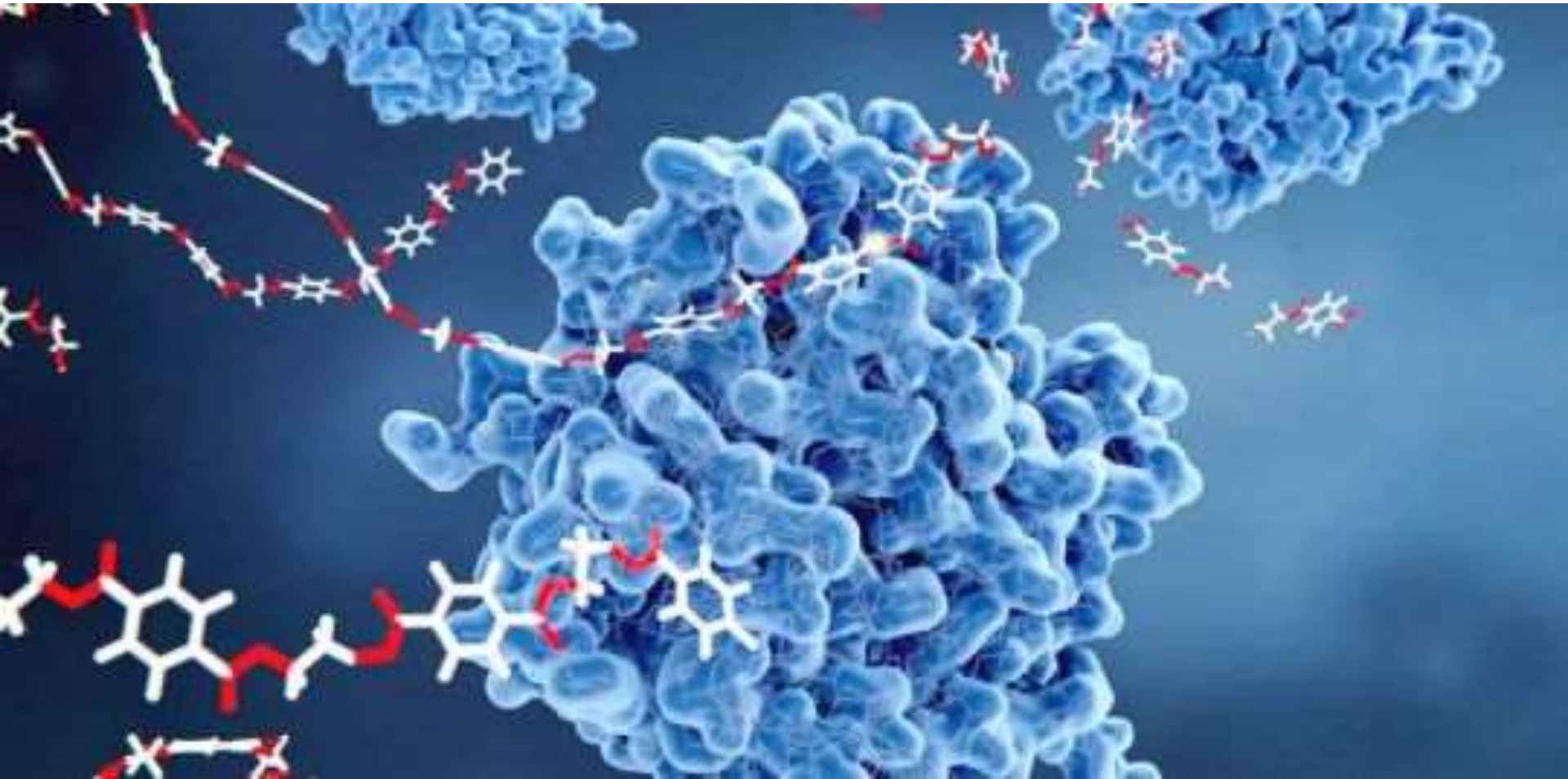


МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра біохімії

Хміль Д.О.

Ферменти



План лекції

- Будова ферментів
- Механізм дії ферментів
- Специфічність дії ферментів
- Класифікація та номенклатура ферментів
- Кінетика ферментативних процесів
- Механізми регуляції ферментативних процесів
- Регуляція ферментативних процесів за допомогою активаторів та інгібіторів

Фермент (від лат. *fermentum*, грецьк. ζύμη, ἔνζυμον — закваска) — глобулярний білок, який функціонує як біологічний каталізатор, прискорюючи швидкість реакції за рахунок зниження енергії активації, не впливаючи на реакцію, яку він каталізує. Таке загальне визначення підкреслює хімічну природу практично всіх існуючих ензимів, тобто всі ферменти – білки. Хоча є і винятки із цього правила (ферменти теломераз і трансляції — **рибозими**)

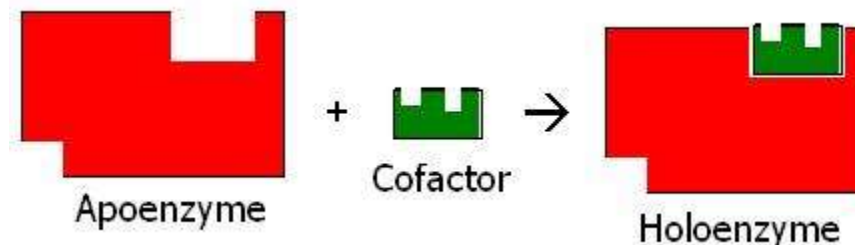
Будова ферментів

Ферменти мають велику молекулярну масу і можуть мати три або чотири рівні структурної організації. Молекулярна маса ферментів знаходиться в межах від 10 000 до 2 000 000 Да. Ферменти, для яких властива четвєртинна структура, називають олігомерними.

Залежно від будови ферменти поділяють на дві групи:

- 1) прості;
- 2) складні.

Прості ферменти мають лише білкову частину, складні – білкову та небілкову складові. Значна кількість відомих ферментів – складні, робота яких потребує обов'язкової наявності небілкового компонента.



Холофермент – це складний фермент, обов'язковою складовою якого є кофактор. Залежно від хімічної природи та міцності зв'язків між білковою та небілковою частинами ферменту можна поділити на:

Кофермент – небілкова органічна молекула, яка нековалентно зв'язана з апоферментом та може легко відділятися від нього (здебільшого коферментні форми водорозчинних вітамінів);

Простетична група – небілкова молекула, яка міцно, тобто ковалентно, зв'язана з білковою частиною ферменту, та не може бути відділена від неї (здебільшого іони металів (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}));

Some Inorganic Ions That Serve as Cofactors for Enzymes

| Ions | Enzymes |
|--------------------------------------|--|
| Cu^{2+} | Cytochrome oxidase |
| Fe^{2+} or Fe^{3+} | Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase |
| K^{+} | Pyruvate kinase |
| Mg^{2+} | Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase |
| Mn^{2+} | Arginase, ribonucleotide reductase |
| Mo | Dinitrogenase |
| Ni^{2+} | Urease |
| Zn^{2+} | Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B |

Механізм дії ферментів

Ферментативні реакції відбуваються шляхом зв'язування *субстрату* **S** з **активним центром ферменту** **E** кількома слабкими зв'язками.



