

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

О.А. Науменко, Е.С. Барышева, Е.В. Бибарцева

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Учебное пособие

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательным программам высшего образования по специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Оренбург
2021

УДК 577.15 (076.5)
ББК 28.072я7
Н 34

Рецензент – доцент, доктор биологических наук Е.В. Сальникова

Науменко, О.А.

Н 34 Инженерная энзимология : учебное пособие / О. А. Науменко, Е.С. Барышева, Е. В. Бибарцева ; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ОГУ, 2021 – 182 с.
ISBN 978-5-7410-2538-3

Учебное пособие составлено в соответствии с рабочей программой дисциплины «Инженерная энзимология» и включает в себя семь разделов, посвященных строению и классификации ферментов, кинетике и термодинамике ферментативных реакций, регуляции активности ферментов, синтезу белков и пептидов, лабораторный практикум, перечень вопросов к экзамену, а также тестовые задания.

Учебное пособие предназначено для самостоятельной подготовки обучающихся к лекциям, практическим занятиям, лабораторным работам и экзамену по дисциплине «Инженерная энзимология» для очной формы обучения, обучающихся по специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика.

УДК 577.15 (076.5)
ББК 28.072я7

ISBN 978-5-7410-2538-3

© Науменко О.А.,
Барышева Е.С.,
Бибарцева Е.В., 2021
© ОГУ, 2021

Содержание

Введение	7
Обозначения и сокращения	8
1 Общие принципы структурной организации белков и молекулярные механизмы их сворачивания в функционально активную конформацию.....	9
1.1 Определение энзимологии как науки, история открытия, номенклатура и классификация ферментов	9
1.1.1 Определение энзимологии как науки.....	9
1.1.2 История развития энзимологии как науки.....	10
1.1.3 Направления исследований в области энзимологии	11
1.1.4 Номенклатура и классификация ферментов.....	12
1.1.5 Мономеры и олигомеры	17
1.2 Надмолекулярная организация ферментов	19
1.2.1 Виды надмолекулярных форм организации ферментов	19
1.2.3 Роль металлов в качестве кофакторов.....	22
1.2.4 Активный центр ферментов	23
1.2.5 Особенности строения активного центра	24
1.2.6 Свойства среды активного центра ферментов	25
1.2.7 Аллостерический центр	27
1.2.8 Определение активности ферментов.....	27
1.3 Принципы пространственной организации молекулы фермента	28
1.3.1 Силы стабилизирующие третичную структуру белка – фермента	28
1.3.2 Термодинамика сворачивания третичной структуры белка	29
1.3.3 Значение водородной связи в процессе сворачивания белка в нативную конформацию.....	29
1.3.4 Роль гидрофобных связей.....	31
1.3.5 Значение Ван – дер - Ваальсовых связей	32
1.3.6 Значение электростатических связей	32
1.3.7 Роль дисульфидной связи.....	33
1.3.8 Физическая форма третичной структуры белка – фермента	34
1.4 Механизм формирования пространственной структуры белков – ферментов .	36
1.4.1 Парадокс С. Левенталя.....	36
1.4.2 Стадии сворачивания белка, иерархический принцип сворачивания	37
1.4.3 Термодинамическая характеристика процесса сворачивания.....	37
1.4.4 Внутриклеточная регуляция пространственной структуры белка.....	38
1.5 Домены, структурная и функциональная характеристика	40
1.5.1 Определение доменов	40
1.5.2 Доказательства доменной стадии сворачивания белка	40

1.5.3	Свойства доменов.....	42
1.5.4	Мультидоменная организация молекулы фермента.....	43
1.6	Характеристика фермент - субстратного комплекса	43
1.6.1	Механизм образования фермент - субстратных комплексов в растворителе	44
1.6.2	Оценка свободной энергии сорбции комплекса фермент – лиганд.....	46
1.6.3	Модели взаимодействия фермента и субстрата в катализе	47
2	Общие вопросы кинетики и термодинамики ферментативных реакций	50
2.1	Законы классической термодинамики в биохимии.....	50
2.1.1	Основные понятия кинетики и термодинамики. Термодинамические системы (ТС).....	50
2.1.2	Термодинамический процесс	53
2.1.3	Первый закон термодинамики	54
2.1.4	Второй закон термодинамики	55
2.1.5	Характеристические функции состояния ТС	56
2.2	Кинетика Михаэлиса – Ментена	58
2.2.1	Химическая кинетика. Понятие порядка реакции	58
2.2.2	Кинетика Михаэлиса – Ментена.....	59
2.2.3	Ограничения кинетики Михаэлиса-Ментена	63
2.2.4	Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса (обоснование первого постулата)	63
2.3	Природа константы К в уравнении Михаэлиса - Ментена.....	64
2.3.1	Стационарная кинетика Бриггса и Холдейна (обоснование второго постулата).....	64
2.3.2	Природа константы К в уравнении Михаэлиса-Ментена	65
2.3.3	Методы графического определения кинетических параметров.....	67
2.4	Кинетический анализ двухстадийных ферментативных реакций, не подчиняющихся уравнению Михаэлиса-Ментена.....	69
2.4.1	Изменение концентрации субстрата в ходе ферментативной реакции (обоснование третьего постулата)	70
2.4.2	Методика нахождения кинетических констант при условии $[S]_0 \neq [S]_t$	73
2.5	Влияние обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции	74
2.5.1	Механизмы влияния обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции	74
2.5.2	Кинетика ферментативных реакций, протекающих с участием эффектора.....	75
3	Механизмы регуляция активности ферментов	84
3.1	Виды механизмов регуляции. Определение метаболизма. Понятие конститутивных и адаптивных ферментов	84
3.1.1	Классификация механизмов регуляции активности ферментов по интенсивному пути.....	85
3.1.2	Понятие активаторов и ингибиторов	86
3.1.3	Необратимая ковалентная модификация, ограниченный протеолиз.....	88

3.1.4 Обратимая ковалентная модификация, регуляция ковалентным связыванием	89
3.1.5 Механизмы регуляции активности ферментов в без ковалентной модификации.....	91
3.2 Ассоциативный механизм регуляции активности ферментов	93
3.2.1 Механизмы ассоциаций ферментов.....	94
3.2.2 Зависимость активности фермента от его олигомерной ассоциации	95
3.2.3 Регуляция активности олигомерных ферментов специфическими лигандами	96
3.3 Адсорбционный механизм регуляции активности ферментов	97
3.3.1 Физиологическое значение адсорбции ферментов на субклеточных структурах	97
3.3.2 Адсорбционный механизм регуляции.....	97
3.3.3 Эстафетная модель работы фермента	99
3.4 Факторы, влияющие на ферментативную активность. Влияние рН и температуры на кинетику ферментативных реакций	101
3.4.1 Факторы, влияющие на ферментативную активность	101
3.4.2 Обратимое влияние температуры на каталитическую активность фермента	101
3.4.3 Влияние рН на кинетику ферментативных реакций в растворах.....	102
4 Пептидный синтез и химическая модификация белков и пептидов.....	104
4.1 История и значение пептидного синтеза.....	104
4.2 Методы определения первичной структуры белка	104
4.2.1 Этапы определения первичной структуры белка.....	105
4.2.2 Методы определения аминокислотного состава белка	106
4.2.3 Методы определения N-концевых АК	108
4.2.4 Определение C - концевой аминокислоты.....	109
4.3 Методы фрагментации полипептидной цепи	110
4.3.1 Ферментативный гидролиз.....	110
4.3.2 Метод ограниченного протеолиза	111
4.4 Пептидный синтез.....	115
4.4.1 Классический пептидный синтез в растворе	115
4.4.2 Ферментативный пептидный синтез	116
4.4.3 Метод твердофазного синтеза пептидов.....	119
4.4.4 Методы создания пептидной связи	120
4.5 Защитные группировки, используемые в пептидном синтезе	121
4.5.1 Требования к защитным группам	121
4.5.2 Два типа защитных групп в пептидном синтезе	122
4.5.3 NH ₂ -защитные группировки	122
4.5.4 COOH-защитные группировки	123
4.5.5 Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот	124
4.6 Химическая модификация белков и пептидов.....	125
4.6.1 Химическая модификация	125

4.6.2	Селективная модификация аминокислотных остатков	126
4.6.3	Бифункциональные реагенты.....	128
5	Лабораторный практикум.....	134
5.1	Проведение реакций осаждения белков с оценкой их первичного и вторичного состава с помощью цветных реакций	134
5.2	Количественное определение белка биуретовым методом.....	138
5.3	Диализ солевого раствора белка	140
5.4	Бумажная хроматография аминокислот	142
5.5	Титрометрическое определение активности каталазы	145
5.6	Определение активности амилазы	147
5.7	Определение активности пероксидазы.....	149
5.8	Влияние рН среды на активность амилазы	152
5.9	Влияние температуры на активность фермента амилазы.....	154
5.10	Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы	158
5.11	Очистка алкогольдегидрогеназы методом гель – хроматографии	161
5.12	Обнаружение НАД в дрожжах	163
5.13	Обнаружение цитохромоксидазы в мышцах	164
5.14	Обнаружение каталазы в крови.....	165
5.15	Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение её активности	166
6	Перечень вопросов, выносимых на экзамен.....	168
7	Фонд тестовых заданий	173
	Список использованных источников	179

Введение

Изучение структуры ферментов, их активных центров и регуляции скорости ферментативных реакций является актуальной задачей биохимии. Современные биотехнологическое и фармацевтическое производства активно используют белки ферменты в качестве катализаторов при получении новых продуктов и лекарств, поэтому изучение основ инженерной энзимологии является важным этапом подготовки специалистов биоинженеров.

Разделы учебного пособия составлены в соответствии с рабочей программой дисциплины «Инженерная энзимология» и включает в себя семь разделов, посвященных строению и классификации ферментов, кинетике и термодинамике ферментативных реакций, регуляции активности ферментов, синтезу белков и пептидов, лабораторный практикум, перечень вопросов к экзамену, а также тестовые задания. Каждый раздел учебного пособия содержит контрольные вопросы для самоподготовки и самоконтроля полученных знаний.

Лабораторные работы, приведенные в пособии, позволят приобрести студентам навыки определения скорости ферментативных реакций, проводить расчеты термодинамических характеристик в зависимости от заданных параметров, выделять белки для исследования, научиться технологиям выделения и очистки белков, а также определения активности ферментов.

Обозначения и сокращения

АДФ – аденозиндифосфат	ФАД – флавинадениндинуклеотид окисленный
АКО – аминокислотный остаток	ФМН – флавинмононуклеотид
АМФ – аденозинмонофосфат	ХФР – химическая ферментативная реакция
АК – аминокислота	
АТФ – аденозинтрифосфат	ЦПЭ – цепь переноса электронов
АлЦ – аллостерический центр	ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
АЦ – активный центр	цАМФ – циклический АМФ
БАПНА – N – бензоил –L – аргинин-паранитроанилид	НАДН – никотинамидаденин динуклеотид восстановленный
НАД – никотинамидаденин динуклеотид окисленный	ФАДН ₂ – флавинадениндинуклеотид восстановленный
ВМП – внутренняя мембрана митохондрий	ММП – межмембранное пространство митохондрий
ГФА – гликогентрансфераза А	РНК – рибонуклеиновая кислота
ГФВ – гликогентрансфераза В	ТС – термодинамическая система
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ТП – термодинамический процесс

1 Общие принципы структурной организации белков и молекулярные механизмы их сворачивания в функционально активную конформацию

1.1 Определение энзимологии как науки, история открытия, номенклатура и классификация ферментов

1.1.1 Определение энзимологии как науки

Энзимология – это раздел биохимии, который изучает ферменты. *Энзимы* – это специализированные белки, которые являются биологическими катализаторами и обладают нативной конформацией.

