**

Ферменты располагаются в субклеточных структурах (органеллах) соответственно их функциям. Например: а) в ядре содержатся ферменты преобразования нуклеиновых кислот; б) во внутренней мембране митохондрий – ферменты дыхательной цепи; в) в лизосомах –

гидролазы; г) в цитоплазме – ферменты гликолиза, синтеза жирных кислот; д) в матриксе митохондрий – ферменты ЦТК, окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, β -окисления жирных кислот; е) плазматическая мембрана содержит ферменты транслоказы, которые переносят через мембрану ионы Na^+ , K^+ , глюкозу, аминокислоты и т.д.

6. Принципы определения активности ферментов:

- по скорости исчезновения субстрата;
- по скорости накопления продуктов реакции.

Единицы активности ферментов. 1) За единицу активности фермента (U-unit, англ.) принимают такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль S (субстрата) за 1 мин. при оптимальных условиях ($1\text{U} = 1\text{ мкмоль/мин.}$)

2) В системе СИ активность выражают в каталах: 1 катал – количество фермента, катализирующее превращение 1 моля S за 1 сек. при оптимальных условиях ($1\text{кат.} = 1\text{ моль/с}$)

3) Удельная активность определяется количеством единиц ферментативной активности, которое приходится на 1 мг белка в биологическом объекте (U/мг белка)

В медицинской энзимологии активность фермента выражают в единицах (U) на 1 л биологической жидкости (сыворотки крови, мочи.): U/л

7. Свойства ферментов как биокатализаторов:

1) Специфичность (избирательность) действия. Выделяют такие виды ее:

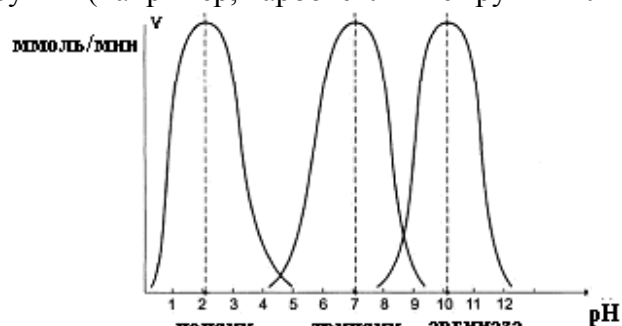
- а) абсолютная специфичность – фермент катализирует превращение только одного субстрата (один фермент – один субстрат). Пример – уреаза, аргиназа, сахараза, лактаза и др.
- б) стереоструктурная – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера (лактатдегидрогеназа превращает только L-лактат)
- в) относительная – фермент катализирует превращение группы веществ с одним типом химической связи (один фермент – одна связь). Пример – пептидазы, эстеразы, гликозидазы.

2) Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры. Ферментативные реакции, как и все химические реакции, ускоряются при повышении температуры (в 2-4 раза на каждые 10°C). Однако скорость ферментативной реакции имеет свой температурный оптимум, превышение которого приводит к понижению активности ферментов из-за тепловой денатурации их молекул. Для большинства ферментативных реакций температурный оптимум – $38-40^\circ\text{C}$, а при $50-60^\circ\text{C}$ и выше скорость ферментативных реакций сильно уменьшается из-за разрушения молекул фермента (искл. - миокиназа не инактивируется даже при 100°C). Зависимость активности ферментов от температуры называется термолабильностью. Ферменты лучше сохраняются при низких температурах – их активность снижается, но денатурации не происходит. Это свойство используется в медицине для производства препаратов ферментов. При некоторых операциях необходимо снизить скорость обмена веществ. Тогда используют охлаждение органов (например, при пересадке почек, сердца и др. органов).

3) Зависимость ферментативной активности от pH среды. Каждый фермент имеет свой pH-оптимум – значение pH, при котором его активность максимальна. Фермент, как и любой белок, имеет в своей структуре ионогенные группы (например, карбоксильные группы или



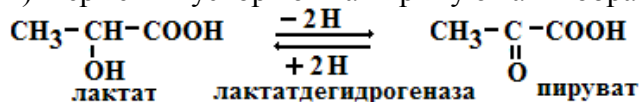
Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

аминогруппы в боковых цепях), а от концентрации ионов водорода зависит их диссоциация и соотношение между положительно и отрицательно заряженными группами. Соотношение между этими группами определяет и пространственное строение молекулы фермента (его конформацию), а следовательно, и его активность. Большинство ферментов наиболее активны при $\text{pH} = 6-8$. Исключения – пепсин ($\text{pH}_{\text{опт}} = 1,5-2$), аргиназа ($\text{pH}_{\text{опт}} = 10-11$).

4) Ферменты ускоряют как прямую так и обратную реакции (например, лактатдегидрогеназа)



5) Активность ферментов может изменяться под влиянием различных веществ, которые могут повышать (активаторы) или снижать (ингибиторы) скорость катализируемой реакции.

6) Ферменты в отличие от небиологических катализаторов проявляют более высокую активность и проявляют свою способность ускорять реакции в очень маленьких концентрациях (например, одна молекула карбангидразы способна расщепить 36 млн. молекул H_2CO_3).

7) Ферменты, как и небиологические катализаторы, катализируют только те реакции, которые подчиняются II закону термодинамики и являются энергетически возможными. Ферменты не входят в состав конечных продуктов реакции, не влияют на константу равновесия реакции, а только увеличивают скорость ее достижения.

8. Центры ферментов: Молекула фермента взаимодействует с субстратом не всей своей поверхностью, а определенными участками. На поверхности фермента различают:

Активный центр – это участок фермента, который взаимодействует с субстратом. Активных центров может быть 2, 4, 6, 8, в каждый входят 7-15 аминокислот. Наиболее часто в состав активных центров ферментов входят функциональные группы таких аминокислот:

- OH – группы серина, треонина, тирозина;
- SH – группы цистеина;
- NH – группа гистидина;
- COOH – группы глутамата и аспартата;
- NH₂ – группы аргинина и лизина.

В сложных ферментах в активный центр входят кофакторы (небелковые компоненты): простетические группы, коферменты, ионы металлов. Активный центр является комплементарным к строению S, имеется соответствие (комплементарность) E и S как “ключа и замка”. В структуре активного центра выделяют:

- участок, который связывается с субстратом: контактный (“якорный”) участок;
- каталитический участок, в состав которого входят химические группы, принимающие непосредственное участие в преобразовании субстрата (-OH, -SH, =N, -NH₃⁺, COOH).

Кроме активного центра, некоторые ферменты имеют дополнительный, регуляторный, **аллостерический** (allos – другой, steros – пространственный) центр, с которым взаимодействуют аллостерические регуляторы (эффекторы, модуляторы). Аллостерические эффекторы могут быть позитивными (активаторами), которые повышают каталитическую активность фермента или негативными (ингибиторами), которые ее снижают.