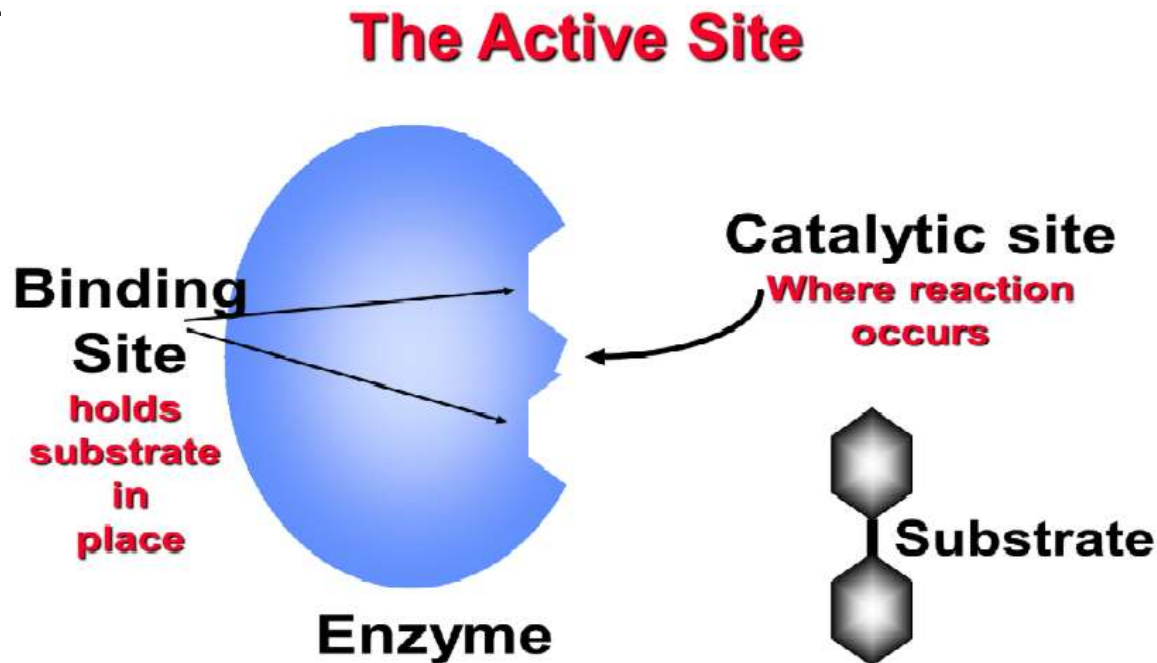
Формування *фермент-субстратного комплексу* **ES** є першим кроком у реакціях, що каталізуються ферментами. Після реакції фермент-субстратний комплекс перетворюється на *продукт* **P** і звільняє фермент для наступних реакцій.

Кожний фермент має функціонально активну ділянку – **активний центр** (для зв'язування та перетворення субстрату). В активному центрі складного ферменту розташований кофактор, без якого каталітичні перетворення неможливі.

Активний центр має дві ділянки:

якірну (контактна), де відбувається зв'язування субстрату з функціональними групами активного центру;

каталітичну – в цій ділянці безпосередньо відбуваються каталітичні перетворення.



Специфічність дії ферментів

На відміну від небіологічних каталізаторів *специфічність* – це одна із властивостей ферментів, яка полягає в тому, що фермент може каталізувати перетворення одного певного субстрату або групи подібних за структурою субстратів.

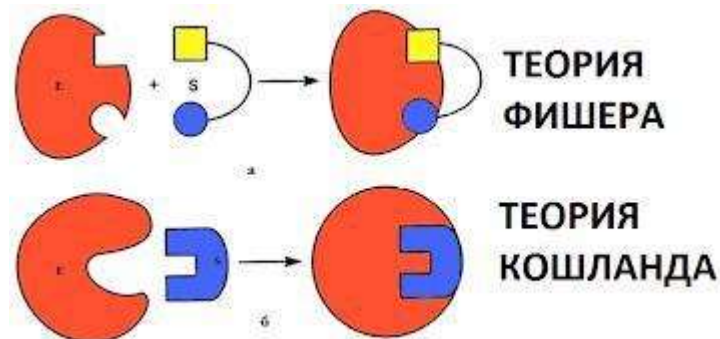
Виділяють три основні види специфічності:

- **стереохімічна** – фермент, який має таку специфічність дії може каталізувати перетворення лише одного стереоізо-мера (цис- або транс-; L- або D-). Наприклад: фумараза може перетворювати лише фумарову кислоту, але не її стереоізомер – малеїнову.
- **абсолютна** – фермент здатний каталізувати перетворення лише одного субстрату. Наприклад: для аргінази субстратом є виключно аргінін.
- **відносна** – фермент каталізує перетворення групи подібних субстратів, наприклад, з однаковим хімічним зв'язком. Наприклад: протеолітичні ферменти ШКТ (пепсин, трипсин, хімотрипсин та ін.) гідролітично розщеплюють білки та пептиди, так як розщеплюють пептидний зв'язок.

Пояснити наявність специфічності дії ферментів намагалися різні вчені, але найбільш робочими є моделі, які запропоновані Емілем Фішером (у 1890 р.) та Даніелем Кошландом (у 1959 р.).

Модель Фішера отримала назву «ключ-замок», тому що пояснювала взаємодію субстрату і ферменту за аналогією функціонування цього пристрою. На жаль ця модель може пояснити лише абсолютну специфічність дії ферментів, коли є лише один субстрат для ферменту.

Згідно з **моделлю Кошланда** активний центр ферменту є динамічною структурою і може змінювати свою конформацію під дією молекули субстрату. Крім того, конформаційні зміни відбуваються і в молекулі субстрату, що створює умови для більш ефективного каталітичного перетворення. Саме тому ця модель отримала назву «модель індукованої відповідності» і якщо наводити аналогію, може нагадувати систему «рука-рукавичка». Гіпотеза Кошланда знайшла експериментальне підтвердження, тому на відміну від гіпотези Фішера «ключ-замок» вона може мати назву *теорія* індукованої відповідності.



Класифікація та номенклатура ферментів

Ензимологія тривалий час залишалася без строгої номенклатури ферментів. Ферменти отримували за випадковими ознаками (**тривіальна номенклатура**). Наприклад, до тривіальної номенклатури слід віднести назви *пепсин* (від грецьк. пепсин – травлення) або *трипсин* (від грецьк. трипсис – розріджую). Іншим прикладом може бути назва *цитохромів* – забарвлених ферментів, які каналізують окисно-відновні реакції (від лат. *citos* – клітина, *chroma* – колір).