От обычных функциональных белков ферменты отличает то, что на поверхности белковой глобулы у них имеется *активный центр (АЦ)*. 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, -NH₂), 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_k), а константа, определяющая сродство субстрата к ферменту, - *константой связывания* (K_s). Действие эффекторов (активаторов и ингибиторов) определяют с помощью *констант активирования* (K_a) и *ингибирования* (K_i).

Активность фермента зависит от природы фермента, субстрата, их концентраций, межсубъединичных 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.

1.1.2 История развития энзимологии как науки

Зарождение учения о ферментах относится к первой половине XIX века. 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. Вещество, извлекаемое из проросшего ячменя и обладающее способностью превращать крахмал в мальтозу, получило название *амилазы*.

Ю. Либих и Ф. Веллер открыли агент, расщепляющий амигдалин, содержащийся в эфирном масле горького миндаля. Этот агент был назван *эмульсином*. В последующие годы были описаны другие ферменты, в частности *пепсин* и *трипсин*, вызывающие распад (гидролиз) белков в пищеварительном тракте. В 1913 году Михаэлис и Ментен выдвинули теорию механизма работы ферментов.

В 1926 году (считается официальным годом рождения энзимологии как науки) Самнер выделил кристаллическую *уреазу* и доказал ее белковую природу. С тех пор было обнаружено и выделено более 700 ферментов, но в живых организмах их существует гораздо больше. В 1929 году другой биохимик – Д. Нортроп сообщил о выделении им кристаллического препарата пепсина, а затем трипсина и других ферментов. В 1946 году Нортроп и Самнер были удостоены Нобелевской премии за открытие белков ферментов.

В 1969 году Меррифилд (Нью Йорк) синтезировал искусственно *рибонуклеазу* и доказал, что все ферменты являются белками.

1.1.3 Направления исследований в области энзимологии

Перечислим основные современные направления исследований в 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.

1.1.4 Номенклатура и классификация ферментов

Существуют три основных принципа классификации ферментов:

- 1) по химической природе фермента;
- 2) по химической природе субстрата;
- 3) по типу катализируемой реакции.

Вопрос рациональной классификации ферментов весьма труден. Специфическим признаком, отличающим один фермент от другого, является катализируемая ферментами химическая реакция. Этот классификационный признак

и положен в основу систематической классификации ферментов, которая утверждена Комиссией по ферментам Международного биохимического союза (IUBMB) в 1961 году. Вместе с этим продолжают применяться и тривиальные (рабочие) названия, которые, как правило, короче и поэтому более употребительны.

Систематическая классификация учитывает реакционную и субстратную специфичность ферментов. Все ферменты включены в «Каталог ферментов» под своим классификационным номером или кодом фермента (КФ), состоящим из 4 цифр. Первая цифра КФ указывает на принадлежность фермента к одному из 6 главных классов, в зависимости от типа реакции. Внутри каждого класса ферменты подразделяются на подклассы в зависимости от типа субстрата (2 цифра КФ), а подклассы в свою очередь подразделяются на подподклассы в зависимости от типа кофермента, реагента или особенностей реакции (3 цифра КФ). Четвертая цифра указывает порядковый номер фермента в пределах данного подподкласса.

Согласно Международной классификации, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых выделяют несколько подклассов, подподклассов и каждый фермент имеет свой порядковый номер. В зависимости от типа катализируемой химической реакции были признаны 6 классов ферментов: оксидоредуктазы (ЕС 1), трансферазы (ЕС 2), гидролазы (ЕС 3), лиазы (ЕС 4), изомеразы (ЕС 5) и лигазы (ЕС 6):

1) оксидоредуктазы;

2) трансферазы;

3) гидролазы;

4) лиазы;

5) изомеразы;

6) лигазы (синтетазы).

1.1.4.1 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⁺ 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.

1.1.4.2 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.

1.1.4.3 Гидролазы. 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:

- 1) эстеразы – ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров;
- 2) гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей;

3) фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей;

4) амидазы, ускоряющие разрыв амидных связей, отличных от пептидных, и др.

1.1.4.4 Лиазы. К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей C-O, C-C, C-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.

1.1.4.5 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.

1.1.4.6 Лигаза (синтетаза). 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.

1.1.4.7 Транслоказы. Ни один из представленных классов ферментов не мог описать важную группу ферментов, которые катализируют движение ионов или молекул через мембраны или их разделение внутри мембран. Некоторые из них катализировали одновременно синтез и гидролиз АТФ и ранее были классифицированы как АТФазы (ЕС 3.6.1), хотя гидролитическая реакция не являлась для них основной. Поэтому в августе 2018 года Международный союз биохимии и молекулярной биологии классифицировал эти ферменты в новый класс ферментов (ЕС) транслоказ (ЕС 7), так как катализируемая АТФ – синтазой реакция протекает по обратному гидролизу пути, и не может быть описана с помощью других типов реакций остальных классов.

Транслоказы – отдельный класс ферментов, катализирующих перенос ионов или молекул через мембраны или их разделение в мембранах. Эти ферменты катализируют движение ионов или молекул через мембраны или их разделение внутри мембран. Реакция обозначается как переход от «стороны 1» к «стороне 2», поскольку ранее использовавшиеся обозначения «вход» и «выход» могут быть неоднозначными.

За ферментами сохранились систематические названия, указывающие на их прежний класс. В зависимости от переносимых ионов или молекул в 7 классе выделяют 6 подклассов транслоказ:

ЕС 7.1 – ферменты, катализирующие транслокацию протонов водорода H^+ ;

ЕС 7.2 – ферменты, катализирующие транслокацию неорганических катионов и их хелатов;

ЕС 7.3 – ферменты, катализирующие транслокацию неорганических анионов;

ЕС 7.4 – ферменты, катализирующие транслокацию аминокислот и пептидов;

ЕС 7.5 – ферменты, катализирующие транслокацию углеводов и их производных;

ЕС 7.6 – ферменты, катализирующие транслокацию иных соединений. Деление на подподклассы основано на реакциях, которые обеспечивают движущую силу для транслокации.

1.1.5 Мономеры и олигомеры

По своей структуре все белки – ферменты делятся на:

1) *мономеры* (однокомпонентные) простые белки, состоящие из одной глобулы;

2) *олигомеры* (двухкомпонентные) – состоящие из двух и более субъединиц и содержащие наряду с белковой частью (апофермент) и небелковую часть (кофактор).

1.1.5.1 *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:

- α – спираль;
- β – 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 определенного 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.

1.1.5.2 Структура олигомерных ферментов. *Олигомер* (греч. ολίγος – малый, немногий, незначительный; μέρος – часть) – 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:

- 1) одинаковые – *гомогенный* олигомер;
- 2) 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 (H) и мышечной (M). Молекула фермента в организме может быть представлена пятью изоферментами с конформациями, состоящими из четырех субъединиц: HHHH, HHHM, HHMM, HMMM, MMMM.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Что изучает энзимология?
2. Дайте характеристику шести основным классам ферментов.
3. Дайте цифровое обозначение фермента алкогольдегидрогеназы. К какому классу и подклассу относится данный фермент?
4. Что такое мономерные и олигомерные ферменты?
5. Что такое гомогенный олигомер?
6. Что такое гетерогенный олигомер?
7. Что такое изоферменты?
8. Что такое домен?
9. Как определить номер изофермента?
10. Что такое третичная конформация белка фермента?

1.2 Надмолекулярная организация ферментов

1.2.1 Виды надмолекулярных форм организации ферментов

Существует 3 вида надмолекулярных форм организации ферментов:

- 1) мультиферментные комплексы;
- 2) мультиферментные конъюгаты;
- 3) мультиферментные ансамбли.

Мультиферментные комплексы – это надмолекулярные образования, которые включают несколько ферментов и коферментов. В мультиферментном комплексе (рисунок 1.1) несколько ферментов прочно связаны между собой в единый комплекс и осуществляют ряд последовательных реакций, в которых продукт реакции непосредственно передается на следующий фермент и является только его субстратом. Комплекс образован за счет нековалентных связей. Благодаря таким комплексам значительно ускоряется скорость превращения молекул.

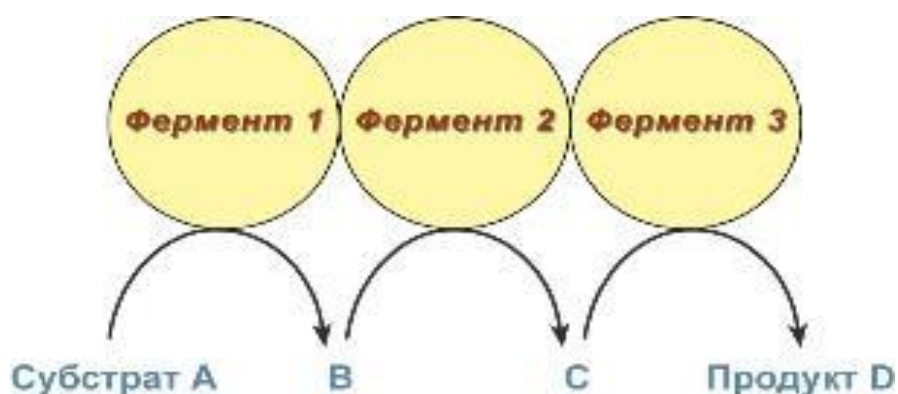


Рисунок 1.1 – Строение мультиферментного комплекса

Примером работы мультиферментов являются реакции окислительного декарбоксилирования α – кетокислот (пирувата и α – кетоглутарата) под влиянием пируватдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы.

Мультиферментные конъюгаты – это комплексы, в которых различные ферменты связаны в единую полипептидную цепь. Мультиферментный комплекс, состоящий из ковалентно соединенных ферментов, является более стабильным, чем комплекс, образованный нековалентными связями. Примером этого комплекса может служить комплекс синтеза жирных кислот (СЖК) у бактериальных клеток *E.coli* и высших растений (рисунок 1.2).

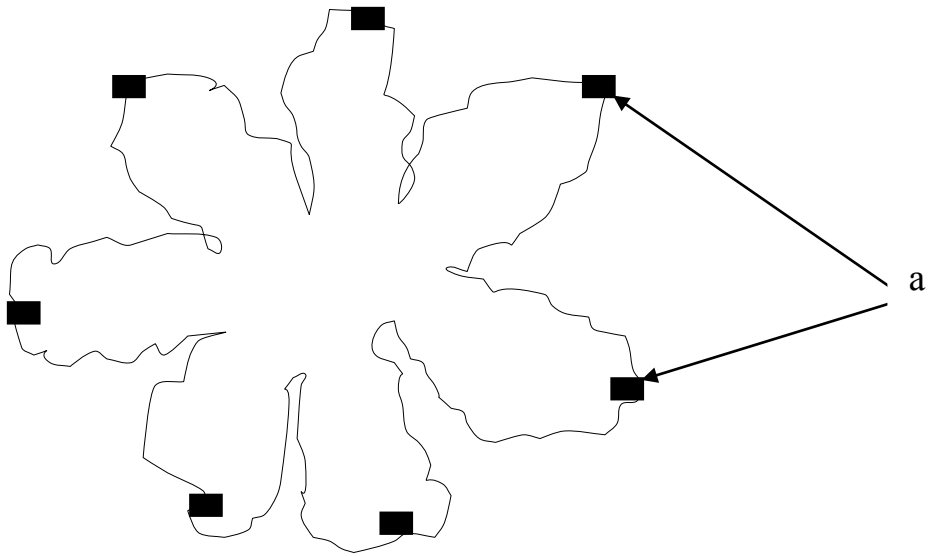


Рисунок 1.2 – Мультиферментный конъюгат: а – активные центры фермента

Мультиферментные ансамбли (метаболоны) – наиболее высокоорганизованная мультиферментная система, связанная с крупными надмолекулярными структурами, например, рибосомами или мембранами. В составе метаболонов каждый фермент находится в контакте с одним или несколькими ферментами этого метаболического пути. Структура элемента поддерживается за счет опоры (матрикса) клетки или ее органелл. Существуют 2 вида ансамблей:

- 1) адсорбционные (динамичные);
- 2) интегральные (белок – фермент встроен в мембрану).