Активный и аллостерический центры локализуются на разных субъединицах фермента. При взаимодействии аллостерического центра с эффекторами происходят конформационные изменения активного центра фермента, что приводит к увеличению или снижению его активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются регуляторными.

9. Активаторы и ингибиторы ферментов

1. **Активаторы** – вещества, которые повышают скорость ферментативных реакций, увеличивают активность ферментов. Они бывают органической и неорганической природы.

Активаторы органической природы: желчные кислоты (активируют поджелудочную липазу), энтерокиназа (активирует трипсиноген), глутатион, цистеин, витамин C (повышают активность оксидоредуктаз).

Активаторы неорганической природы: например, HCl активирует пепсиноген, ионы металлов (Na, Cl, K, Mg, Mn, Zn) активируют очень многие ферменты. Ионы металлов: а) способствуют образованию фермент-субстратного комплекса; б) служат донорами и акцепторами электронов; в) принимают участие в образовании активного центра ферментов (Zn - в составе карбангидразы, Fe – в составе цитохромов, каталазы, пероксидазы); г) выступают в роли аллостерических регуляторов.

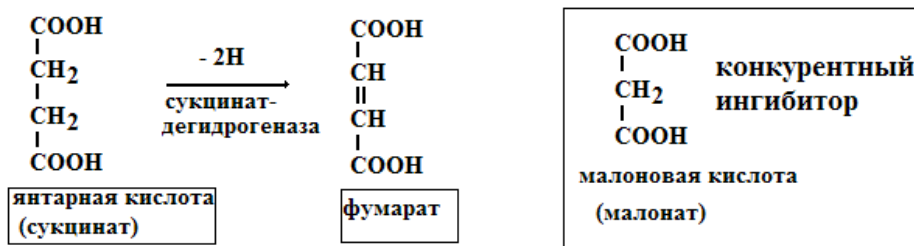
2. **Ингибиторы** – вещества, которые уменьшают активность ферментов и замедляют химические реакции. Различают **обратимое и необратимое** ингибирование:

Если ингибитор связывается с молекулой фермента слабыми связями ($E+I \leftrightarrow EI$) то такой ингибитор легко удаляется и активность фермента восстанавливается;

Если ингибитор связывается с молекулой фермента прочными ковалентными связями ($E+I \rightarrow EI$), то наступает необратимое подавление активности фермента

Необратимое ингибирование происходит при денатурация ферментов-белков под действием концентрированных кислот и щелочей, солей тяжелых металлов, ультрафиолетовом облучении. Некоторые ингибиторы образуют прочные недиссоциируемые связи с функциональными группами в активных центрах ферментов. Например, цианиды связываются с железом в ферментах-гемопroteинах. Фосфорорганические яды (табун, зарин, V-газы) образуют прочные связи с остатками серина и треонина входящими в состав многих ферментов.

Обратимое ингибирование делится на конкурентное и неконкурентное. **Конкурентное ингибирование** вызывается веществами, структурно сходными с субстратом и взаимодействующими с активным центром фермента. Например, малоновая кислота, является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, поскольку похожа на янтарную кислоту (также имеет 2 карбоксильных группы). Поэтому, малоновая кислота легко связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы, вытесняя оттуда субстрат – янтарную кислоту. Однако, фермент неспособен это сделать с малоновой кислотой, которая короче на 1 атом углерода. Поэтому если прибавить малоновую кислоту в концентрации, превышающей концентрацию янтарной кислоты, то реакция прекратится, поскольку малонат заблокирует активный центр сукцинатдегидрогеназы

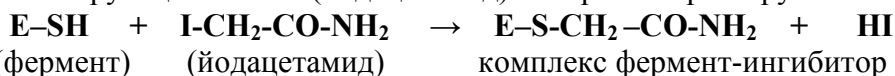


Поэтому если прибавить малоновую кислоту в концентрации, превышающей концентрацию янтарной кислоты, то реакция прекратится, поскольку малонат заблокирует активный центр сукцинатдегидрогеназы

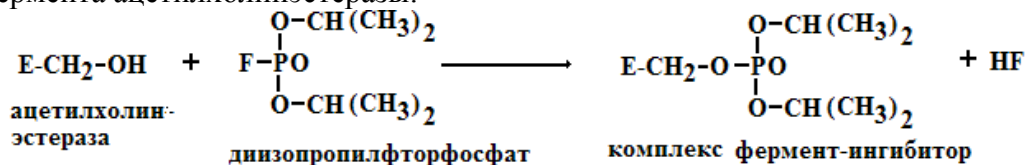
Конкурентные ингибиторы нередко используются в качестве лекарственных средств. Например, antimicrobial препараты сульфаниламиды являются структурными аналогами пара-аминобензойной кислоты из которой микроорганизмы синтезируют необходимый им для размножения витамин B₉ (фолиевую кислоту). Многие антибиотики конкурентно тормозят синтез белка микроорганизмами или репликацию ДНК. Противоопухолевые препараты (метотрексат, антагонист витамина B₉) блокирует репликацию ДНК в опухолевых клетках.

Неконкурентные ингибиторы не имеют структурного сходства к субстрату и присоединяются не к активному центру, а к другим участкам, в том числе и к аллостерическому центру. Ингибирование происходит вследствие разрушения или необратимой химической модификации функциональных групп ферментов. Примеры:

а) алкилирующие агенты (йодацетамид) необратимо реагируют с SH-группами ферментов



б) препараты ФОС (фосфорорганических соединений) это высокотоксичные яды для насекомых и теплокровных животных. Они взаимодействуют с гидроксигруппой серина в активном центре фермента ацетилхолинэстеразы:



в) тетурам – ингибитор ацетальдегиддегидрогеназы (используют при лечении алкоголизма).

10. Химическая природа и структура ферментов. Большинство ферментов имеют белковую природу, но ферментативной активностью обладает также и РНК (работы Томаса Чека).

Доказательства белковой природы ферментов таковы: а) потеря активности при кипячении; б) денатурация при УФ и рентгеновском облучении, действии ультразвука, кислот, щелочей, тяжелых металлов; в) гидролиз до аминокислот; г) осаждение под действием солей (высаливание) без потери каталитических свойств; д) высокая молекулярная масса, амфотер-

ные свойства, способность к электрофорезу; е) возможность искусственного синтеза из аминокислот (впервые так была синтезирована рибонуклеаза).