У 1961 році з'явилася **систематична номенклатура** ферментів, яка базується на чітких наукових принципах. Згідно з цією номенклатурою назва будь-якого ферменту обов'язково містить назву субстрату (субстратів), тип реакції та закінчення –аза. Наприклад лактатдегідрогеназа (ЛДГ або LDH), де лактат це назва субстрату, тип реакції – дегідрогеназна та закінчення –аза

Залежно від типу реакції, яку каталізують ферменти, виділяють **6 класів**, які поділяють на підкласи та підпідкласи. Кожен фермент має свій *код або шифр* (КФ або ЕС) – це номер ферменту за міжнародною класифікацією.

Кожен такий номер містить скорочення КФ/ЕС та послідовність із чотирьох цифр, які розділені комами. Перша цифра вказує на номер класу (один із шести). Друга – порядковий номер підкласу, який характеризує субстрат ферменту (за функціональної групою або зв'язком у складі субстрату, які є основними мішенями дії ферменту). Третя цифра – порядковий номер підпідкласу, який більш детально характеризує природу субстрату реакції. Четверте число – порядковий номер ферменту у підпідкласі. Наприклад, шифр КФ 1.1.1.1 належить алкогольдегідрогеназі, а КФ 2.7.1.1 – гексокіназа.

Класифікація ферментів

3.4.23.1. Перше число описує клас реакцій, що каталізує фермент:

| клас | назва | що каталізує | приклади |
|------|-----------------|--|--|
| КФ1 | Оксидоредуктази | окислення або відновлення | каталаза, алкогольдегідрогеназа |
| КФ2 | Трансферази | перенесення хімічних груп з однієї молекули субстрату на іншу | кінази |
| КФ3 | Гідролази | гідроліз хімічних зв'язків | естерази, пепсин, трипсин, амілаза |
| КФ4 | Ліази | розрив хімічних зв'язків без гідролізу з утворенням подвійного зв'язку в одному з продуктів. | декарбоксилази, дегідратази, аденілатциклази |
| КФ5 | Ізомерази | структурні або геометричні зміни в молекулі субстрату | Мутази, рацемази |
| КФ6 | Лігази | утворення хімічних зв'язків між субстратами за рахунок гідролізу АТФ. | ДНК-полімераза |

Кінетика ферментативних процесів

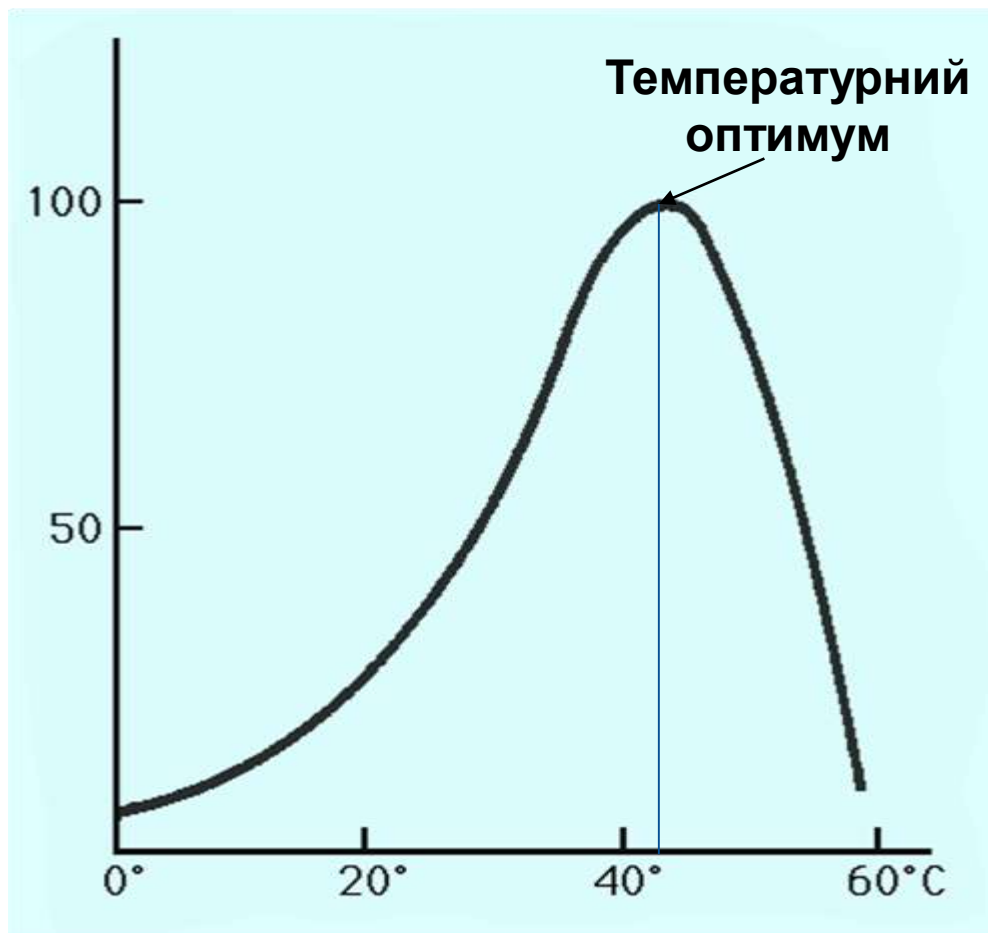
Кінетика ферментів – це розділ ензимології, який вивчає залежність швидкості ферментативної реакції від хімічної природи та умов взаємодії субстрату з ферментом, а також від факторів навколишнього середовища. Ферментативна кінетика надає інформацію про всі чинники, які впливають на швидкість реакції в живих організмах.

Фактори, що впливають на швидкість реакції:

- Температура
- Концентрація іонів водню (pH)
- Концентрація субстрату
- Концентрація ферменту
- Продукти реакції
- Наявність активатора/інгібітора
- Алостеричні ефекти
- Час