1.2.2 Понятие о простетической группе в составе сложных ферментов

В составе сложных белков есть белковая часть – *апофермент* и добавочная часть – *простетическая группа*. Апофермент и простетическая группа представляют собой *холофермент*.

Добавочная группа в составе сложных ферментов называется *кофактором* и представляет собой низкомолекулярный компонент небелковой природы, обеспечивающий течение ферментативной реакции.

Различают две группы кофакторов:

- 1) ионы металлов (а также некоторые неорганические анионы);
- 2) коферменты, представляющие собой органические вещества.

Примерно треть из всех известных в настоящее время ферментов активируются ионами металлов. В роли кофакторов ферментов могут выступать различные по природе ионы металлов (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , u^{2+} , Na^+ , K). К коферментам относят: производные витаминов, нуклеотиды: НАД→НАДН, АТФ→АДФ, глутатионы, липоевую кислоту.

Роль кофакторов:

- 1) изменение третичной структуры белка – фермента;
- 2) обеспечение комплементарности между ферментом и субстратом в ходе ферментативной реакции;
- 3) участие в реакции в качестве еще одного субстрата;
- 4) изменение структуры субстрата (роль активатора).

1.2.3 Роль металлов в качестве кофакторов

Ион металла может участвовать в присоединении субстрата в активном центре фермента, собственно в катализе, в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента и т.д.

Ионы металла выполняют функцию стабилизаторов молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур. 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 (рисунок 1.3).

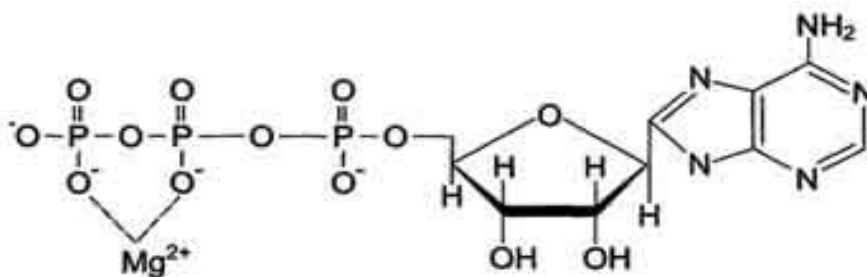


Рисунок 1.3 – Комплекс Mg^{2+} - АТФ

Схематично роль кофактора при взаимодействии фермента и субстрата можно представить, как комплекс E-S-Me, где E – фермент, S – субстрат, Me – ион металла.

Коферменты окислительно – восстановительных ферментов (1 группа) делятся на 2 подгруппы:

1) окислительно – восстановительные коферменты – переносят протоны водорода (НАД, НАДН, липоевая кислота, убихинон);

2) нуклеозидфосфаты – переносят остатки фосфорной кислоты (АТФ, АДФ, АМФ).

1.2.4 Активный центр ферментов

Активный центр – это кластер специфических радикалов аминокислот, определенным образом расположенных в пространстве и определяющих специфичность и каталитическую активность ферментов. Он образуется в третичной структуре белка. Активный центр вступает во взаимодействие либо с субстратом, либо с кофактором.

Аминокислотные остатки, которые входят в состав активного центра, называются каталитическими группами (R – группами).

R группы делятся на: *нуклеофильные (минус) и электрофильные (плюс)* (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Электрофильные и нуклеофильные группы АЦ фермента

Нуклеофильные группы	Электрофильные группы
Имидозольное кольцо гистидина	Положительный ион имидозолия
ОН – группа тирозина	Неионизированные карбоксильные группы
SH – группа цистеина	Ионы металлов
NH ₄ – группа лизина	Коферменты
Ионизированная карбоксильная группа аспарагиновой и глутаминовой аминокислот	

1.2.5 Особенности строения активного центра

На активный центр приходится малая часть объема белковой молекулы. Так, например, если вся белковая молекула состоит из 100 000 аминокислотных остатков, то на активный центр приходится только от 10 до 30 аминокислот.

Активный центр может быть двухкомпонентным и монокомпонентным.

Двухкомпонентный АЦ встречается у сложных белков и включает в себя кофактор или кофермент.

Монокомпонентный АЦ – у простых белков ферментов и представлен только аминокислотами.

Связь фермента и субстрата относительно слабая по своей силе. Специфическое взаимодействие фермента и субстрата определяется расположением атомов в активном центре фермента, при этом часто соответствие активного центра фермента и центров связывания молекулы субстрата представляют, как «ключ и замок». Некоторые активные центры ферментов не являются жесткими структурами, поэтому они становятся комплементарными в процессе образования фермент – субстратного комплекса (теория Кошланда, или “теория гибкого активного центра”). Активный центр фермента при этом меняет свою

конфигурацию «настраивается» относительно структуры субстрата – индуктора по принципу индукции соответствия (динамического узнавания). В зависимости от присутствия в АЦ реакционных радикалов, активный центр фермента приобретает свойства:

- 1) кислоты;
- 2) основания;
- 3) кислотно – основные: полифункциональный катализ, если в активном центре нуклеофильные и электрофильные группы.

Методом рентгено-структурного анализа и кристаллографии белковой молекулы установлено, что активный центр локализуется:

1) в стандартном дефекте, «вмятине», расположенной, в архитектуре белковой глобулы. В таком положении субстрат будет окружен и одновременно атакован многими боковыми цепями белка.

2) в месте стыков доменов. Например, у сериновых протеаз активный центр находится на стыке двух доменов. Такое положение способствует формированию особой среды активного центра.

1.2.6 Свойства среды активного центра ферментов

Среда АЦ фермента обладает рядом свойств:

1) *микрорегетерогенностью*, которая обусловлена двумя факторами:

- в образовании активного центра фермента участвует не только полярные R-группы, но и частично аполярные углеводородные боковые группы аминокислотных остатков. Например, для альфа – хемотрипсина установлено, что на поверхность выходит 10 из 23 валинов, 10 из 15 изолейцинов, 6 фенилаланинов;

- в поверхность боковой молекулы прочно встроены молекулы воды – растворителя.

2) *низкой диэлектрической проницаемостью (Дэп)*, по сравнению с водой. Для воды Дэп = 80, в сорбционном центре хемотрипсина Дэп = 10;

3) *пониженной полярностью* (по сравнению с водой). Установлена методом флюоресценции органических соединений в сравнении с водой;

4) *локальной высокополярностью*. Рядом с участками с повышенной полярностью в поверхностных областях активного центра регистрируется высокая полярность за счет диполей пептидных связей. Их близкое расположение ведет к образованию участков с высокой напряженностью электрического поля (10-100 мВ/см);

5) *микровязкостью*. В активном центре аминокислоты расположены так плотно, что затруднено поступательное движение молекул и вращательное движение молекул. Все это способствует прекращению диффузии между молекулами белка - фермента и субстрата.

Изучение поверхностного слоя фермента позволяет ответить на вопрос «Почему ферментам удается ускорять скорость реакции?»:

1) в активном центре сосредоточено большое количество функциональных групп, которые одновременно взаимодействуют с субстратом;

2) среда активного центра обладает микрогетерогенностью, где гидрофобные участки чередуются с гидрофильными областями с локальной высокополярностью;

3) поверхностный слой белка - фермента характеризуется микровязкостью и ограничивает диффузию между субстратом и ферментом.

Все свойства активного центра способствуют к многоцентровому взаимодействию между молекулой фермента и субстрата.

Причинами ускорения химической реакции, катализируемой ферментами по сравнению гомогенными каталитическими процессами без участия фермента, являются:

1) сорбционное взаимодействие боковых субстратных групп с молекулой фермента. Субстрат подвергается каталитической атаке не одной, а нескольких R-групп. Сорбционное взаимодействие ускоряет реакцию в 10^7 раз и более;

2) полифункциональный характер катализа: за счет нуклеофильного, или электрофильного катализа ускорение химической ферментативной реакции идет 10^3 раз;

3) микрогетерогенность среды АЦ дает самое высокое повышение.

1.2.7 Аллостерический центр

У некоторых белков – ферментов есть *аллостерический центр* или регуляторный центр – участок молекулы фермента, с которым связываются низкомолекулярные химические соединения – эффекторы (модификаторы), изменяя активность фермента. Эффекторы делятся на:

1) активаторы (ионы металлов);

2) ингибиторы (тяжелые металлы), которые могут быть обратимыми и необратимыми.

1.2.8 Определение активности ферментов

Активность ферментов определяется единицами активности – *каталами (E)*. *1 катал* – это такая единица активности фермента, когда фермент способен катализировать превращение 1 молекулы субстрата за 1 секунду при температуре 25 градусов.

Для ферментативной реакции определяется скорость реакции - кинетический показатель - число полных каталитических циклов, осуществляемых ферментом за единицу времени. (Например, для пепсина 8 циклов за 1 минуту).

Удельная активность фермента – скорость реакции, которая относится к 1 миллиграмму белка - фермента.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Какие виды надмолекулярных форм организации ферментов выделяют?
2. Дайте понятие простетической группы в составе сложных ферментов.
3. Какова роль металлов в структуре ферментов?
4. Какое строение имеет активный центр ферментов?
5. Где располагается АЦ?
6. Какие нуклеофильные радикалы входят в состав АЦ фермента?
7. Какие электрофильные радикалы входят в состав АЦ фермента?
8. Что такое аллостерический центр фермента?
9. Что такое 1 катал?
10. Что такое удельная активность фермента?

1.3 Принципы пространственной организации молекулы фермента

1.3.1 Силы стабилизирующие третичную структуру белка – фермента

Третичной структурой белка называется трехмерная пространственная структура, образуемая за счет взаимодействия между радикалами аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в полипептидной цепи.

В стабилизации третичной структуры белковой молекулы участвуют ковалентные связи (дисульфидные), но основную роль играют нековалентные связи:

- 1) водородные;
- 2) электростатические взаимодействия заряженных групп;
- 3) межмолекулярные Ван – дер – Ваальсовы силы;
- 4) гидрофобные связи – взаимодействия неполярных радикалов аминокислот.

Стабильность третичной структуры зависит от системы нековалентных взаимодействий внутри белковой глобулы. Некоторые белки дополнительно стабилизируются ковалентными – дисульфидными связями между SH-группами цистеина.

1.3.2 Термодинамика сворачивания третичной структуры белка

Процесс сворачивания белка в нативную конформацию осуществляется самопроизвольно при условии снижения энергии термодинамической системы, идущей на совершение полезной работы (энергии Гиббса), при этом $\Delta G < 0$, согласно закону Гиббса:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1.1)$$

где ΔG – энергия Гиббса ТС;

ΔH – энтальпия ТС;

T – температура ТС;

ΔS – энтропия ТС.

Согласно закона Гиббса, для выполнения условия самопроизвольности процесса сворачивания молекулы белка – фермента в нативную конформацию, энтальпия термодинамической системы «белок-вода» должна снижаться, а энтропия увеличиваться. Данный процесс обеспечивается разрывом одних связей и формированием новых внутримолекулярных связей в молекуле белка – фермента. Основную термодинамическую роль в процессе сворачивания белка играют нековалентные связи: водородные и гидрофобные. Значительно меньший вклад вносят дисульфидные связи, электростатические взаимодействия и Ван – дер – Ваальсовы силы.

1.3.3 Значение водородной связи в процессе сворачивания белка в нативную конформацию

Водородная связь образуется между полярными аминокислотными остатками. Энергия одной водородной связи составляет 3 ккал/моль (рисунок 1.4).