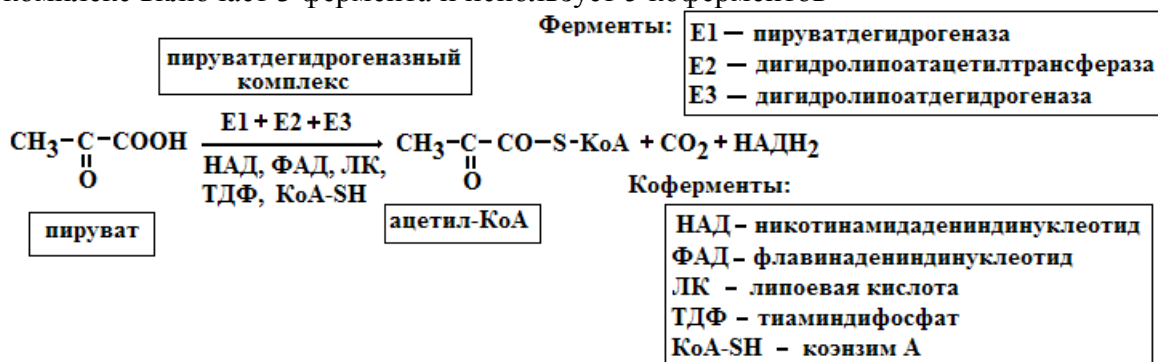
Структура ферментов. Ферменты делятся на простые и сложные. Простые ферменты являются белками и состоят только из аминокислот (например, ферменты 3 класса - гидролазы). Сложные ферменты состоят из белкового компонента (апофермента) и небелкового (кофактора). Кофактор может быть неорганической (металлы) и органической природы и в зависимости от прочности связи с апоферментом делятся на **протетические группы** (прочно, ковалентно связаны с апоферментом) и **коферменты** (слабо, нековалентно связаны с апоферментом). В целом сложный фермент (апофермент + кофактор) называется **холоферментом**.

11. Изоферменты. Часть ферментов состоят не из одной белковой цепочки, а из нескольких субъединиц. Изоферменты – это семейство ферментов, которые катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по строению и физико-химическим свойствам. Например: лактатдегидрогеназа (ЛДГ) состоит из 4 субъединиц 2х-типов: субъединица H, выделенная из сердечной мышцы (heart – сердце), субъединица M, выделенная из скелетных мышц (musculus – мышца). Эти субъединицы кодируются разными генами. В разных органах имеются различные формы ЛДГ с различным набором субъединиц. Известно 5 изоферментов ЛДГ:

ЛДГ₁: ЛДГ₂: ЛДГ₃: ЛДГ₄: ЛДГ₅:
(H₄) (H₃M) (H₂M₂) (HM₃) (M₄)

ЛДГ₁ экспрессируется в сердечной мышце и мозге, а ЛДГ₅ – в скелетных мышцах и печени. Остальные формы в других органах. Появление ЛДГ в крови свидетельствует о повреждении органов (фермент из разрушенных клеток поступает в кровь – гиперферментемия) Повышение активности фракции ЛДГ₁ в крови наблюдается при повреждении сердечной мышцы (инфаркт миокарда), а повышение активности ЛДГ₅ в крови наблюдается при гепатитах и повреждении скелетных мышц. То есть благодаря изоферментам можно определить локализацию поврежденного органа. Наиболее чувствительным тестом на инфаркт миокарда является повышение в крови сердечного изофермента креатинкиназы.

12. Мультиферментные комплексы это надмолекулярные образования которые включают, несколько ферментов и коферментов. Они катализируют последовательные этапы реакции преобразования одного субстрата. Примером мультиферментов являются реакции окислительного декарбоксилирования α-кетокислот (пирувата и α-кетоглутарата) под влиянием пируватдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы. Например пируватдегидрогеназный комплекс включает 3 фермента и использует 5 коферментов



Биологическое значение мультиферментных комплексов состоит в том, что благодаря их существованию облегчается перенос реагирующих веществ между отдельными ферментами и коферментами, что ускоряет протекание реакций. Мультиферментные комплексы, как правило, формируются на мембранах путем самосборки.

13. Механизм действия ферментов. Считается, что взаимодействие фермента и субстрата происходит по закону комплементарности. То есть конформация активного центра фермента должна соответствовать конфигурации субстрата (они подходят друг другу как ключ к замку). Позже была предложена теория «индуцированного» соответствия – замок формируется только в момент приближения субстрата к активному центру фермента. В процессе взаимодействия субстрата с ферментом выделяют 5 этапов:

- 1) присоединение фермента к субстрату и образование фермент-субстратного комплекса;
- 2) квантово-механические сдвиги, которые приводят к ослаблению связей;
- 3) разрыв или образование связей;

4) образование новых связей ведет к образованию продукта реакции, конфигурация которого уже не соответствует активному центру фермента;

5) освобождение продуктов реакции от фермента.

14. Типы каталитических процессов:

1) кислотный катализ – внедрение протона в субстрат;

2) щелочной катализ – отрыв протона от субстрата;

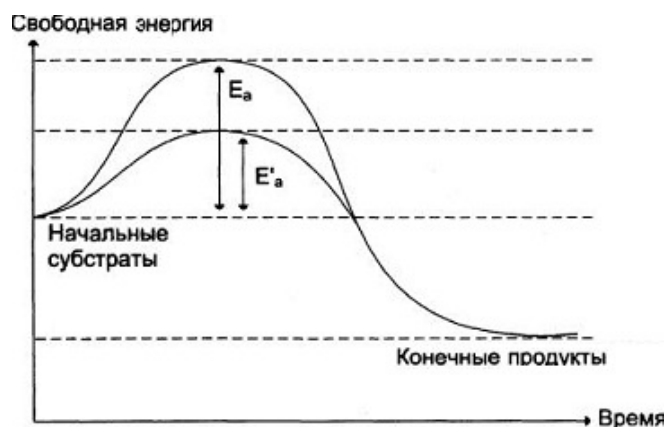
3) электрофильный катализ – внедрение электрона в субстрат;

4) нуклеофильный катализ – отрыв электрона от субстрата.

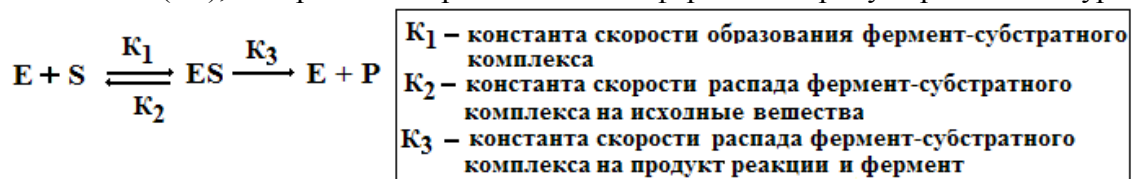
Эти процессы ведут к ослаблению связей, что облегчает прохождение химической реакции.

15. Понятие об – “энергии активации” и “энергетическом барьере”

С точки зрения термодинамики ферменты ускоряют ход химической реакции за счет снижения энергии активации. Энергия активации – это количество энергии, которое необходимо для перевода всех молекул 1 моля вещества в активное состояние. Энергетический барьер – это такое количество энергии, которое необходимо преодолеть молекулам, чтобы вступить в химическое взаимодействие. Величина энергии активации равняется величине энергетического барьера. Благодаря взаимодействию субстрата с ферментом (образование фермент-субстратного комплекса) химическая реакция, имеющая высокий энергетический барьер, разбивается на две и больше стадий, каждая из которых имеет более низкий энергетический барьер и протекание которых требует меньших затрат энергии. Поэтому, считается, что фермент снижает энергетический барьер, катализируемой им реакции.