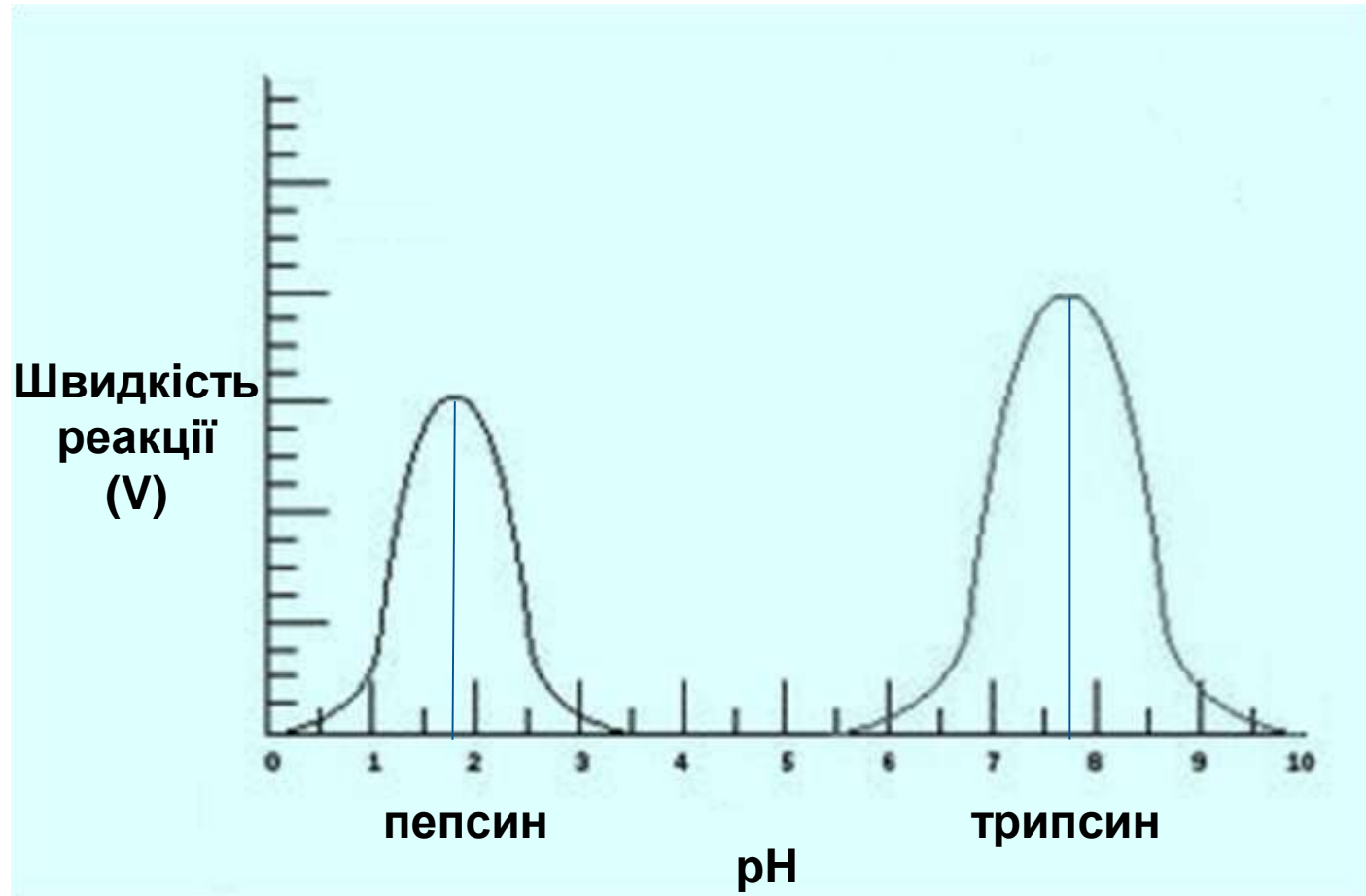
Вплив температури

Швидкість
реакції
(V)

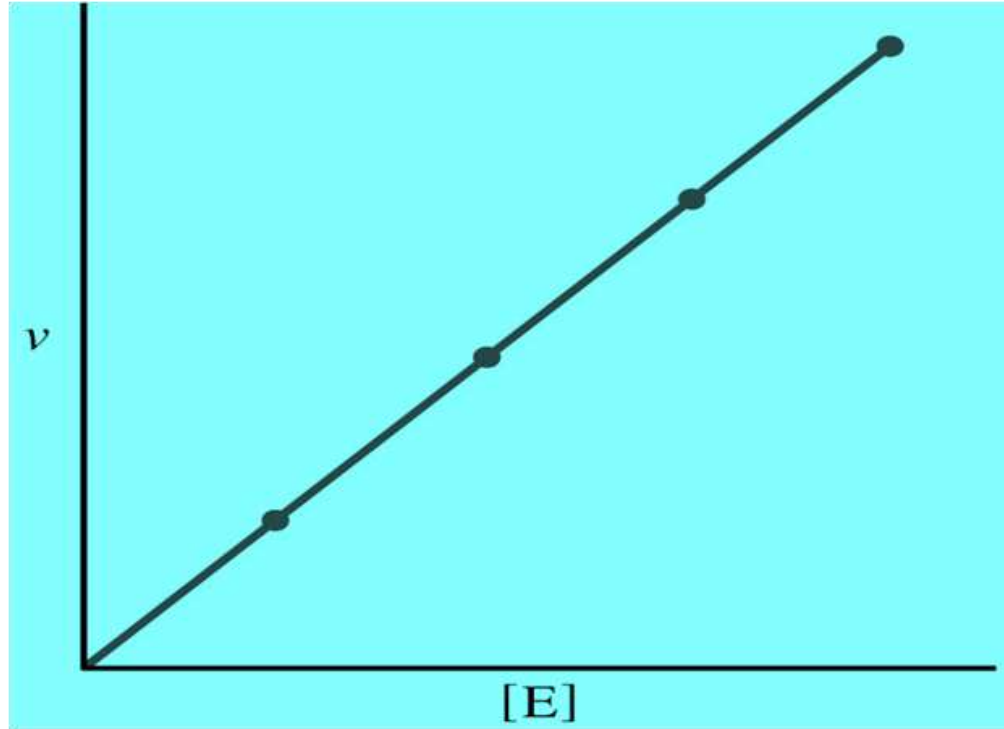


Температура (°C)

Вплив концентрації іонів водню (pH)