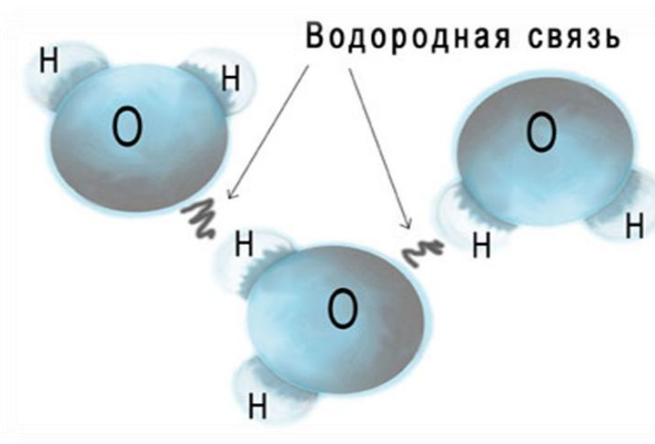


Рисунок 1.4 – Схема водородной связи

За счет большого количества водородных связей, которые образуются в процессе сворачивания белка в третичную конформацию, энтальпия ТС «белок-вода» уменьшается, что является термодинамически выгодным процессом и ускоряет процесс сворачивания белка. Но при сворачивании идет не только образование новых водородных связей между белком – ферментом и водой, но также и разрыв ранее существовавших связей, что в целом, способствует повышению энтальпии термодинамической системы, что термодинамически невыгодно. Однако, этот процесс положительно сказывается на росте энтропии, что позволяет снижать энергию Гиббса ТС. При формировании всей белковой глобулы снижается энтропия пептидной связи первичной структуры, при этом повышается энтропия растворителя – молекул воды, что лишает стабильности структуру молекулы белка и также способствует процессам сворачивания фермента в нативную конформацию.

При образовании третичной структуры возникает максимальное число водородных связей, как внутри самой белковой глобулы, так и при контакте ее с молекулами воды, что обеспечивает энергией первую и вторую стадии сворачивания белка – образование элементов вторичной структуры в момент их синтеза и схода с рибосом. При этом формируются, так называемые «завтраки» в виде «альфа» – спиралей и «бетта» – складчатых листов, используемых в дальнейшем процессе

сборки и сворачивания белка. За счет энергии водородных связей минимум энергии термодинамической системы «белок-вода» достигается с высокой скоростью, поэтому первая и вторая стадии сворачивания белка в нативную конформацию протекают «очень быстро», что и дало им соответствующие названия – «очень быстрые стадии».

1.3.4 Роль гидрофобных связей

На втором месте по значению в процессе самопроизвольного сворачивания белка и стабилизации его третичной структуры в термодинамической системе «белок-вода» находятся гидрофобные силы. Они образуются между неполярными аминокислотами и водой. Гидрофобные связи образуются между неполярными АК и квазикристаллическими структурами молекул воды («льдоподобная» вода), в которые и встраиваются неполярные аминокислотные остатки. При этом на данных участках в месте контакта «белок-вода» энтропия ТС начинает значительно уменьшаться, что замедляет процесс сворачивания белка и позволяет постепенно уменьшить площадь термодинамически невыгодного контакта молекулы белка с водой. В результате действия гидрофобных сил формируется ядро белковой молекулы, имеющее форму шара – глобулы. Динамичные пустоты образуют поверхность раздела белка и воды. Гидрофобные связи в целом снижают энтропию самой белковой молекулы, но повышают энтропию ТС «белок-вода». Чем меньше поверхность раздела, тем больше энтропия ТС, поэтому в процессе сворачивания белок стремится уменьшить термодинамически невыгодный контакт с водой и формирует гидрофобное ядро в форме шара. В целом гидрофобные связи повышают энтропию ТС и обеспечивают энергией третью и четвертую стадию сворачивания белка. За счет гидрофобных связей обеспечивается 2/3 работы по сворачиванию на данных этапах.

незначительно снижают энтальпию в процессе сворачивания белка в третичную конформацию. Принимают участие в четвертой стадии сворачивания белка в нативную конформацию (рисунок 1.6)

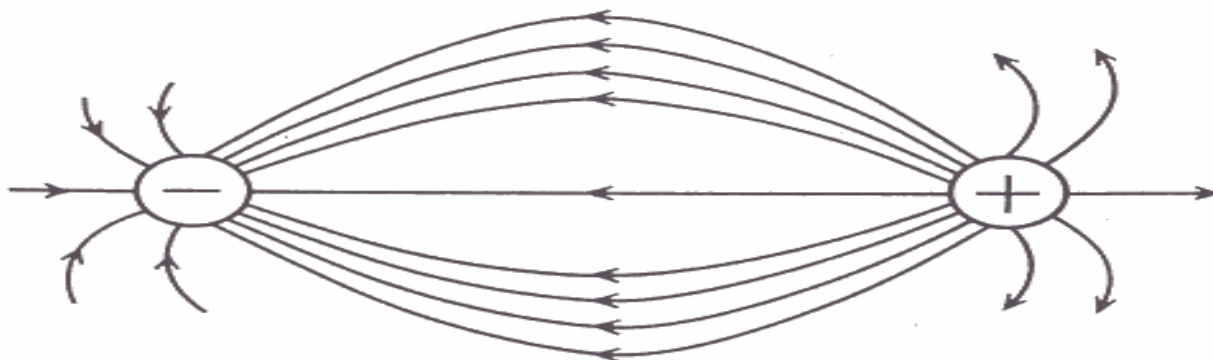


Рисунок 1.5 – Схема электростатических связей

1.3.7 Роль дисульфидной связи

Дисульфидная связь возникает между остатками серосодержащих АКО, в частности – цистеина. Поскольку цистеин входит в состав не всех белков, данный вид связи не оказывает существенного влияния на скорость сворачивания. В процессе сворачивания белка дисульфидные связи снижают энтальпию ТС, но вызывают и энтропийные потери.

Значение дисульфидных связей:

- 1) дисульфидная связь облегчает процесс правильного пути сворачивания белка в нативную конформацию, т.к. образуется одной из первых;
- 2) ковалентная дисульфидная связь снижает энтальпию и повышает энтропию ТС;
- 3) дисульфидные связи сохраняются у денатурированных белков;
- 4) в процессе сворачивания белка дисульфидные связи уменьшают число возможных конформаций молекулы белка – фермента;
- 5) образование дисульфидных связей не предшествует процессу сворачивания белка в глобулу, а лишь способствуют этому процессу и корректирует его;

б) в процессе сворачивания могут образовываться неправильные дисульфидные связи, которые после формирования белковой глобулы разрушаются.

Таким образом, стабилизация третичной структуры зависит не только от структуры самого белка, но и от структуры растворителя воды. Поэтому изменение структуры воды: нагревание или замораживание дестабилизирует третичную структуру белка и приводит к *денатурации* – утрате третичной конформации и ферментативных свойств.

Итог: Термодинамика сворачивания третичной структуры белка характеризуется тем, что факторы сворачивания и факторы, действующие в противоположном направлении, сбалансированы. Поэтому белковая молекула часто утрачивает стабильность даже при незначительном изменении термодинамических параметров ТС. Энергия одной водородной связи составляет 3 ккал/моль, а изменение свободной энергии системы в процессе сворачивания белка составляет только $\Delta G = 10$ ккал/моль.

1.3.8 Физическая форма третичной структуры белка – фермента

В нативной структуре фермента выделяют ядро, состоящее из неполярных аминокислот и гидрофильную оболочку, представленную полярными АКО (рисунок 1.4). неполярные аминокислоты в результате сворачивания и образования гидрофобных связей находятся внутри белковой молекулы. Участки из полярных аминокислотных остатков в гидрофобном ядре формируют активный центр фермента, а участки из неполярных аминокислотных остатков на поверхности фермента формируют аллостерический центр.

Участки из неполярных аминокислотных остатков могут формировать элементы четвертичной структуры и надмолекулярные структуры. Полярные остатки могут находиться внутри ядра, между ними образуются электростатические, водородные и Ван-дер-Ваальсовы связи.

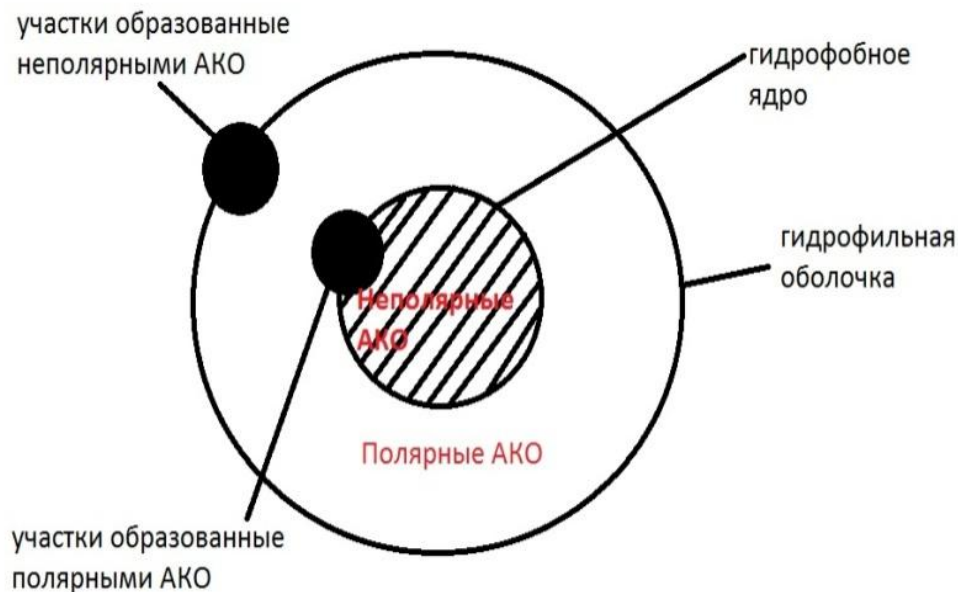


Рисунок 1.4 – Схема строения молекулы белка - фермента

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Перечислите силы стабилизирующие третичную структуру белка фермента.
2. Какая энергия обеспечивает самопроизвольное протекание термодинамических процессов сворачивания третичной структуры белка?
3. Какова роль водородной связи в сворачивании третичной структуры белка?
4. Какова роль гидрофобных связей в сворачивании третичной структуры белка?
5. Какова роль Ван-дер-Ваальсовых связей в сворачивании третичной структуры белка?
6. Какова роль электростатических связей в сворачивании третичной структуры белка?
7. Какова роль дисульфидных связей в сворачивании третичной структуры белка?
8. Дайте характеристику физической форме третичной структуры белка – фермента.

1.4 Механизм формирования пространственной структуры белков – ферментов

1.4.1 Парадокс С. Левинталя

У белковой цепи есть бездна возможных конформаций (каждый аминокислотный остаток имеет около 10 возможных конформаций, то есть цепь из 100 остатков - порядка 10^{100} возможных конформаций). Так что белок должен искать «свою» пространственную структуру среди 10^{100} возможных вариантов. И так как переход из одной конформации в другую занимает в среднем около 10^{-13} секунды, то как минимум, перебор всех 10^{100} структур должен занимать порядка 10^{80} лет, на фоне которых время жизни нашей Вселенной – 10^{10} лет – величина бесконечно малая. Возникает вопрос: как белок «находит» свою единственно возможную правильную структурную конформацию за считанные минуты?

Ученые установили, что нативная конформация белка обладает рядом свойств:

- 1) нативная пространственная структура белка по всем тестам ведет себя как самая кинетически стабильная во времени;
- 2) с точки зрения термодинамики нет никаких доказательств, что данная структура наиболее устойчива в термодинамическом плане.

С. Левинталь предположил, что нативная структура белка определяется не стабильностью, не термодинамикой, а кинетикой, т.е. она соответствует не глобальному, а наиболее быстро достижимому минимуму свободной энергии ТС «белок-вода».