16. Кинетика ферментативных реакций. Этот раздел энзимологии изучает влияние химических и физических факторов на скорость ферментативной реакции. В 1913 г. Михаэлис и Ментен создали теорию ферментативной кинетики, исходя из того, что фермент (E) вступает во взаимодействие с субстратом (S) с образованием промежуточного фермент-субстратного комплекса (ES), который далее распадается на фермент и продукт реакции по уравнению:



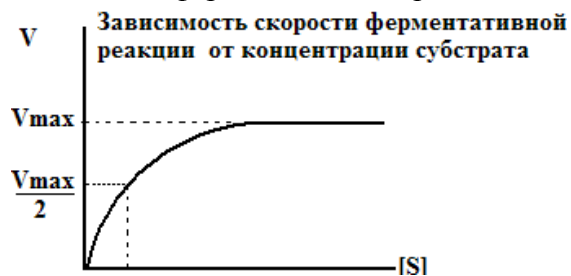
Каждый этап взаимодействия субстрата с ферментом характеризуется своими константами скорости. Отношение суммы констант скорости распада фермент-субстратного комплекса к константе скорости образования фермент-субстратного комплекса называется **константой Михаелиса (Km)**. Она определяет сродство фермента к субстрату. Чем ниже константа Михаелиса, тем выше сродство фермента к субстрату, тем выше скорость катализируемой им реакции. По величине **Km** каталитические реакции можно поделить на быстрые ($Km \cdot 10^{-6}$ моль/л и меньше) и медленные ($Km \cdot 10^{-2}$ - до 10^{-6}).

Скорость ферментативной реакции зависит температуры, реакции среды, концентрации реагирующих веществ, количества фермента и других факторов.

1. Рассмотрим зависимость скорости реакции от количества фермента. При условии избытка субстрата скорость реакции пропорциональна количеству фермента, но при избыточном количестве фермента прирост скорости реакции будет снижаться, поскольку уже не будет хватать субстрата.



2. Скорость химических реакций пропорциональна концентрации реагирующих веществ (закон действующих масс). Этот закон применим и для ферментативных реакций, но с определенными ограничениями. При постоянных количествах фермента скорость реакции действительно пропорциональна концентрации субстрата, но, только в области низких концентраций. При высоких концентрациях субстрата наступает **насыщение фермента субстратом**, то есть наступает такой момент, когда уже все молекулы фермента задействованы в каталитическом процессе и прироста скорости реакции не будет. Скорость реакции выходит на максимальный уровень (V_{max}) и дальше уже не зависит от концентрации субстрата. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата следует определять в той части кривой, которая ниже V_{max} . Технически легче определить не максимальную скорость, а $\frac{1}{2} V_{max}$. Этот параметр является главной характеристикой ферментативной реакции и дает возможность определить константу Михаэлиса (K_m). **K_m (константа Михаэлиса)** – это такая концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной. Отсюда выводится уравнение Михаэлиса–Ментена скорости ферментативной реакции.



Уравнение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$$V = \frac{V_{max}}{1 + K_m/S}$$

V - скорость реакции
 V_{max} - максимальная скорость
 K_m - константа Михаэлиса
 S - концентрация субстрата

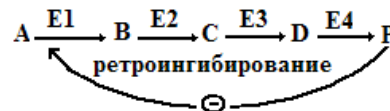
17. Регуляция скорости ферментативных реакций. Существуют 2 пути регуляции скорости катализируемых ферментами реакций: 1. Через изменение каталитической активности фермента. 2. Через изменение количества молекул фермента;

Первый путь регуляции ферментативных реакций (через изменение активности фермента) является очень быстрым и для изменения активности фермента требуются секунды или минуты. Чаще всего этот путь регуляции осуществляется благодаря наличию специальных **регуляторных ферментов**, которые находятся в начале или на перекрестках метаболических путей. Имеются такие варианты регуляции активности ферментов:

1. **По закону действующих масс:** Из этого закона следует, что при повышении концентрации субстрата автоматически повышается скорость ферментативной реакции.

2. **Аллостерическая регуляция активности ферментов.** Аллостерические ферменты имеют кроме активного центра, еще регуляторный (аллостерический) центр. С аллостерическими центрами взаимодействуют аллостерические регуляторы (эффекторы, модуляторы), способные изменить активность фермента. При этом модуляторами аллостерических ферментов могут как собственные субстраты (гомotropные регуляторные ферменты), так и продукты других метаболических путей (гетеротропные регуляторные ферменты).

2.1. Аллостерическая регуляция может осуществляться по **принципу обратной связи** (ретроингибирование), когда конечный продукт какого-то метаболического пути ингибирует активность фермента, стоящего в начале этого метаболического пути. Так, холестерин (конечный продукт) ингибирует одну из первых реакций его же образования – реакцию синтеза мевалоновой кислоты.



2.2. Возможен еще один путь аллостерической регуляции – **опережающая регуляция или активация предшественником**. Например: глюкозо-6-фосфат активирует фермент (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу), который обеспечивает дальнейшего превращения глюкозо-6-фосфата в пентозо-фосфатном пути.

3. Ковалентная модификация ферментов. Имеется несколько вариантов такой регуляции.

3.1. **Фосфорилирования - дефосфорилирования:** Эти процессы катализируются специальными ферментами (протеинкиназами), которые присоединяют остаток фосфорной кислоты от АТФ к гидроксигруппам серина, треонина, тирозина в молекуле фермента, что приводит к активации или снижению активности фермента. Остаток фосфорной кислоты устраняется из молекулы фермента с помощью других ферментов – протеинфосфатаз. В клетке беско-

нечно протекает цикл фосфорилирования-дефосфорилирования белков, который и обеспечивает изменение скорости метаболических процессов.

3.2. АДФ-рибозилирование. Некоторые ферменты активируются или угнетаются путем присоединения АДФ-рибозильного остатка (от кофермента НАД). Таким образом активируется фермент аденилатциклаза, ферменты апоптоза и т.д.

3.3. Изопренилирование и пальмитилирование белков. Присоединение изопреновых остатков (геранила и фарнезила) и остатков пальмитиновой кислоты идет, как правило, по остаткам цистеина в белках. Таким образом регулируется активность ферментов и других белков, принимающих участие в дифференциации и программируемой смерти клеток.

3.4. Окислительная модификация ферментов. Активные формы кислорода способны окислять SH-группы остатков цистерна в белках, превращая их в дисульфидные группы. Таким путем регулируются протеинкиназы и протеинфосфатазы, многие другие ферменты. Одни ферменты проявляют активность тогда, когда остатки цистеина находятся в тиольной форме, другие, наоборот, активны тогда, когда остатки цистеина находятся в дисульфидной форме.