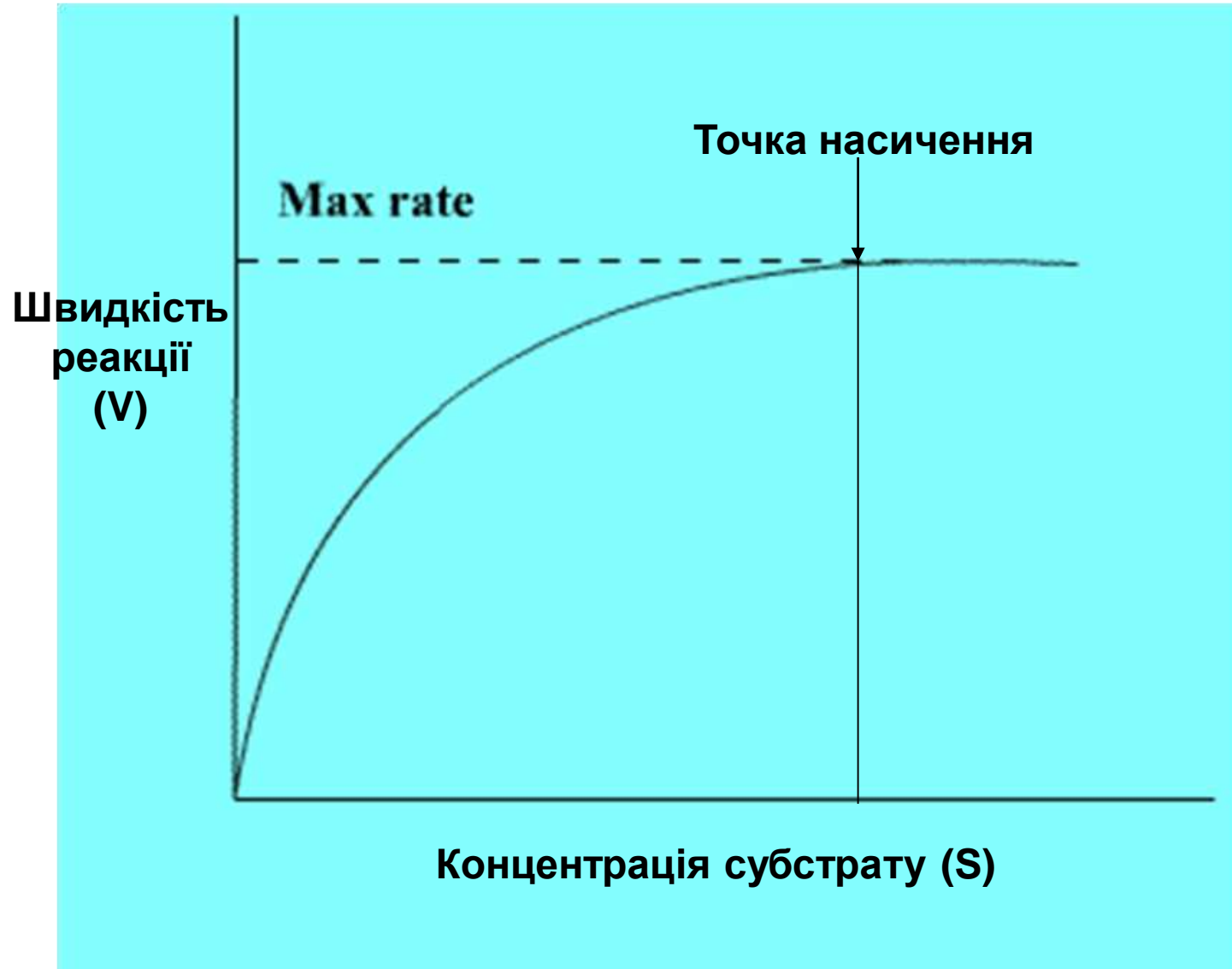


Вплив концентрації ферменту



Швидкість реакції (V) прямо пропорційна концентрації ферменту (E), коли присутня достатня кількість субстрату.

Вплив концентрації субстрату

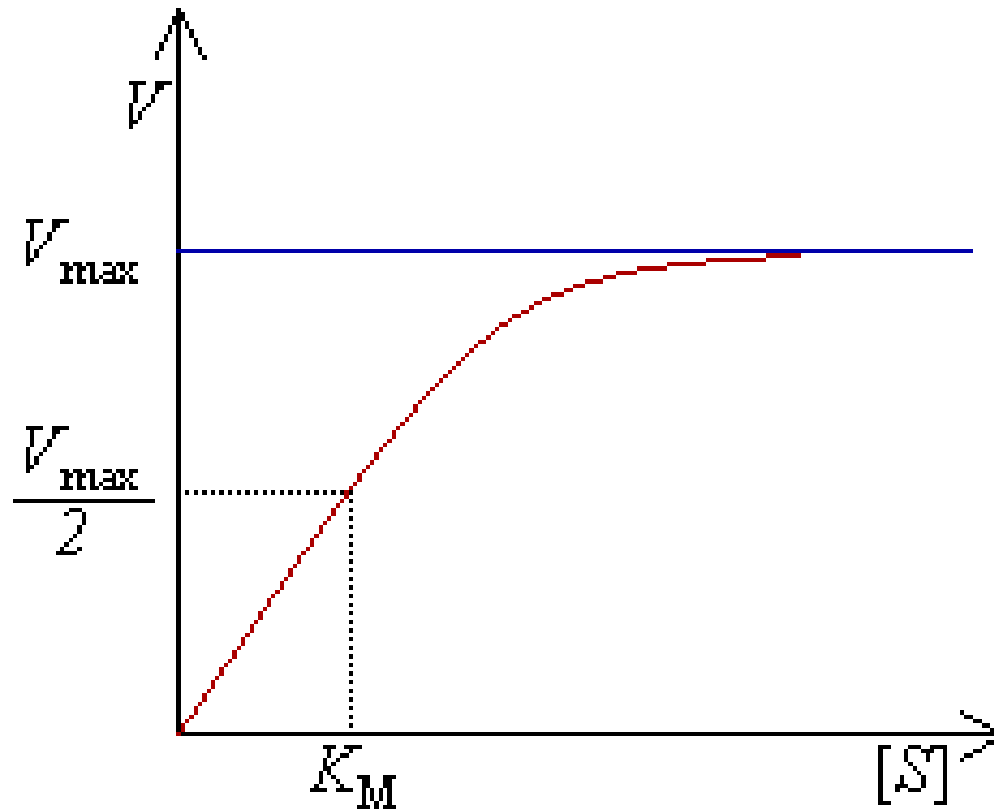


Залежність швидкості реакції від концентрації субстрату може бути описана рівнянням *Міхаеліса-Ментен*

Рівняння Міхаеліса-Ментен

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

де v – швидкість реакції; v_{max} – максимальна швидкість реакції; K_m – константа Міхаеліса; $[S]$ – концентрація субстрату.



З графіка видно, що K_M – це така концентрація субстрату ($[S]$), при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної швидкості ($V = 1/2V_{\max}$) та може служити мірою спорідненості ферменту до субстрату. Чим менше K_M , тим більша спорідненість ферменту до конкретного субстрату.

Механізми регуляції ферментативних процесів

Для прискорення або гальмування метаболічних процесів існує **два основних шляхи регуляції**:

- *зміна каталітичної активності ферменту;*
- *зміна кількості ферменту.*

У разі реалізації першого шляху кількість ферменту залишається без змін, відбувається активація або інгібування ензиму. Це найбільш поширений шлях регуляції

Зміна кількості ферменту – шлях регуляції ферментативних процесів, для реалізації якого потрібен більш тривалий час, ніж для зміни каталітичної активності. Це пов'язано з тим, що запуск або гальмування механізмів цього шляху відбувається на рівні генів.

Механізми зміни каталітичної активності ферментів:

1. Алостерична регуляція;
2. Ковалентна модифікація (фосфорилювання / дефосфорилювання);
3. Частковий (обмежений, лімітований) протеоліз;
4. Білок-білкові взаємодії.