Решение парадокса Левинталя следующее:

- 1) к формированию третичной структуры белка фермента ведет цепь быстрых превращений не требующих дополнительной энергии, т.е. свободной энергии;
- 2) пространственную структуру белка определяет его первичная структура (зашифрованная в генетическом коде), т.е. именно генетический код определяет

пространственную структуру белка, а не работа внеклеточных структур во время его синтеза;

3) процесс сворачивания белка в нативную конформацию многостадийный и осуществляется по принципу иерархии.

1.4.2 Стадии сворачивания белка, иерархический принцип сворачивания

Согласно современным представлениям, процесс сворачивания белка имеет иерархическую природу и осуществляется строго последовательно в четыре стадии:

1) *«очень быстрая»*: формирование элементов вторичной структуры, служащих как бы «завтраками» для образования более сложных архитектурных мотивов (за десятую долю микросекунды α -спираль охватывает пептид из 20-30 остатков);

2) *«очень быстрая»*: специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры: сочетания нескольких α -спиралей, нескольких β -цепей либо смешанные ассоциаты данных элементов;

3) *медленная*: формирование *«расплавленной глобулы»* (создание основных элементов третичной структуры – сочетание α -спиралей, β -тяжей, соединяющих петель, образование гидрофобного ядра молекулы фермента и формирование доменов);

4) *формирование нативной структуры белка – “затвердевание”*, формирование оболочки (несколько минут).

1.4.3 Термодинамическая характеристика процесса сворачивания

Процесс сворачивания белка осуществляется самопроизвольно за счет снижения свободной энергии ТС: повышения энтропии и понижения энтальпии. Каждая стадия сворачивания белка обеспечивается своим видом энергетически выгодных связей:

1 стадия: обеспечивается за счет образования большого количества водородных связей, которые снижают энтальпию ТС и дисульфидных связей. Установлено, что чем больше альфа-спиралей в молекуле белка, тем ниже энтальпия.

2 стадия: за счет водородных связей.

3 стадия: за счет гидрофобных взаимодействий АКО и воды, которые повышают энтропию ТС и обеспечивают 2/3 всей работы по сворачиванию белка.

4 стадия: «отвердевание» за счет гидрофобных, Ван – дер – Ваальсовых, водородных, электростатических и дисульфидных связей. Водородные связи обеспечивают точность межатомных взаимодействий.

1.4.4 Внутриклеточная регуляция пространственной структуры белка

В настоящее время установлено два механизма регуляции скорости сворачивания белка в нативную структуру:

1) *механизм регуляции скорости сворачивания*: на этапе превращения “расплавленной глобулы” в твердый белок. Осуществляется за счет специальных ферментов, которые ускоряют процесс сворачивания. К ним относятся два белка-фермента:

– *пептидилпролил-цис/транс-изомераза*, которая осуществляет перевод АКО из транс-конформации на рибосомах в цис- конформацию, необходимую для образования пространственной структуры.

– *протеиндисульфидизомераза*, которая катализирует образование и изомеризацию дисульфидных связей в молекуле белка.

2) *механизм защиты частично свернутого белка от неспецифической агрегации*. Осуществляется за счет специальных белков – *гистонов*. Они увеличивают эффективность сворачивания полипептидной цепи и защищают белок от неспецифических агрегаций. Данные белки называют *шаперонами*.

Шапероны («*chaperon*») – пожилая дама, сопровождающая молодую девушку на балы и пр., наставник, сопровождающий группу молодежи).

Функции шаперонов:

- 1) Связываются с развернутой или частично развернутой конформацией полипептидной цепи и не дают ей “запутаться”;
- 2) Удерживают частично развернутый белок;
- 3) Способствуют переносу белка в развернутом состоянии через мембранные структуры в различные органеллы клеток;
- 4) Создают условия для эффективного сворачивания белка.

Виды белков – гистонов. Гистоны относятся по своему классу к белкам «теплового шока». В обычных условиях каждая клетка содержит определенный набор шаперонов. Их синтез возрастает в стрессовых ситуациях (например, при повышении температуры).

Классифицируют шапероны по их молекулярной массе и делят на два семейства:

- 1) *шаперонины – большие белки.* Образуют сложные комплексы: hsp 10 и hsp 60, состоящие из крупных и массивных субъединиц;
- 2) *шапероны:* hsp 70 и hsp 50. Состоят из 1-2 полипептидных цепей и удерживают белок, сходящий с рибосомы, в развернутом состоянии, обеспечивают его транспорт внутри цитоплазмы после схождения с рибосомы, передают другому шаперонину для обеспечения дальнейшего сворачивания и транспорт через мембраны митохондрий, ЭПС. У митохондрий обнаружен свой шаперон hsp 50.

Освобождение белка от шаперонов связано со способностью шаперонов связываться с АТФ или АДФ. Отщепление происходит под действием фермента АТФазы.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. В чем состоит парадокс Левинтала?
2. Назовите стадии сворачивания белка.
3. В чем состоит иерархический принцип сворачивания белка.
4. Решение парадокса Левинтала.
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?

1.5 Домены, структурная и функциональная характеристика

1.5.1 Определение доменов

Домен – это участок в третичной структуре белка, обладающий структурной и функциональной автономией. В процессе сворачивания белка в нативную конформацию на третьей стадии формируется гидрофобное ядро, образованное неполярными аминокислотными остатками. По данным рентгено – структурного анализа в структуре ядра определяются мозаичные участки, образованные либо гидрофильными остатками аминокислот, либо гидрофобными с признаками структурной и функциональной автономии. Домены формируются на 3 стадии сворачивания белка.

Процесс происходит в следующей последовательности:

- 1) независимое сворачивание отдельных доменов;
- 2) установление контактов между отдельными доменами. Для мономеров, когда между отдельными доменами формируется активный центр фермента. Для олигомеров: домены образуются на стыке субъединиц.

1.5.2 Доказательства доменной стадии сворачивания белка

В 1969 году получено первое доказательство доменной стадии сворачивания белка по данным кристаллографии лизоцима. Установлено, что он имеет несколько компактных глобул.

В 1971 году обособленные структурные образования выделены у белков иммуноглобулинов Каннингхэмом, который предположил, что существует независимый генетический контроль доменной области в структуре белка. Такие области были названы *доменами*;

В 1972 году Дж. Бирктофт и Д. Блоу выделили два домена у альфа-хемотрипсина, каждый из которых имеет цилиндрическую форму и образован шестицепочечной антипараллельной бета – структурой. Такой же тип строения был определен у других протеолитических ферментов: эластазы, трипсина, аспаргатной протеиназы.

Изучение ферментативной активности белков показало, что в ферментативной реакции участвует не вся белковая молекула, а лишь небольшая ее часть (активный центр). Вся остальная часть белковой глобулы служит основанием или каркасом, обеспечивающим правильное положение аминокислотных остатков в активном центре. Поэтому белки с различной первичной структурой могут иметь одинаковые химические функции, но принадлежать к разным структурным классам белков. К ним относятся: двухдоменный белок трипсин, однодоменный белок субтилизин (из альфа-спиралей и бета - структур);

Д. Уетлауфер объясняет существование доменов спецификой механизма самопроизвольной сборки аминокислотной последовательности в нативную конформацию. Он различает 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;

Парвис и соавторы установили, что домены сложных олигомерных белков кодируются различными экзонами. Установлено, что в структуре гена ДНК участки, отвечающие за продолжительность паузы в процессе синтеза белка, обеспечивают правильную сборку мультиферментных олигомерных белков.

1.5.3 Свойства доменов

В результате многочисленных исследований установлено, что домены обладают следующими свойствами:

1) нет четкой корреляции между доменной организацией и размером белка. Например, фермент карбоксипептидаза состоит из 307 аминокислот, одного домена и одного активного центра, фермент лизоцим – из 164 аминокислот и двух доменов;

2) структурная автономия домена часто дополняется и функциональной автономией. Например, нуклеотид – связывающий домен дегидрогеназ, ответствен за взаимодействие с одним из субстратов реакции – коферментом NAD или NADH. Аминоконцевые домены (кринглы) ферментов системы свертывания крови обеспечивают связывание с липидами мембран и другими белками. Аминоконцевые домены иммуноглобулинов формируют центр связывания антигена;

3) неполная функциональная автономия: доказано для белка папаина, активный центр располагается во впадине, причем образующие его функциональные группы расположены в разных доменах, активный центр способен катализировать реакции только одного порядка;

4) доменная структура молекулы белка соответствует ранним этапам эволюции пространственной структуры белка от простейших форм жизни до сложных. Установлено, что у вируса ВИЧ-инфекции фермент протеиназа состоит из 99 аминокислот, двух доменов. По структуре данный фермент похож на фермент пепсин;

5) границы доменов соответствуют границам экзонов в молекуле ДНК;

6) домены могут независимо от других частей белковой молекулы поддерживать и формировать пространственную структуру белка;

7) установлены междоменные взаимодействия при сворачивании олигомеров;

8) установлен пространственный обмен доменами в некоторых олигомерных белках и у них процесс формирования третичной структуры идет через стадию обмена доменами.

1.5.4 Мультидоменная организация молекулы фермента

Белки построены по модульному принципу, где модулем являются домены. Белок – фермент представляет собой набор различных доменов, отвечающих за выполнение определенных функций. Например, связывание с мембраной (концевые домены ферментов свертывания крови), либо связывание с субстратом, либо регуляторный домен, который отвечает за активность и неактивность ферментов.

В зависимости от строения домена фермент приобретает следующие свойства:

- 1) абсолютную специфичность;
- 2) относительную специфичность. Это будет в том случае, если:
 - активный центр формируется на границе доменов;
 - активный центр образуется после смыкания доменов.
 - активный центр сформирован в одном домене.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Дайте определение доменов.
2. Какие существуют доказательства доменной стадии сворачивания белка?
3. Какие вы знаете свойства доменов?
4. В чем состоит мультидоменная организация молекулы белка – фермента?
5. Какие свойства приобретает фермент благодаря одинаковым доменам в его структуре?
6. Какие свойства приобретает фермент если активный центр расположен на стыке доменов?

1.6 Характеристика фермент - субстратного комплекса

Преобразование субстрата происходит внутри соединения – фермент-субстратного комплекса (E-S). Для понимания того, как работает фермент, необходимо знать структуру фермента, фермент – субстратного комплекса, а также

промежуточных соединений и продукта реакции. Время существования фермент – субстратного комплекса ограничено. Для изучения структуры фермент – субстратного комплекса проводят рентгено – структурный анализ комплексов фермент и продукт, фермент и ингибитор и с аналогами субстрата.

1.6.1 Механизм образования фермент – субстратных комплексов в растворителе

При формировании фермент – субстратного комплекса происходит образование новых межмолекулярных связей между ферментом и субстратом. Образуются водородные, ковалентная дисульфидная, гидрофобная и электростатическая связи.

Ковалентная образуется между R-группами цистеина и соответствующими остатками субстрата.

Водородная связь возникает между двумя остатками водорода, расположенными рядом с атомами кислорода. Образование таких связей происходит между субстратом и активным центром фермента лизоцима при гидролизе полисахаридов. Было установлено, что в этом случае ΔH водородной связи составляет от 4 до 8 ккал/моль.

Гидрофобные связи возникают между неполярными углеводородными фрагментами субстрата и гидрофобными (хотя бы частично) участками активного центра фермента. При этом происходит как бы экстракция R- групп фермента в органический растворитель. Например, при этом активный центр белка-фермента, содержащий участок, контактирующий с водой за счет боковых гидрофобных групп теряет связь с водой, что является энергетически более выгодным. Это способствует ускорению реакции в 10^5 раз. Данный тип взаимодействия встречается достаточно часто.

Электростатические взаимодействия возникают между заряженными группами субстрата и аминокислотными остатками активного центра фермента.