4. Активация ферментов путем ограниченного протеолиза. Многие ферменты находятся в неактивной форме и их активация идет путем отщепления от молекулы профермента определенного пептида. Например: неактивный пепсиноген желудочного сока, под действием HCl превращается в активный фермент пепсин. Неактивный фермент трипсиноген превращается в трипсин, когда от него под действием энтерокиназы отщепляется пептид. Большинство ферментов системы свертывания крови также активируются путем протеолиза.

5. Действие регуляторных белков. Активность некоторых ферментов регулируется специальными белками. Например, белок кальмодулин после связывания ионов кальция приобретает свойства фермента и становится способным активировать фосфодиэстеразу, киназу легких цепей миозина. Белки альфа-антитрипсин и бета-2-макроглобулин являются ингибиторами многих протеолитических ферментов и т.д.

6. Компарментализация. Регуляция химических реакций осуществляется также за счет пространственного отделения внутриклеточными мембранами одних процессов от других. Например: мембраны лизосом ограничивают проникновение лизосомальных гидролаз в другие отделы клеток.

Второй путь регуляции ферментативных реакций (через изменение количества фермента) является путем длительной адаптации метаболических процессов в организме, требует для своего осуществления часы и дни и включения генетического аппарата. Выделяют **конститутивные ферменты**, которые синтезируются с постоянной скоростью и **адаптивные (индуцибельные) ферменты**, синтез которых начинается при поступлении в организм субстратов фермента или других регуляторов, необходимых для разблокировки соответствующих генов. К индуцибельным ферментам относят ферменты метаболизма чужеродных веществ, синтез которых начинается при поступлении в организм токсических соединений, или ферменты глюконеогенеза, синтез которых усиливается при увеличении потребности организма в глюкозе. Посредником в этих процессах чаще всего выступают гормоны, которые непосредственно регулируют активность генов, или циклические нуклеотиды (цАМФ, цГМФ), которые активируют целые ферментные каскады.

18. Клиническая энзимология. Различают энзимопатологию, энзимодиагностику и энзимотерапию.

Энзимопатология - это заболевания, которые обусловлены отсутствием или снижением активности ферментов. В основном это – наследственные болезни, обусловленные генетическими нарушениями. Их называют молекулярными болезнями. Например:

- дефекты ферментов обмена фенилаланина возникают при снижении активности фенилаланингидроксилазы (фенилпировиноградная олигофрения)
- дефект галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы) галактоземия;
- дефекты ферментов обмена гликогена – гликогенозы;
- дефекты ферментов обмена липидов – липидозы, болезнь Нимана-Пика и др.

Энзимодиагностика - это использование определения активности ферментов в биологических жидкостях для выявления тех или иных заболеваний. Так, повышение активности аланинаминотрансферазы и ЛДГ₅ в сыворотке крови свидетельствует о поражении печени (ге-

патиты), повышение активности сывороточной аспартатаминотрансферазы и ЛДГ₁ встречается при инфаркте миокарда, повышение активности амилазы в моче - остром панкреатите.
Энзимотерапия - это использование ферментных препаратов для лечения заболеваний. Так, в качестве заместительной терапии при болезнях желудка назначают пепсин, для усиления переваривания пищи применяют ферменты поджелудочной железы (препараты - фестал, мезим); для разжижения мокроты применяют ингаляции с трипсином; для рассасывания соединительнотканых рубцов - фермент гиалуронидазу; при растворения тромбов - фибринолизин, стрептокиназа и др.

КОФЕРМЕНТЫ

Коферменты - это небелковые компоненты сложных ферментов, которые проявляют высокую химическую активность и входят в состав активных центров сложных ферментов.

Классификация коферментов.

1. По химической природе: 1) витаминные; 2) витаминоподобные; 3) невитаминные.
2. По механизму действия: 1) переносчики атомов водорода, электронов и протонов.
2) переносчики отдельных химических групп.

Коферменты I группы переносчики атомов водорода, электронов и протонов:

А. *Невитаминные*: гем, глутатион,

Б. *Витаминные*: аскорбиновая кислота (АК), НАД и НАДФ, ФАД и ФМН, 5-дезоксаденозилкобаламин.

В. *Витминоподобные*: убихинон (коэнзим Q), липоевая кислота (ЛК), тетрагидробиоптерин (ТГБП), хиноновые коферменты.

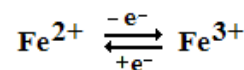
Коферменты II группы (переносчики различных химических групп):

А. *Невитаминные*: фосфаты нуклеозидов, фосфаты углеводов.

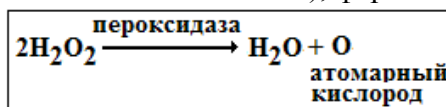
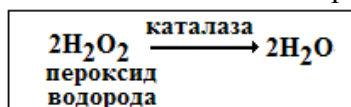
Б. *Витаминные*: ТДФ, КоА, ПАЛФ, биоцитин, ТГФК, метилкобаламин, витамины К и А

Невитаминные коферменты I группы

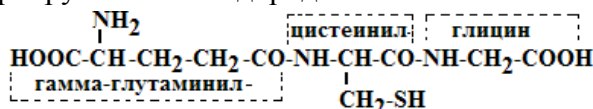
1. **Гем** - транспортирует электроны. Структуру гема составляет суперкольцо протопорфирина IX, которое состоит из 4 пирольных колец, соединенных метиновыми (-СН-) мостиками; 4-х метильных (-СН₃) групп, 2-х винильных групп и 2-х остатков пропионовой кислоты. В центре протопорфиринового ядра находится атом Fe²⁺. **Механизм действия**: Благодаря наличию в составе гема атома железа, ферменты содержащие гем способны транспортировать электроны. При этом железо переходит из двухвалентной формы в трехвалентную форму и наоборот:



Биологическая роль: гем входит в состав гемсодержащих ферментов: цитохромов (ферменты тканевого дыхания и микросомального окисления), ферментов каталазы и пероксидазы.



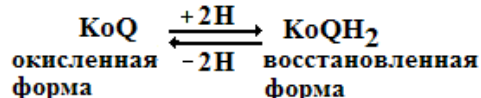
3. **Глутатион** (G-SH) - трипептид, состоит из остатков глутамата, цистеина и глицина (гамма-глутаминил-цистеинил-глицин) транспортирует атомы водорода. Имеет в своем составе свободную SH-группу цистеина, за счет которой осуществляется перенос атомов водорода или идет присоединение субстратов: $2\text{GSH} \leftrightarrow \text{GS-SG}$.



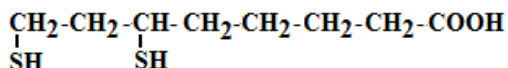
Биологическая роль: G-SH в качестве кофермента функционирует в составе ферментов: глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (антиоксидантных ферментов); глутатион-S-трансферазы, которая обезвреживает токсические ксенобиотики.