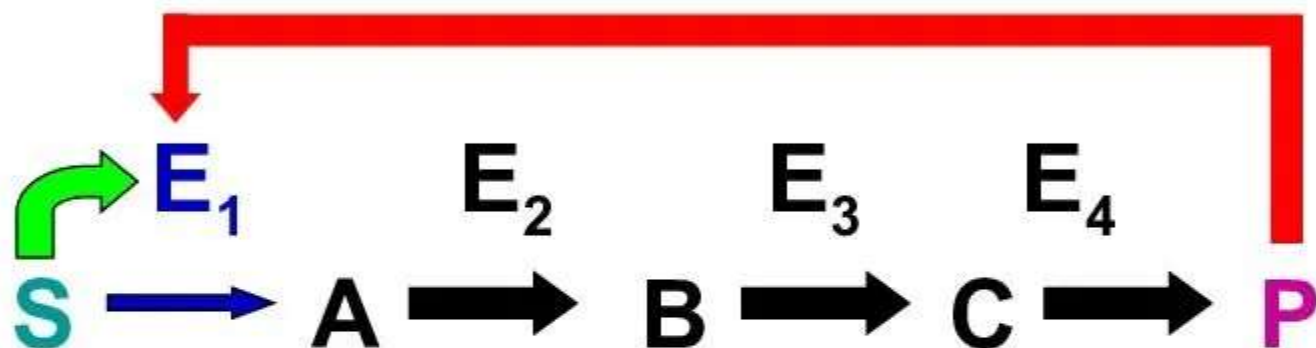
Алостерична регуляція

Алостерична регуляція характерна для особливих регуляторних (алостеричних) ферментів, які, крім активного, мають **алостеричний центр**, що відповідає за зв'язування з модифікаторами (*інгібіторами або активаторами*).

До основних властивостей та характеристик алостеричних ферментів слід віднести таке:

- усі алостеричні ферменти – це олігомерні білки, тобто складаються з декількох субодиниць;
- активний та алостеричний центри знаходяться на різних субодиницях. Субодиниця, яка містить активний центр, має назву каталітична і позначається «С», та яка містить алостеричний – регуляторна і відповідно має позначку «R»

Аллостерическими называют ферменты, активность которых регулируется обратимым нековалентным присоединением модулятора (активатора и ингибитора) к аллостерическому центру.



Активирование происходит по принципу прямой положительной связи, а ингибирование - по принципу отрицательной обратной связи.

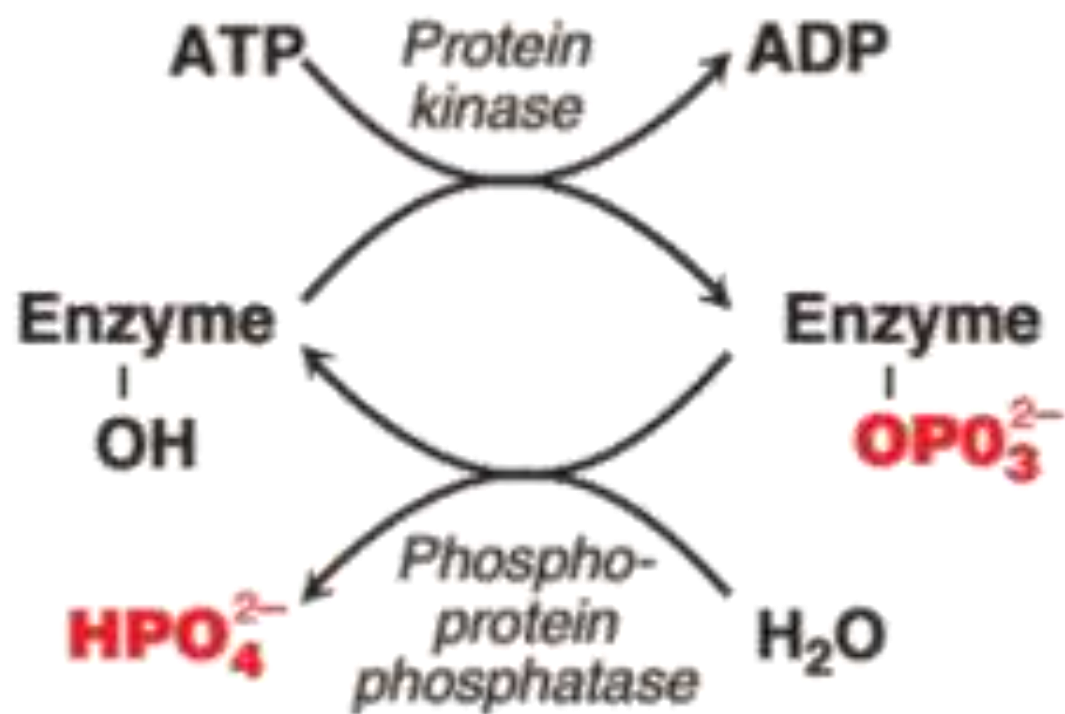
Активность аллостерических ферментов изменяется очень быстро

Ковалентна модифікація ферментів

Ковалентна модифікація ферментів, яка призводить до зміни їх активності, найчастіше відбувається шляхом **фосфорилування або дефосфорилування**. Крім того, іноді відбуваються інші модифікації, такі, наприклад, як **метилування, АДФ-рибозилування, аденілування**.

Приєднання залишку фосфорної кислоти відбувається до ОН-групи амінокислотного радикала ферменту, що призводить до конформаційних змін активного центру ензиму. Ефект такої модифікації залежить від ферменту, тому може спостерігатися як активація, так і пригнічення активності.

Фосфорилування каталізують ферменти **протеїнкінази** за участі АТФ, дефосфорилування – **протеїнфосфатази**

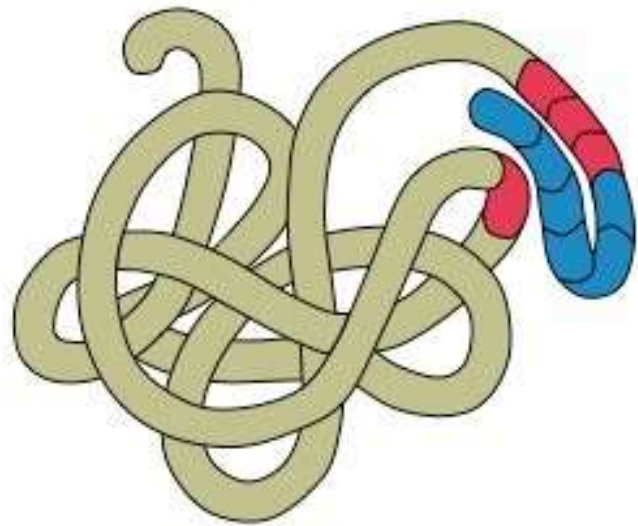


Частковий протеоліз

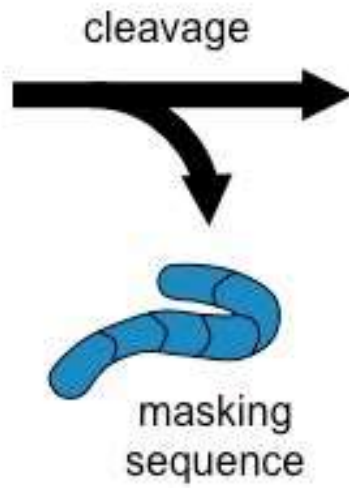
Частковий протеоліз як механізм зміни каталітичної активності ферментів є незворотним процесом, тому що відбувається відщеплення фрагменту білкової молекули. Цей механізм реалізується в разі, коли фермент синтезується у вигляді неактивного попередника – **проферменту (або зимогену)**.