Выигрыш в энергии составляет от 6 до 9 ккал/моль, реакция ускоряется в 10^4 раз. Например, при катализе белков сериновыми протеазами.

При формировании фермент – субстратного комплекса также происходит образование *хелатных комплексов*. Таким образом, что фермент и субстрат связаны между собой двумя и более числом точек взаимодействия, такие комплексы называются *хелатными*.

При формировании фермент – субстратного комплекса также происходят конформационные изменения в молекуле фермента. Фермент может “настраиваться” определенным образом в пространстве, поскольку R- группы аминокислотных остатков активного центра в поверхностном слое белковой глобулы зафиксированы не слишком жестко и обладают определенной подвижностью. В результате обеспечивается возможность пространственной настройки сорбционных участков глобулы фермента на соответствующие участки сорбции молекулы субстрата.

Фермент способен принять конформацию, отличную от равновесной, в которой он находится до момента образования комплекса. За счет конформационных изменений уменьшаются энтропийные потери.

На формирование фермент – субстратного комплекса оказывает большой эффект микровязкость среды активного центра фермента. Это дает почти полную потерю подвижности молекул субстрата, т.е. теряется способность к поступательной, вращательной подвижности и к диффузии.

Вывод: таким образом, термодинамически невыгодный процесс формирования фермент – субстратного комплекса в растворителе компенсируется многоточечностью взаимодействия, конформационной подвижностью R- групп активного центра, микровязкостью среды активного центра и образованием различных видов связей между ферментом и субстратом.

1.6.2 Оценка свободной энергии сорбции комплекса фермент – лиганд

Процесс образования комплекса фермент – лиганд с точки зрения термодинамики рассмотрим, как последовательный, состоящий из двух этапов:

1) процесс сближения и ориентации лиганда (субстрата) напротив центра сорбции фермента, который сопровождается затратами энергии (ΔG сближения), что является термодинамически невыгодным процессом;

2) образование хелатного комплекса фермент – лиганд в растворителе за счет образования межмолекулярных связей. Энергозатраты на образование комплекса $\Delta G^{E \cdot L}$ компенсируются образованием хелатного комплекса между ферментом и субстратом: чем больше точек взаимодействия, тем больше энергия ΔG связывания (термодинамически выгодный процесс):

$$\Delta G_{\text{связывания}} - \Delta G_{\text{сближения}} = \Delta G_{\text{ассоциации}}, \quad (1.2)$$

где $\Delta G_{\text{связывания}}$ – внутренняя энергия связывания фермента и субстрата;

$\Delta G_{\text{сближения}}$ – энергия, затраченная на сближение фермента и субстрата;

$\Delta G_{\text{ассоциации}}$ – энергия ассоциации, которая снижает энергию активации субстрата в последующей ферментативной реакции преобразования субстрата в продукт.

Каталитические свойства фермента обусловлены сложным механизмом их действия. С точки зрения современной энзимологии, ферментативный катализ обусловлен тремя причинами:

1) сорбция субстрата на ферменте протекает так, чтобы облегчить последующую реакцию превращения субстрата в продукт. Снижение энергии активации субстрата происходит за счет высвобождения энергии $\Delta G^{E \cdot L}$ ассоциации;

2) полифункциональный характер химических взаимодействий между ферментом и субстратом. В активном центре фермента могут быть и нуклеофильные и электрофильные группы, которые обеспечивают химический катализ субстрата, как кислотами, так и основаниями;

3) эффектами микросреды активного центра фермента.

1.6.3 Модели взаимодействия фермента и субстрата в катализе

В настоящее время существуют три теории образования комплекса фермент – субстрат в ходе ХФР, это:

- механизм «ключ-замок»;
- теория индуцированного соответствия;
- теория напряжения.

1.6.3.1. Механизм «ключ-замок». В 1894 году Эмиль Фишер для объяснения механизма ХФР предложил модель «ключ-замок». Фермент соединяется с субстратом с образованием короткоживущего фермент-субстратного комплекса. При этом активный центр фермента организован так, что субстрат входит в него как ключ в замок. В ходе образования фермент – субстратного комплекса не изменяется структура ни субстрата, ни активного центра фермента. В этом случае фермент абсолютно специфичен в отношении субстрата.

Недостатки: для многих ферментов «ключ плохо подходит к замку», в этом случае необходимо применить дополнительную силу, чтобы повернуть «ключ».

1.6.3.2. Теория индуцированного соответствия выдвинута Кошландом. В отсутствие субстрата каталитически активные группы фермента X и X' расположены так, что не могут одновременно взаимодействовать с субстратным фрагментом Y (рисунок 1.7 а).

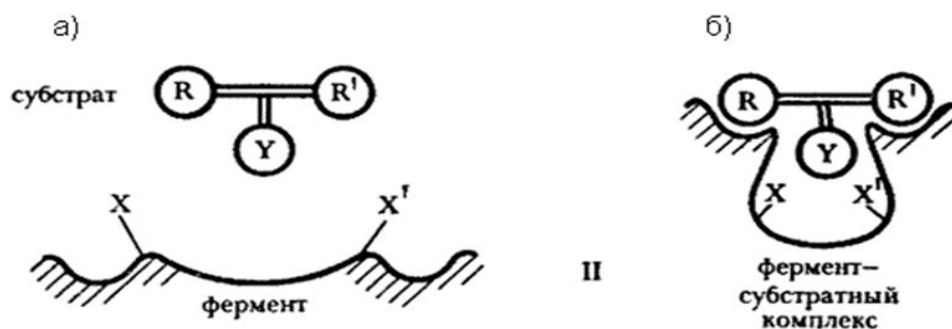


Рисунок 1.7 – Схематическое изображение конформационных изменений в ферменте, индуцированных субстратом

В результате сближения и ориентации происходит конформация активного центра фермента с образованием фермент - субстратного комплекса (рисунок 1.7 б). На образование комплекса тратится часть свободной энергии сорбции, направленной на изменение конформации активного центра фермента.

Например, фермент гексокиназа, а субстрат (S) - АТФ. Гексокиназа переносит фосфатные группы с АТФ на глюкозу. Фосфатная группа может быть перенесена и на воду.

Кошланд выдвинул три постулата механизма индуцированного соответствия:

1) до связывания с субстратом фермент находится в открытой форме. Он может захватить субстрат из воды, но не проводит фосфорилирование;

2) после связывания с субстратом домены поворачиваются, щель закрывается, вода вытесняется, а все компоненты химической ферментативной реакции сходятся вместе. Фермент переходит в закрытую каталитически активную форму, вода вытесняется и поэтому не конкурирует с субстратом за остаток фосфорной кислоты;

3) после каталитического акта фермент открывается, а продукт уходит.

Таким образом, индуцированное соответствие достигается смещением либо крупных блоков, либо целых белковых доменов, а не простой перестройкой боковых групп активного центра. По аналогии мышечного сокращения, в пальцы(домены) сжимаются в кулак.

1.6.3.4 Теория напряжения. Авторы теории напряжений Ламри и Эйринг и Дженкс. Активный центр устроен так, что в результате деформированная молекула субстрата активируется, т.е. приобретает некоторые свойства важные для образования переходного состояния реакции. Образуется переходное состояние субстрата.

В молекуле субстрата происходит сжатие или растяжение связей, изменяется угол между связями. Такая «напряженная» структура субстрата позволяет снизить энергию активации, необходимую для преобразования молекула субстрата.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Дайте определения комплементарности между ферментом и субстратом.
2. Какие ферменты относятся к сериновым протеазам?
3. Структурные и термодинамические предпосылки механизма сближения и ориентации в ферментативном катализе.
4. Какие существуют модели взаимодействия фермента и субстрата в катализе?
5. Что лежит в основе теории «напряжения»?
6. Кто является автором теории «ключ – замок». В чем суть теории?
7. Какие механизмы лежат в катализе сериновыми протеазами?
8. Какие постулаты выдвинул Кошланд механизма индуцированного соответствия?
9. Как меняется конформация фермента в результате сближения и ориентации?

2 Общие вопросы кинетики и термодинамики ферментативных реакций

2.1 Законы классической термодинамики в биохимии

В последние 30 лет наблюдается бурное развитие ферментативной кинетики. Ферментативная кинетика изучает изменение скорости ферментативных реакций в зависимости от концентрации фермента, концентрации субстрата, наличия активаторов, ингибиторов, изменения температуры и pH среды, а также механизмы регуляции активности фермента в ходе реакции.

2.1.1 Основные понятия кинетики и термодинамики. Термодинамические системы (ТС)

Кинетика – это раздел физики, изучающий изменение параметров термодинамической системы в ходе различных термодинамических процессов.

Ферментативная кинетика изучает законы термодинамики: тепловой и энергетический обмены в биологических системах. При этом живые биологические системы, могут достигать *динамического или стационарного состояния (динамического равновесия)*, в том случае, когда количество веществ и энергии, пришедшее в ТС равно количеству вещества, ушедшего из ТС.

Ферментативная кинетика изучает механизм, энергетику, регуляцию и изменение конформации ферментов в ходе ферментативных реакций. Изучением превращением энергии в биологических системах занимается раздел биохимии – *биоэнергетика*.

Химическая термодинамика использует законы термодинамики применительно к термодинамическим системам. Совокупность тел, участвующих в реакции называется *термодинамической системой*, а тела, не входящие в систему называются *внешним окружением*. ТС образуется при следующих условиях:

1) при наличии теплообмена;

2) возможности хотя бы частичной диффузии между телами, составляющими ТС.

Термодинамическая система может взаимодействовать со своим окружением, и это взаимодействие можно обнаружить по переносу тепла или совершению работы.

Термодинамические системы классифицируются на *открытые и закрытые*. Законы термодинамики применимы только к закрытым системам.

Закрытые системы обмениваются с окружающей средой только энергией, но не массой. *Открытые системы*, способны обмениваться с окружающей средой массой и энергией, а при определенных условиях достигать динамического равновесия или стационарного состояния со своим окружением, но не термодинамического равновесия с максимумом энтропии.

Биологические организмы – это открытые термодинамические системы, которые обмениваются с окружающей средой энергией и веществом.

В термодинамически равновесных системах нельзя наблюдать макроскопических изменений. Их внутренняя энергия минимальна, и они находятся в состоянии полной беспорядочности. Живые системы достигают термодинамического равновесия только после смерти.

Все открытые системы вместе с их окружением могут образовать *закрытую ТС*.

Изолированная ТС - минимально обменивается с окружающей средой энергией, но не массой.

Если состояние термодинамической системы остается неизменным во времени и причиной этого не является какой-либо внешний стационарный процесс, говорят, что *система находится в равновесии*. Если система состоит из одной фазы, то она *гомогенная*, в противном случае - *гетерогенная*.

Законы термодинамики применимы к закрытым ТС. Поэтому для исследований и расчетов в биоэнергетике ввели понятие *изолированной системы* (минимальный обмен энергии).

Термодинамические системы можно классифицировать по совокупности их свойств. Свойства термодинамической системы – называются *термодинамическими параметрами системы*:

1) интенсивные (температура, давление) – даже при небольших изменениях, приводят к изменению скорости ХФР;

2) экстенсивные (вес и объем) – не приводят к изменению скорости ферментативной реакции.

Состояние системы, находящейся в равновесии, можно описать совокупностью ее интенсивных свойств. Термодинамические параметры системы описывают только данное состояние, не учитывая предшествующих. Следовательно, изменение параметров при переходе системы из одного состояния в другое не зависит от пути реакции, а определяется только термодинамическими параметрами начального и конечного состояний.

Экстенсивные свойства:

1) масса (M) вещества – это количество материи, содержащейся в веществе. Она измеряется при помощи весов. Масса – это физическая величина, которая не изменяется в зависимости от положения объекта на Земле или над ней.