Витминоподобные коферменты I группы:

1. **Убихинон** (коэнзим Q) - липидорастворимый хинон с изопреноидной боковой цепью. Транспортирует атомы водорода и электроны. Входит в состав дыхательной цепи митохондрий.

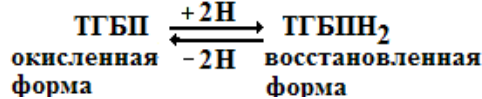


2. **Липоевая кислота**. Кофермент принимает участие в реакциях окислительного декарбоксилирования α-кетокислот. Входит в состав мультисубъединиц.



тиферментных комплексов: пируватдегидрогеназного и α -кетоглутаратдегидрогеназного.

3. ТГБП (тетрагидробиоптерин) переносит атомы водорода и электроны, входит в состав ферментов гидроксилирования: фенилаланингидроксилазы; триптофангидроксилазы.



4. Хиноновые коферменты (пирохинолинхинон, топахинон, триптофан-триптофилхинон) переносят атомы водорода. Образуются при конденсации глутамата и тирозина. Входят в состав ферментов MAO (моноаминоксидаз), вместе с Cu^{2+} : полиаминоксидаз и гистаминаз.

Витаминные коферменты I группы:

1. 5-дезоксаденозил-кобаламин образуется из витамина B_{12} в митохондриях. Биологическая роль - внутримолекулярный перенос атомов водорода. Входит в состав фермента метилмалонил-КоА-мутазы, который превращает метилмалонил-КоА в сукци-

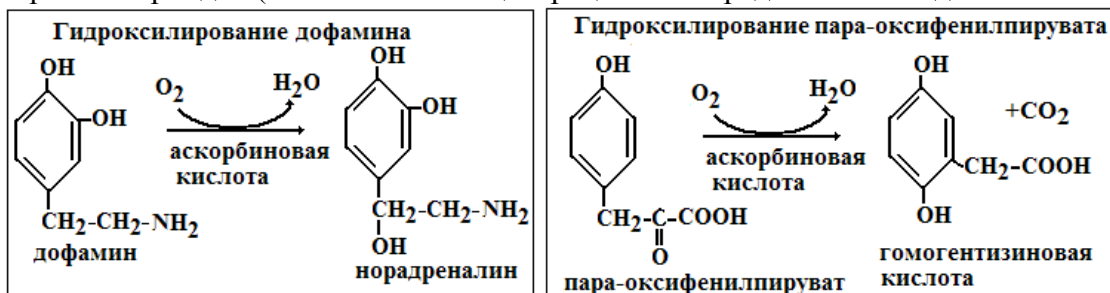
2. Аскорбиновая кислота (витамин С) образует в организме обратимую редокс систему. Биохимические свойства аскорбиновой кислоты (АК) связаны с ее способностью вступать в окислительно-восстановительные реакции. АК принимает участие в переносе атомов водорода и электронов. При окислении (дегидрировании) АК превращается сначала в свободный радикал АК, потом в дегидроаскорбиновую кислоту, а

дальше в 2,3-дикетогулоновую кислоту. Первые реакции являются обратимыми, а последняя реакция ведет к окончательному разрушению АК.



Биологическая роль АК:

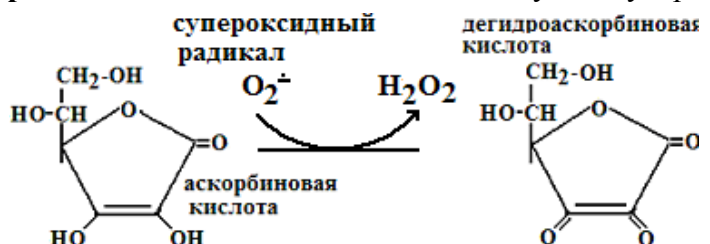
1. Кофактор реакций гидроксилирования: а). гидроксилирование дофамина в норадреналин, б). гидроксилирование пара-гидроксифенилпирувата в гомогентизиновую кислоту; в) гидроксилирование триптамина в 5-окситриптамиин; г) гидроксилирование пролина в гидроксипролин и лизина в гидроксилизин в коллагеновых белках (является кофактором пролилгидроксилазы); д) гидроксилирование γ -бутиробетаина в карнитин; е) гидроксилирование кортикостероидов (наибольшая концентрация АК определяется в надпочечниках)



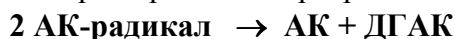
2. Антиоксидантные функции.

а) Взаимодействие со свободными радикалами. АК легко взаимодействует с супероксидным радикалом, превращаясь в дегидроаскорбиновую кислоту.

б) АК катализирует высвобождение иона Fe^{2+} из ферритина (последний выполняет роль депо железа в организме):



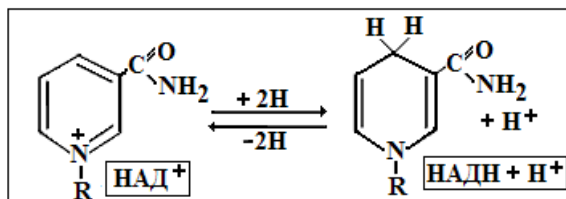
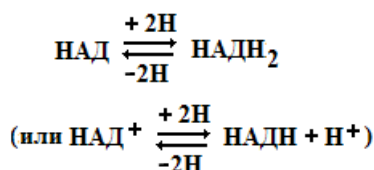
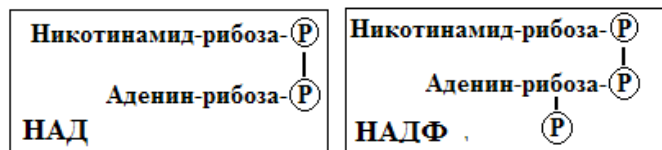
Далее два аскорбат-радикала превращаются при дисмутации в АК и ДГАК:



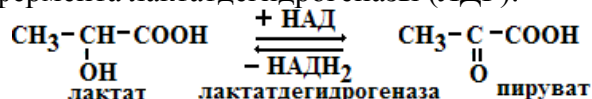
Регенерация ДГАК в аскорбиновую кислоту идет за счет восстановленного глутатиона, НАДН₂ и других коферментов переносчиков атомов водорода.

3. Никотинамидные коферменты: Это производные витамина РР, которые используются ферментами – оксидоредуктазами. Наиболее известными являются НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат).

Функция НАД и НАДФ состоит в переносе атомов водорода и электронов (эта реакция осуществляется за счет никотинамидной части молекул коферментов).



В качестве примера рассмотрим обратимую реакцию превращения лактата в пируват с участием НАД-зависимого фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ):



Роль НАД и НАДФ очень велика. Укажем на некоторые процессы, которые идут с участием НАД и НАДФ-зависимых дегидрогеназ: 1) гликолиз (аэробный, анаэробный); 2) декарбоксилирование α-кетокислот; 3) пентозофосфатный цикл (в нем идет синтез НАДФН₂); 4) цикл трикарбоновых кислот; 5) β-окисление и синтез жирных кислот; 6) синтез и гидроксिलирование холестерина и стероидов; 7) гидроксिलирование ксенобиотиков.