Пепсин, трипсин, хімотрипсин – протеолітичні ферменти шлунково-кишкового тракту, які спочатку синтезуються у вигляді неактивних зимогенів: *пепсиногену, трипсиногену, хімотрипсиногену*. Їх активація відбувається саме завдяки частковому протеолізу.

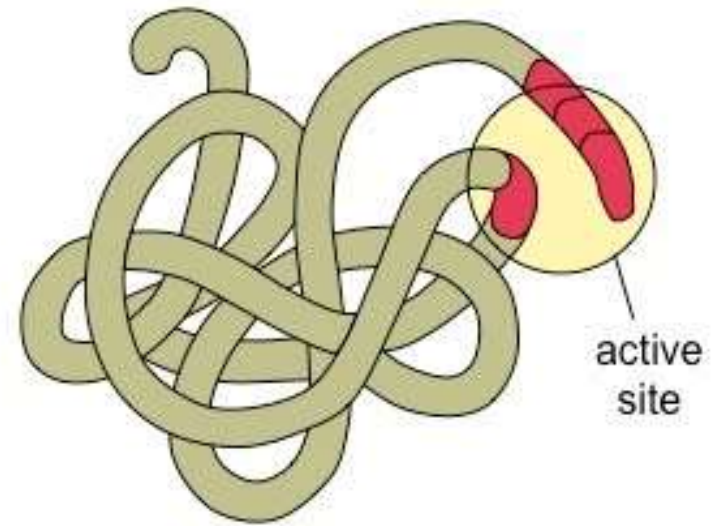
Аналогічний механізм активації властивий ферментам згортальної та фібринолітичної систем крові, системи комплементу, пептидним та білковим гормонам.



Inactive zymogen



masking
sequence



Active enzyme

Білок-білкова взаємодія

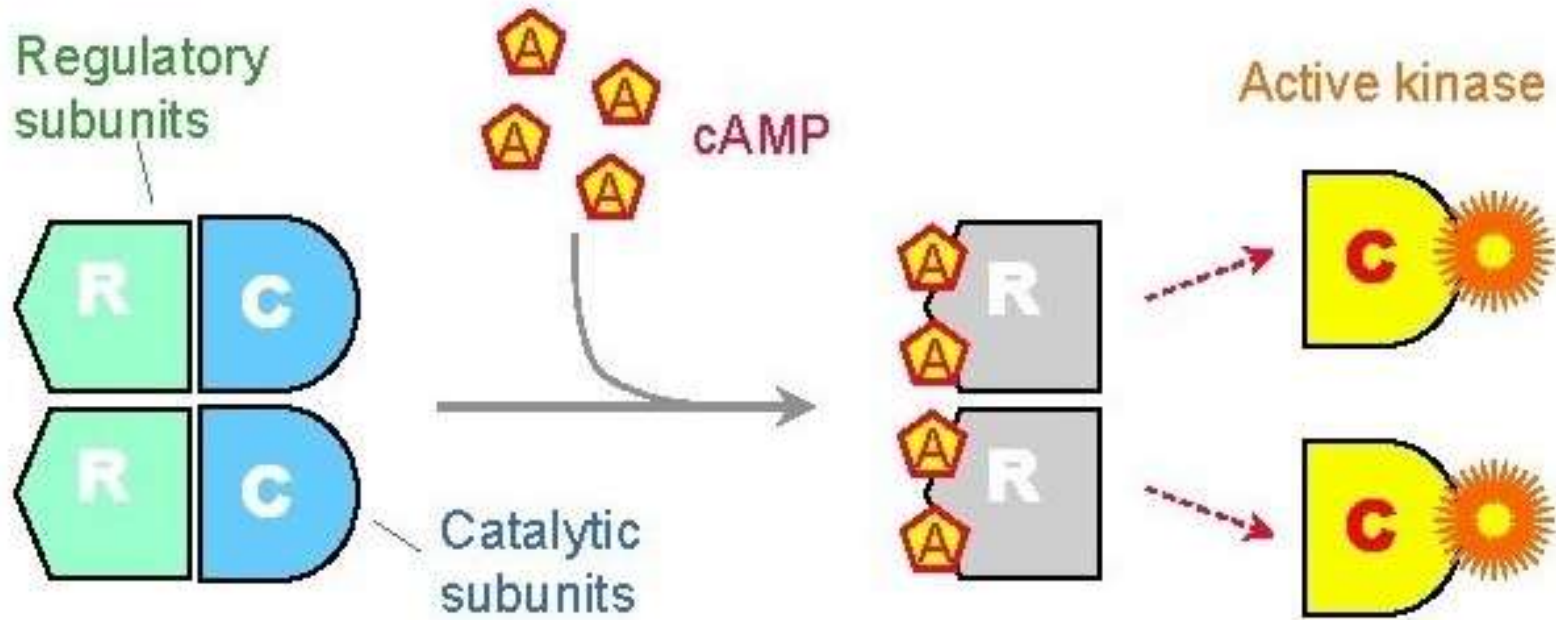
Існують два основних види такої регуляції:

- **приєднання спеціальних регуляторних білків** до молекули ферменту;
- **асоціація або дисоціація протомерів (субодиниць)** молекули ферменту.

Спеціальні регуляторні білки також можуть суттєво змінювати активність ферментів. Найбільш поширеними регуляторними білками є кальмодулін, протеїназні інгібітори ($\alpha 1$ -антитрипсин, $\alpha 2$ -макроглобулін), антигемофільний глобулін А, убіквітин та інші.

Асоціація та дисоціація субодиниць молекули ферменту, що призводить до зміни активності, також зустрічається дуже часто. Так, наприклад, при реалізації дії адреналіну в клітині активується фермент протеїнкіназа А (ПК А), що необхідна для фосфорилювання ферментів, які відповідають за відповідь клітини на дію гормону. ПК А складається з чотирьох субодиниць (R_2C_2). Регуляторні субодиниці (R) мають цетри зв'язування з циклічним нуклеотидом – цАМФ. Приєднання 4 молекул цАМФ до регуляторних протомерів ПК А призводить до відщеплення каталітичних субодиниць (С) – протеїнкіназа активується. Саме таким чином, шляхом дисоціації, відбувається активація протеїнкінази і в подальшому реалізується клітинна дія адреналіну.

Регуляція активності протеїнкінази А за допомогою цАМФ



Регуляція ферментативних процесів за допомогою активаторів та інгібіторів

Більшість ферментів можуть зв'язуватися з малими молекулами, які мають назву **модифікатори (ефектори)** і можуть змінювати ферментативну активність.

До них належать:

- **інгібітори** – сполуки, які гальмують активність ферменту;
- **активатори** – сполуки, які збільшують ферментативну активність.

Активація ферментативної активності може відбуватися під дією кофакторів, субстратів або інших метаболітів.

Інгібування ферментативної активності може відбуватися за різними механізмами, тому існує декілька видів інгібіторів і відповідно інгібування. Слід відзначити, що інгібіторами не є сполуки, які руйнують структуру ферменту шляхом денатурації.