2) объем (V) – Объем – количественная характеристика пространства, занимаемого телом или веществом.

Интенсивные свойства:

1) давление (P) – характеризует взаимодействие с внешним окружением, измеряемое как сила, приходящаяся на единицу площади поверхности.

2) температура (T), определяется интенсивностью теплового движения молекул, образующих систему, не простое понятие, оно включает в себя понятие разности теплоты.

Между телами различной температуры происходит теплоперенос, приводящий к выравниванию температур. Абсолютная шкала температур основана на втором законе термодинамики. Ее начало находится на абсолютном нуле. Абсолютный ноль – составляет – 273е К.

При абсолютном нуле часть энергии любого вещества, которая зависит от температуры (тепловая энергия), равна нулю, хотя энергия частиц, составляющих вещество, при нулевой температуре, естественно, не исчезает.

2.1.2 Термодинамический процесс

Любое изменение параметров термодинамической системы, приводящее к изменению хотя бы одного термодинамического параметра, называется *термодинамическим процессом (ТП)*.

Признаки равновесного термодинамического процесса. Если в ходе термодинамического процесса система проходит равновесные состояния, то при данных условиях работа, совершаемая самой системой, будет максимальной, а работа, совершаемая над системой, – минимальна, в таком случае говорят о *равновесном ТП*.

И наоборот, ТП, протекающий при некотором ограниченном воздействии на систему, определяется как *неравновесный ТП*. Работа, совершенная такой системой, меньше, чем максимальная работа в равновесном процессе.

Если единственным результатом обратного процесса в изолированной системе является возвращение системы из конечного состояния в исходное, то такой процесс называют *обратимым ТП*.

Если в результате прямой или обратной реакции в системе или в ее окружении имеют место длительные изменения термодинамических параметров системы, то ТП называют *необратимым*.

Причина необратимости в том, что процессы в ТС протекают через *неравновесные состояния*. Термодинамические параметры однозначны только для обратимых процессов, когда система находится в равновесии в любой момент времени и в каждой ее части. Если вывести систему из состояния устойчивого равновесия, то возникнет термодинамический процесс, препятствующий внешнему воздействию (принцип Ле Шателье - Брауна).

2.1.3 Первый закон термодинамики

Первый закон термодинамики гласит о том, что энергия в ТС не может быть получена из ничего и не может быть уничтожена, а может только превращаться из одного вида в другой. Это означает, что содержание энергии (U) в термодинамической системе увеличивается при совершении ТС работы (A) или передачи тепла (Q):

$$\Delta U = A + Q, \quad (2.1)$$

где ΔU – изменение энергии ТС;

A – работа ТС;

Q – теплота ТС.

В случае ТП, когда изменение энергии системы $\Delta U = 0$,

$$A = - Q \quad (2.2)$$

Отсюда проистекает невозможность создания вечного двигателя первого рода.

Если над ТС не совершается никакой работы, т. е. $\Delta U = \Delta Q$, то при равновесном давлении ($\Delta P = 0$) для объема V можно определить новую функцию:

$$H = U + PV \quad (3.3)$$

где H – энтальпия (или теплосодержание ТС);

U – внутренняя энергия ТС;

P – давление в ТС;

V – объем ТС.

Закон Гесса: теплота превращения в ТС не зависит от пути протекания ТП.

При экзотермическом процессе – выделенная ТС теплота считается отрицательной величиной (теплосодержание системы уменьшается), т. к. положительным условно считается тепло, полученное ТС (+Н) – это эндотермический процесс, сопровождающийся увеличением теплосодержания ТС. Протекающие в живых организмах анаболические процессы представляют собой эндотермические реакции, а катаболические - экзотермические.

2.1.4 Второй закон термодинамики

Все процессы в природе протекают в одном направлении, т. е. они необратимы. Необратимость в термодинамике означает, что *ТП процесс не может идти в ТС в обратном направлении без изменения энтропии*. Энтропия выражается следующим уравнением:

$$\Delta S = \Delta Q / T, \quad (3.4)$$

где ΔS – изменение энтальпии ТС;

ΔQ – изменение теплоты ТС;

T – температура ТС.

Дифференциальное изменение энтропии равняется отношению элементарного количества теплоты к абсолютной температуре. Основываясь на втором законе термодинамики, все природные процессы, не противоречащие первому закону термодинамики, можно разделить на две группы:

- *самопроизвольные ТП при данных условиях;*
- *не самопроизвольные ТП.*

Невозможна реакция, дающая только перенос тепла от тела с более низкой температурой к телу с более высокой температурой. Это означает, что работа в ТС не может быть выполнена исключительно за счет тепловой энергии окружающей среды, другими словами, невозможно создание вечного двигателя второго рода.

При обратимых ТП в изолированной ТС энтропия остается неизменной, при необратимых процессах она возрастает. Если в результате необратимого процесса изолированная система приходит в равновесие, то ее энтропия достигает максимума. Следовательно, изменение энтропии определяет направление ТП и одновременно условия термодинамического равновесия.

Принцип постоянства или увеличения энтропии справедлив только для изолированной системы. В изолированной системе увеличение энтропии служит мерой необратимости процесса. Живые организмы сохраняют внутреннюю упорядоченность (постоянную энтропию), получая дополнительную энергию в виде пищевых веществ (химическая энергия) или солнечного света (электромагнитная энергия) из окружающей среды и возвращают в нее такое же количество энергии в другой форме, главным образом в форме тепла, которое рассеивается во всей остальной Вселенной. Живые организмы непрерывно должны повышать свою энтропию для поддержания внутреннего порядка.

2.1.5 Характеристические функции состояния ТС

Характеристической функцией называется такая функция ТС, посредством которой могут быть выражены ее свойства. Под *потенциалом* понимают функцию, изменение которой связано с работой ТС. В термодинамике наиболее широко используют следующие характеристические функции:

- 1) изохорно-изотермический потенциал ТС – энергия Гельмгольца (ΔF);
- 2) изобарно-изотермический потенциал ТС – энергия Гиббса (ΔG);
- 3) внутренняя энергия ТС (ΔU);
- 4) энтальпия ТС (ΔH);
- 5) энтропия ТС (ΔS).

Внутренняя энергия (ΔU) ТС определяется согласно уравнения:

$$\Delta U = T\Delta S - P\Delta V, \quad (2.5)$$

где ΔU – изменение внутренней энергии ТС;

T – температура;

ΔS – энтропия;

P – давление;

ΔV – объем.

Энтальпия ΔH – это изменение теплосодержания системы при постоянном давлении и энтропии.

$$\Delta H = T\Delta S + V\Delta P, \quad (2.6)$$

где ΔH – изменение теплосодержания ли энтальпии ТС;

T – температура;

ΔS – энтропия;

ΔP – давление;

V – объем.

Энтропия ΔS – это мера неупорядоченности ТС, величина, равная количеству теплоты, поступающей в ТС при постоянной температуре.

$$\Delta S = \Delta Q / T, \quad (2.7)$$

где ΔS – изменение энтропии ТС;

T – температура;

ΔS – энтропия;

ΔQ – изменение теплоты.

Энергия Гельмгольца – это свободная энергия ТС, идущая на совершение полезной работы при постоянном объеме и температуре (изохорно-изотермический потенциал).

$$F = U - TS, \quad (2.8)$$

где F – свободная энергия ТС;

T – температура;

ΔS – энтропия;

U – внутренняя энергия ТС.

Энергия Гиббса – это свободная энергия ТС, идущая на совершение системой полезной работы при постоянном давлении и температуре (*изобарно-изотермический потенциал*).

$$G = H - TS \quad (2.9)$$

где G – энергия Гиббса;

T – температура;

S – энтропия;

H – энтальпия.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Что изучает ферментативная кинетика?
2. Что такое термодинамический процесс и какие его виды?
3. Дайте понятие термодинамической системы?
4. Какие бывают термодинамические системы?
5. Что значит открытая термодинамическая система?
6. Сформулируйте первый закон термодинамики.
7. Сформулируйте второй закон термодинамики.
8. Термодинамический процесс и его виды.
9. Энтальпия и энтропия.
10. Характеристические функции в термодинамике.

2.2 Кинетика Михаэлиса – Ментена

2.2.1 Химическая кинетика. Понятие порядка реакции

Химическая кинетика – учение о химическом процессе, его механизме и закономерностях развития во времени.

Химическая кинетика изучает скорость химической реакции с учетом различных условий: концентрации реагирующих веществ, температуры, рН среды, наличия или отсутствия катализаторов.

В химии одной молекуле вещества соответствует один моль вещества, а количество молей вещества обозначается коэффициентом реакции. В соответствии с законом действующих масс, *порядок реакции* определяется суммой степеней концентраций реагирующих веществ.

Например, в ходе химической реакции 1 моль вещества А превращается в 1 моль вещества В: $1 \text{ моль А} \Rightarrow 1 \text{ моль В}$

Это мономолекулярная реакция, или реакция первого порядка.

Если в ходе реакции, 1 моль вещества А взаимодействует с 1 молем вещества В и в результате их взаимодействия образуется 1 моль вещества С: $A + B \Rightarrow C$, то эта реакция будет называться бимолекулярной или реакцией 2 порядка.

2.2.2 Кинетика Михаэлиса – Ментена

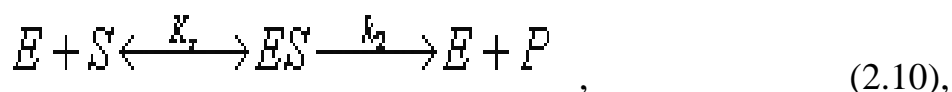
В 1835 году Ян Берцелиус впервые предположил, что реакции живого организма осуществляются благодаря «новой силе», которую он назвал «каталитической». Берцелиус сформулировал принцип катализа, включив в число каталитических агентов и фермент диастазу, которая катализировала гидролиз крахмал быстрее, чем серная кислота.

Предварительные эксперименты по изучению кинетики ферментативных реакций показали, что скорость ХФР, описываемой уравнением: $E + S \rightarrow E + P$, не зависит от концентрации фермента и субстрата так, как в случае обычной химической реакции второго порядка.

Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята Дюкло в 1898 году. Браун (1902) и независимо от него Анри (1903) впервые выдвинули гипотезу об образовании в ходе реакции фермент – субстратного комплекса.

В 1913 году Михаэлис и Ментен опубликовали свою теорию общего механизма ферментативных реакций. Их уравнение стало фундаментальным принципом всех кинетических исследований ферментов.

Так, Михаэлис и Ментен предположили, что механизм обычной двухстадийной ХФР описывается схемой:



где: E – фермент;

S – субстрат;

ES – фермент – субстратный комплекс;

P – продукт ХФР;

k_1 – константа диссоциации первой стадии (реакция второго порядка);

k_2 – константа диссоциации второй стадии распада фермент субстратного комплекса (реакция первого порядка).

В данной схеме $k_1 = k_s$, где k_s – константа диссоциации фермент субстратного комплекса, а скорость ХФР определяется скоростью распада фермент – субстратного комплекса до продукта, т.е. скоростью второй стадии:

$$v_0 = k_2 [ES], \quad (2.11)$$

где: k_2 – константа диссоциации второй стадии распада фермент субстратного комплекса (реакции первого порядка);

v_0 – начальная скорость ХФР;

[ES] - концентрация фермент – субстратного комплекса.

Модель предполагает, что равновесие первой стадии ХФР между свободными ферментом, субстратом и фермент – субстратным комплексом устанавливается быстро по сравнению со скоростью всей ХФР (быстро устанавливающееся равновесие первой стадии $k_2 \ll k_1, k_{-1}$). В этом случае вторая стадия реакции

практически не влияет скорость первой стадии, и поэтому для выражения концентрации фермента можно воспользоваться константой диссоциации фермент – субстратного комплекса K_s .