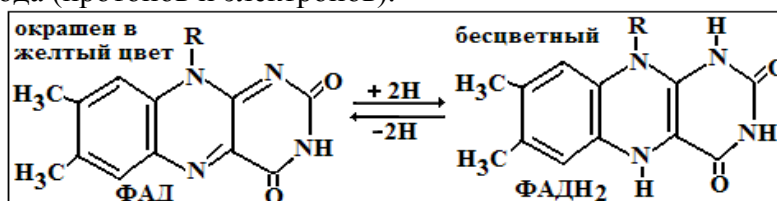
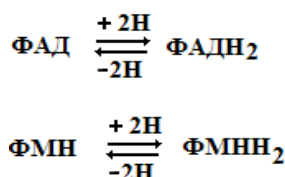
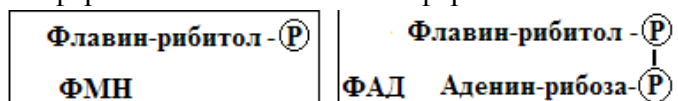
Некоферментные функции: **Моно-АДФ-рибозилирование** белков – это присоединение к белкам одного остатка АДФ-рибозы. Эта реакция вызывает изменение активности ферментов и регуляторных белков (белки мышц, АТФ-аза, альдегиддегидрогеназа и другие). Холерный и дифтерийный токсины имеют АДФ-рибозилтрансферазную активность, с чем и связана их высокая токсичность для организма.



Поли-АДФ-рибозилирование белков клеточных ядер (гистонов, факторов транскрипции) необходимо для регуляции экспрессии генов, дифференциации клеток.

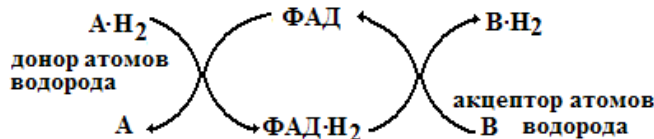
НАД служит источником **цикло-АДФ-рибозы**, который стимулирует выход кальция и запускает процессы, зависящие от кальция в клетке.

4. Флавиновые коферменты содержат витамин В₂ - рибофлавин, который имеет желтый цвет, поэтому они были названы желтыми коферментами. Главными коферментами являются ФМН (флавиномононуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид). Особенностью их структуры является то, что они содержат производное рибозы – спирт рибитол. Действующая часть кофермента – флаavin (в его основе лежит кольцо изоаллоксазина). Механизм действия ФАД и ФМН состоит в переносе атомов водорода (протонов и электронов).



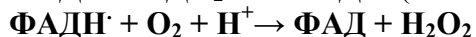
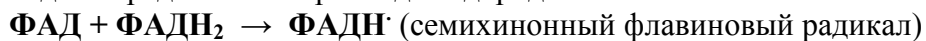
ФАД входит в состав ферментов - флавопротеинов, которые катализируют большое количество разных типов реакций. Выделяют три главных типа реакций:

1) Флавиновые ферменты осуществляют обратимую реакцию дегидрирования (отщепления-присоединения атомов водорода) от субстрата.

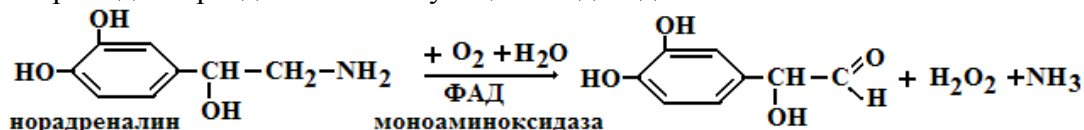


2) Флавиновые коферменты катализируют перенос атомов водорода (электронов и протонов) в дыхательной цепи митохондрий, забирая их от восстановленных никотинамидных коферментов (в процессе биологического окисления).

3) Флавиновые коферменты участвуют в свободно-радикальных реакциях. Именно флавиновые коферменты в дыхательной цепи митохондрий, являются основным источником супероксидного радикала и пероксида водорода.



ФМН и ФАД входят в состав многих ферментов - сукцинатдегидрогеназа, альдегидоксидаза, ксантиноксидаза, оксидаза D-аминокислот, моноаминоксидаза. Флавиновые ферменты принимают участие в β -окислении жирных кислот, в окислении спиртов, альдегидов, глюкозы, аминов, глицерина, пуринов (ксантина, гипоксантина, 6-метилпурина), производных никотина, хинолина, НАДН и НАДФН, амида липоевой кислоты. ФАД участвует в работе пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов, в окислении ксенобиотиков. Например, моноаминоксидаза окисляет биогенные амины – гормоны и нейромедиаторы до соответствующих альдегидов:

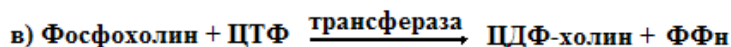
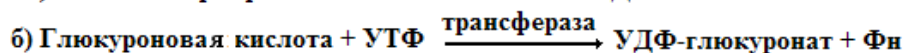
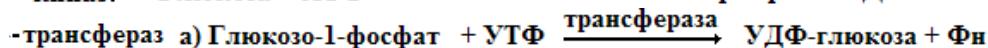
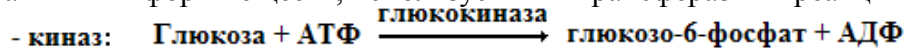


В реакциях, которые протекают с участием кислорода, флавопротеины переносят атомы водорода непосредственно на кислород, что ведет к образованию пероксида водорода. Такие флавопротеины относят к оксидазам (аэробным дегидрогеназам) – моноаминоксидаза, ксантиноксидаза.

Характеристика коферментов II группы

Невитаминные коферменты

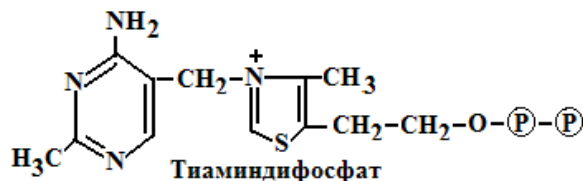
1. Фосфаты нуклеозидов. К ним относятся: АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ, ТТФ. Механизм действия: транспортируют фосфорные остатки. Биологическая роль: входят в состав ферментов, которые необходимы для включения веществ в дальнейший метаболизм или для образования активных форм веществ, используемых в трансферазных реакциях:



2. Фосфаты углеводов. Механизм действия: транспортируют фосфорные остатки и входят в состав ферментов: глюкозо-фосфат-изомеразы; фосфоглицератмутазы и других.

Витаминные коферменты

1. Тиаминдифосфат (ТДФ или тиаминпирофосфат). Кофермент состоит из двух гетероциклов (ядра тиазола и пиримидинового цикла) и пирофосфатного остатка. Тиаминдифосфат в составе ферментов катализирует окислительное декарбоксилирование пировиноградной и альфа-кетоглутаровой и перенос гликольальдегидной группы от кетосахаров на альдосахара в составе фермента транскетолазы.