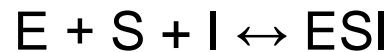
Види інгібування активності ферментів



Незворотне інгібування спостерігається в разі, коли інгібітор міцно зв'язується з молекулою ферменту, що викликає незворотну втрату активності. Незворотні інгібітори є отрутами.

Зворотне інгібування властиве для значної кількості ферментів живих організмів, для яких при різних фізіологічних умовах необхідна зміна активності. Так, наприклад, продукція енергії у мітохондріях залежить від енергетичного статусу клітини, молекулярним показником якого є концентрація АТФ, АДФ, АМФ та ін. сполуки. При зростанні кількості енергії, яка не використовується клітиною, молекула АТФ буде інгібітором деяких ферментів, які задіяні в генерації цієї енергії.

Зворотне інгібування буває двох видів: **конкурентне** та **неконкурентне**. **Конкурентне інгібування** відбувається в разі, коли молекула інгібітора за структурою схожа на молекулу субстрату і конкурує з ним за активний центр ферменту. В разі, коли в середовищі знаходяться молекули інгібітора, вони зв'язуються з активним центром та перешкоджають зв'язуванню молекул субстрату. **Неконкурентне інгібування** ферментативної активності є результатом зв'язування молекули інгібітора не з активним центром, а з іншою ділянкою молекули білка-ферменту. Оскільки інгібітор не впливає на зв'язування ферменту з субстратом, у результаті може утворитися потрійний комплекс ферменту (E), субстрату (S) та інгібітора (I):



Механізм інгібування полягає в тому, що після такого зв'язування відбуваються конформаційні зміни в активному центрі, який у подальшому не може нормально функціонувати та перетворювати S у P.

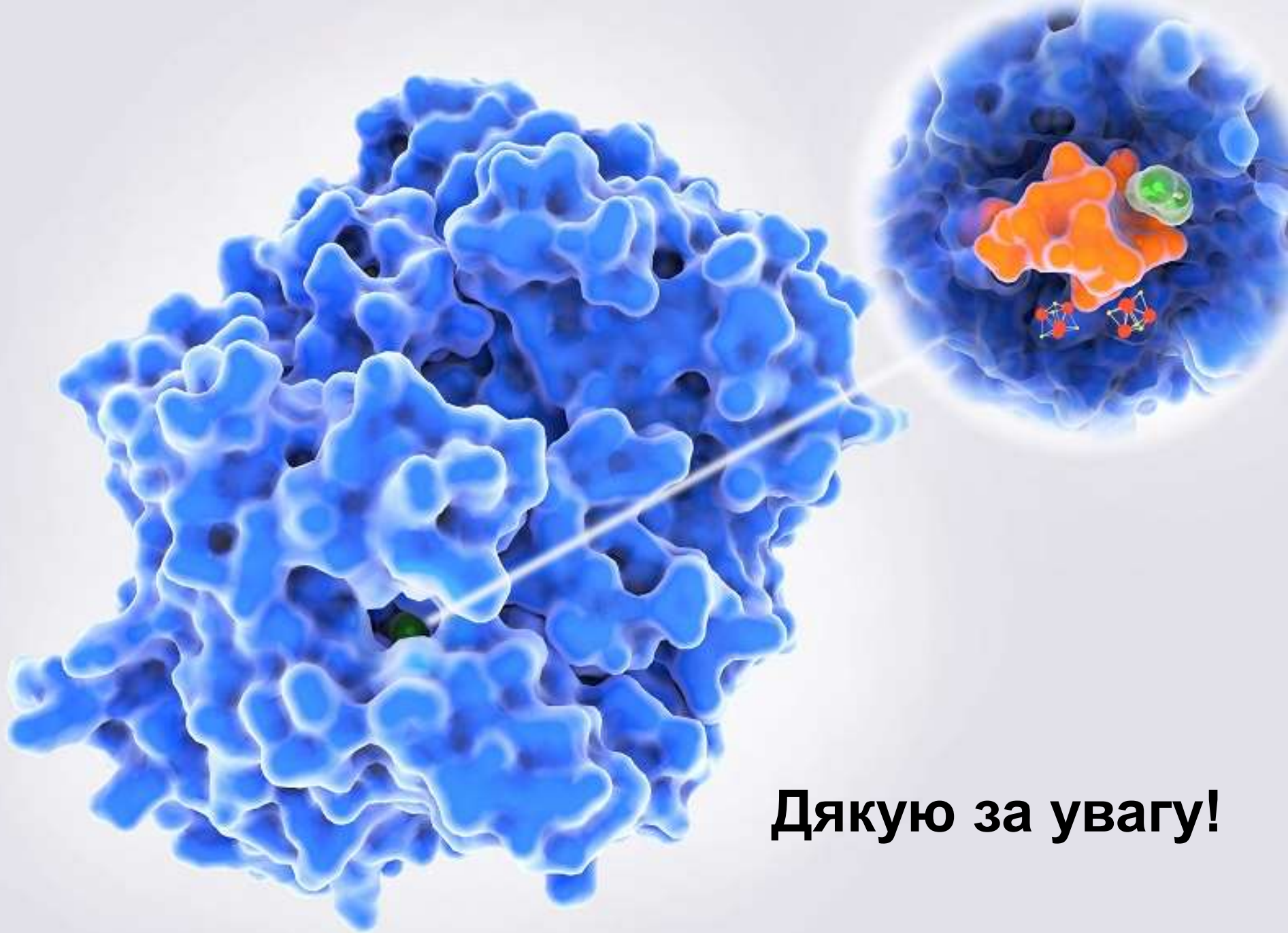
Література

Основна

1. Біологічна хімія. Навчально-методичний посібник для самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки до занять студентів III курсу фармацевтичного факультету спеціальності 7.12020101 "Фармація" та 7.12020104 «ТПКЗ». За редакцією Александрова К.В. –Запоріжжя, 2016. – 76с.
2. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 кн.: підручник. Кн. 2 Біологічна хімія / [Губський Ю.І., Ніженковська І.В., Корда М.М. та ін.]; за ред. Ю.І. Губського. – К.: ВСВ «Медицина», 2016. – 544 с.
3. Біохімія: підручник / за загальною редакцією професора А.Л. Загайка, проф. К.В. Александрової – Х.: Вид-во «Форт», 2014. – 728 с.
4. Губський Ю.І. Біологічна хімія / Губський Ю.І. - Київ-Тернопіль, Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
5. Гонський Я.І. Біохімія людини / Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І Підручник. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.- 744 с.
6. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини:підручник. Тернопіль, 2013.- 744с.

Додаткова

1. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под редакцией Е.С. Северина, А.Я. Николаева.– М.: ГЭОТАР–МЕД, 2001.– 448 с.: ил.
2. Боєчко Л. Ф. Основні біохімічні поняття, визначення та терміни: Навч. посібник / Л. Ф. Боєчко, Л. О. Боєчко. - К. : Вища шк., 1993. - 528 с.
3. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер - М. : Мир, 1985. – Т. 1- 367 с. : ил. – Т. 2 – 368 с. : ил. – Т. 3 – 320 с. : ил.



Дякую за увагу!