2. Коэнзим А (КоА-SH), кофермент ацилирования (кофермент ацетил- и ацилтрансфераз)- участвует в метаболизме углеводов (декарбоксилирование пирувата и альфа-кетоглутарата), в реакциях окисления и синтеза жирных кислот, холестерина, гема, ацетилхолина, обезвреживании чужеродных веществ и др. КоА-SH - это типичный нуклеотид и состоит из адени-

лового нуклеотида соединенного с пантотеновой кислотой (витамин В₃) и бета-меркаптоэтиламиноном:

Функция КоА- SH состоит в активации и переносе остатков карбоновых кислот



Уксусная кислота

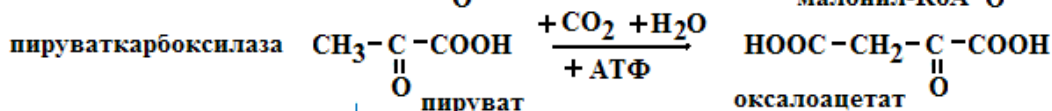
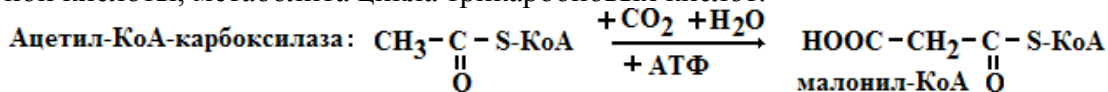
активная уксусная кислота (ацетил-КоА)

3.Пиридоксальфосфат (ПАЛФ) и пиридоксаминфосфат (ПАМФ) являются производным витамина В₆. ПАЛФ принимает участие в реакциях обмена аминокислот, переносит химические группы (NH₂, CO₂): а) в составе аминотрансфераз катализирует процессы переаминирования, перенося NH₂-группу с аминокислоты на кетокислоту; б) в составе декарбоксилаз принимает участие в процессах декарбоксилирования аминокислот с образованием биогенных аминов; в) в составе δ-амино-левулинатсинтазы участвует в синтезе гема; г) участвует во взаимопревращениях глицина и серина.

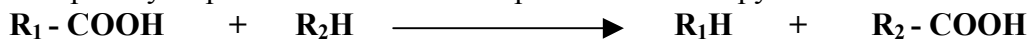


4.Биоцитин состоит из биотина (витамина В₈) и остатка лизина. Биотин это гетероцикл состоящий из имидазольного и тиофенового колец. Биоцитин является коферментом ферментов карбоксилаз, которые присоединяют CO₂ к молекуле карбоновой кислоты с удлинением цепи на 1 атом углерода.

1.Принимает участие в реакциях карбоксилирования с участием АТФ: например, образование малонил-КоА – интермедиата в синтезе жирных кислот или образование щавелевоуксусной кислоты, метаболита цикла трикарбоновых кислот.



2.Биоцитин принимает участие в реакциях транскарбоксилирования (без участия АТФ), при которых субстраты обмениваются карбоксильными группами:



5.Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК). Структура кофермента включает кольцо птеридина, пара-аминобензойную кислоту (ПАБК) и глутаминовую кислоту. ТГФК синтезируется из витамина В₉ (фолиевой кислоты)

под действием фермента дигидрофолатредуктазы, который присоединяет 4 атома водорода к фолиевой кислоте. Этот фермент ингибируется противоопухолевым препаратом метотрексатом, что ведет к торможению синтеза нуклеотидов, необходимых для репликации ДНК и тормозит рост опухоли.



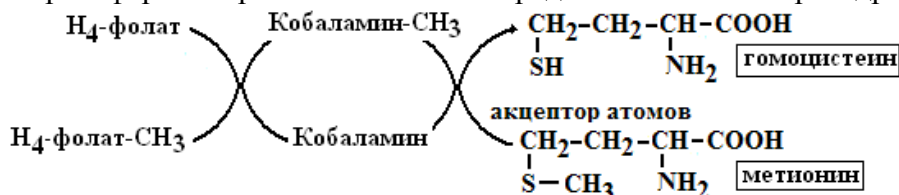
Бактерии в отличие от животных способны самостоятельно синтезировать фолат из предшественников – птеринового ядра, ПАБК и глутамата. Сульфаниламидные антимикробные препараты структурно подобны ПАБК и поэтому тормозят синтез ФК, задерживая размножение бактерий.

Функции ТГФК состоят в межмолекулярном переносе одноуглеродных фрагментов:

1. Метильного (-CH₃), ТГФК является синергистом другого кофермента – метилкобаламина, который также переносит этот важный остаток.
2. Метиленового (-CH₂-)
3. Метинильного (-CH=)
4. Оксиметильного (-CH-OH)
5. Формильного (-COH)
6. Форминоиминного (-CH=NH)

ТГФК принимает участие в обмене аминокислот (синтез метионина из гомоцистеина), в синтезе дезоксирибонуклеотидов (тимидилата для ДНК путем метилирования дУТФ) и пуриновых ядер (аденина и гуанина), холина, креатина, адреналина.

6. Метилкобаламин синтезируется из витамина В₁₂, структура которого очень сложная и включает коринное ядро, в центре которого расположен атом кобальта, соединенный с 4 пиррольными кольцами 2 ковалентными и 2 нековалентными связями (*хромофорная часть*). К ней перпендикулярно присоединяется лиганд-метильный радикал. Метилкобаламин принимает участие в метилировании гомоцистеина в метионин. Фермент гомоцистеинметилтрансфераза переносит метильный радикал из метилтетрагидрофолата на гомоцистеин.



Участие тетрагидрофолата и кобаламина в метилировании гомоцистеина

7. Витамин А (ретинол) принимает участие в синтезе гликопротеинов в качестве кофактора гликозилтрансфераз – ферментов, гликозилирующих белки. Переносит олигосахариды через мембрану. Гликопротеины – основа муцинов, которые покрывают слизистые оболочки. Витамин А является антиоксидантом, так как защищает мембраны от действия активных радикалов.

8. Витамин К - производное нафтохинона. Является кофактором гама-глутамил-карбоксилазы, которая активирует протромбин, превращая его в тромбин. Считается, что витамин К является кофактором 7 факторов свертывания крови и многих белков соединительной ткани и костей. Коферментная функция витамина К состоит в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты в белках. Благодаря этому в глутаминовой кислоте появляется дополнительная карбоксильная группа и такой белок приобретает способность связывать ионы кальция, что и запускает процесс свертывания крови и другие реакции (например, депонирование солей кальция в костях).

Вит. К + CO₂ + глутамат-белок → Вит. К-эпоксид + гамма-карбоксиглутамат-белок

9. Витамин Е (токоферол) является коферментом десатуразы жирных кислот, а также проявляет мощные антиоксидантные свойства