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [E] = \frac{K_s[ES]}{[S]} \quad (2.12)$$

где K_s – константа диссоциации фермент субстратного комплекса;

$[E]$ – концентрация фермента;

$[S]$ – концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса.

Общая концентрация фермента в реакционной смеси выражается уравнением материального баланса по ферменту:

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] (K_s/[S] + 1), \quad (2.13)$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация фермента;

K_s – константа диссоциации фермент субстратного комплекса;

$[E]$ – концентрация фермента;

$[S]$ – концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса.

Тогда концентрация фермент – субстратного комплекса равна:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]}, \quad (2.14)$$

Реакция достигает максимальной скорости, когда весь фермент находится в комплексе с субстратом:

$$V_{\max} = k_s [ES] = k_s [E]_0, \quad (2.15)$$

где V_{\max} – максимальная скорость ХФР;

k_s – константа диссоциации фермент - субстратного комплекса;

$[E]_0$ – начальная концентрация фермента;

$[S]$ – концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса.

Это условие выполняется, если реакция протекает при избыточной концентрации субстрата: $[S]_0 \gg [E]_0$. Из предыдущих уравнений получим:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_s + [S]}, \quad (2.16)$$

где v_0 – начальная скорость ХФР;

V_{\max} – максимальная скорость ХФР;

K_s – константа диссоциации фермент - субстратного комплекса;

$[S]$ – концентрация субстрата.

Это и есть *классическое уравнение Михаэлиса - Ментена*, которым и сегодня пользуются для описания кинетики ХФР, а величина *константы Михаэлиса* при данных условиях $K_m = K_s$ и представляет собой меру сродства фермента субстрату. Максимальная скорость ХФР достигается тогда, когда концентрация фермент – субстратного комплекса численно равна общей концентрации фермента (т. е. когда весь фермент связан с субстратом в комплекс).

В этом случае зависимость скорости ХФР от концентрации (E) во многом зависит от соотношений концентрации фермента и субстрата. Если концентрация субстрата достигает максимальной и значительно превышает концентрацию фермента ($[S] \gg [E]$), то тогда скорость ХФР возрастает линейно прямо пропорционально концентрации фермента, т.е. чем выше концентрация $[E]$, тем выше будет скорость реакции.

2.2.3 Ограничения кинетики Михаэлиса-Ментена

Михаэлис и Ментен вывели уравнение с учетом двух условий: быстро устанавливающееся равновесие первой стадии и значительный избыток субстрата. Позднее было доказано, что уравнение справедливо, при выполнении семи условий или постулатов.

Постулаты выполнения уравнения Михаэлиса - Ментена:

- 1) в ходе реакции образуется кинетически устойчивый фермент-субстратный комплекс, который существует в определенной концентрации в течении определенного времени;
- 2) определяемая с помощью уравнения константа K_s является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса: это справедливо, только если $k_2 \ll k_1, k_{-1}$;
- 3) концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, то есть $[S] = [S]_0$;
- 4) продукт реакции быстро отщепляется от фермента, то есть реакция двухстадийная;
- 5) вторая стадия реакции необратима. Так как это практически не выполнимо, мы принимаем во внимание только начальные скорости ХФР;
- 6) с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата;
- 7) для всех реагирующих веществ вместо активностей можно использовать их концентрации.

2.2.4 Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса (обоснование первого постулата)

К настоящему времени по данным рентгено – структурного анализа имеются сотни экспериментальных доказательств, демонстрирующих образование кинетически устойчивых фермент – субстратных комплексов в ходе

ферментативных реакций. Хотя выдвигались также и другие теории, без образования в ХФР фермент – субстратного комплекса.

1. *Теория телекинетических взаимодействий* предполагает, что фермент увеличивает энергию молекулы субстрата с помощью каких-либо телекинетических взаимодействий (электростатическое притяжение или отталкивание, электромагнитное излучение и т. д.).

2. *Теория упругих столкновений*. Считается, что фермент передает энергию субстрату при упругих столкновениях. При этом молекула субстрата достигает энергии выше определенного уровня и может вступать в реакцию или разрушаться с образованием продуктов.

Несмотря на то, что для данных теорий были составлены кинетические уравнения, когда фермент отделен от субстрата растворителем (т. е. может происходить телекинез в передаче энергии субстрату), такие теории до сих пор не нашли экспериментального подтверждения.

Это означает, что образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса обязательно происходит во всех известных ферментативных реакциях. Поэтому первое условие, определяющее справедливость кинетики Михаэлиса - Ментена, можно считать доказанным.

2.3 Природа константы K в уравнении Михаэлиса - Ментена

2.3.1 Стационарная кинетика Бриггса и Холдейна (обоснование второго постулата)

Второй постулат формулирует, что константа K_s в уравнении (2.16) является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Бриггс и Холдейн в 1925 году доказали, что исходное уравнение Михаэлиса – Ментена справедливо только при условии $k_2 \ll k_1, k_{-1}$, т. е. когда равновесие первой стадии ($E + S \rightleftharpoons ES$) устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью установления равновесия второй стадии.

Поэтому такие кинетические механизмы, подчиняющиеся начальному условию Михаэлиса-Ментен и имеющие одну медленную стадию, относительно которой равновесия во всех других стадиях устанавливаются быстро, называются "*быстрым равновесием*".

Если k_2 по порядку величины сравнима с k_{-1} , то тогда используется кинетика *Бриггса и Холдейна* или *кинетика стационарности*: когда количество образовавшегося фермент – субстратного комплекса равно количеству распавшегося. В этом случае уравнение начальной скорости ХФР будет следующим:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad V = K_1[E][S] \quad (2.17)$$

где V – скорость ХФР;

V_{max} – максимальная скорость ХФР;

K_M – константа Михаэлиса;

$[S]$ – концентрация субстрата.

$[E]$ – концентрация фермента;

K_1 – константа диссоциации первой стадии (реакция второго порядка);

Данное уравнение аналогично уравнению (2.16), но оно расширяет область применимости исходного уравнения Михаэлиса-Ментена.

2.3.2 Природа константы K в уравнении Михаэлиса-Ментена

Если в ХФР выполняется условие быстро устанавливающегося равновесия первой стадии и $k_2 \ll k_1, k_{-1}$, то константа диссоциации K , которая будет найдена при исследовании зависимости скорости ХФР от концентрации субстрата, является константой диссоциации фермент – субстратного комплекса (первой стадии) K_s .

При выполнении условия стационарности: $k_2 = k_1$, (кинетика *Бриггса и Холдейна*), найденная тем же способом константа будет являться константой *Михаэлиса*, где $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$.

В других реакциях, когда $k_1 \ll k_2$, константа Михаэлиса равняется k_2/k_1 и называется, согласно Ван Слайку, *кинетической константой* K_k .

При изменении условий реакции значение константы K также может изменяться. Так, например, в случае пероксидазы, при высокой концентрации субстрата – донора протонов, эта константа является кинетической константой (K_k). При уменьшении концентрации субстрата – донора протонов, константа превращается в константу Михаэлиса – K_m , а при очень низких уровнях субстрата – донора протонов получаем константу диссоциации фермент – субстратного комплекса – K_s .

Поскольку значение константы Михаэлиса меняется в зависимости от условий реакции, константу K_m также обозначают, как K_m (каж.). График зависимости скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата S согласно уравнения (2.16) будет иметь гиперболическую форму (рисунок 2.1). На данном графике видно, что в начале реакции скорость реакции возрастает прямо пропорционально линейно с увеличением *концентрации* субстрата. Порядок реакции в этом случае будет первым. Скорость реакции на данном отрезке достигает максимальной (V_{max}), когда весь субстрат будет связан с ферментом, и константа ХФР будет соответствовать K_s .

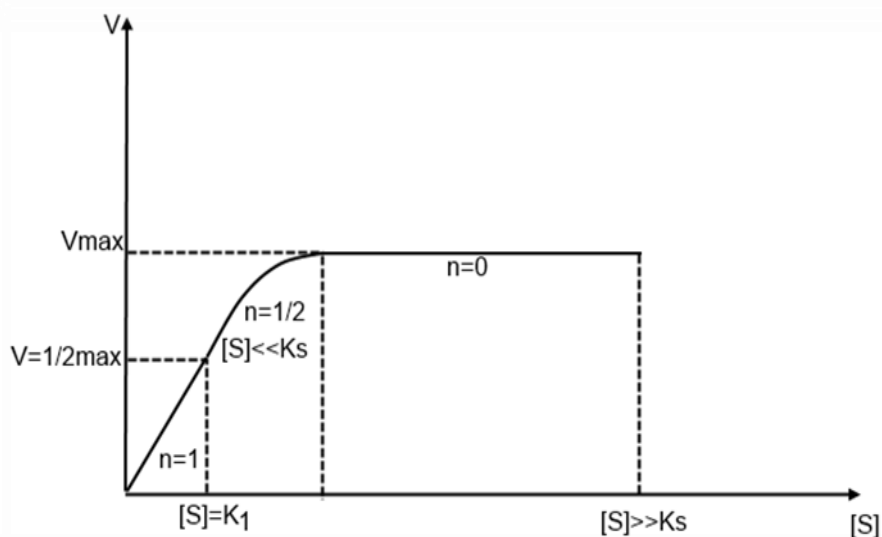


Рисунок 2.1 – График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата S .

Далее при нарастании концентрации субстрата, график меняется с прямой на параболу. В этом случае порядок реакции становится дробным ($n=1/2$). В этой части реакции S расходуется, концентрация его уменьшается и становится $[S] = K_m$, а скорость реакции равняется S от V_{max} . При дальнейшем увеличении концентрации субстрата S , скорость реакции не увеличивается, а порядок реакции становится нулевым ($n = 0$), а скорость реакции $V = const$.

Таким образом, *физический смысл константы Михаэлиса (K_m)* состоит в том, что это такая концентрация субстрата $[S]$ при которой, скорость ХФР составляет S от максимальной.

Значение констант для каждой ферментативной реакции определяется экспериментально и их значение зависит от рН - среды, температуры, присутствия ингибитора (активатора). Если для фермента определена V_{max} и K_m , то можно рассчитать оптимальную концентрацию субстрата S .

2.3.3 Методы графического определения кинетических параметров

Для решения практических задач энзимологии график гиперболический зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата S является весьма неудобным. Поэтому на практике используются методы линеаризации экспериментальных данных.

Наиболее часто для определения кинетических параметров ХФР используются координаты Лайнуивера – Берка ($1/V$ и $1/S$) и координаты Диксона – Ида ($1/V$ и $[S]$).

Метод Лайнуивера – Берка называется методом двойных обратных величин. График зависимости скорости ХФР от концентрации субстрата имеет линейный вид и представлен на рисунке 2.2.

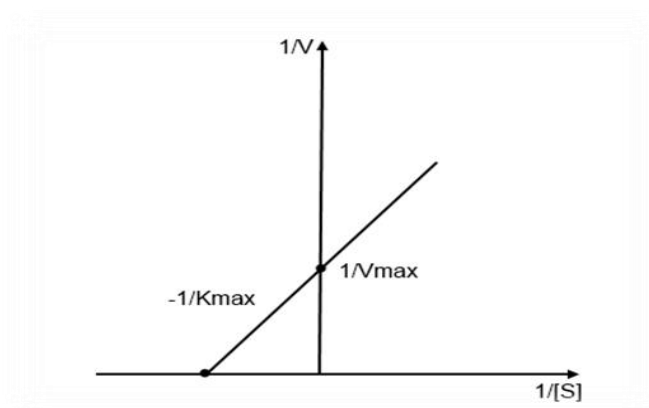


Рисунок 2.2 – График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата S по методу Лайнуивера – Берка.

Определение обратных значений ($1/V$) скорости ХФР в координатах Лайнуивера – Берка ведется по формуле 2.18:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.18)$$

где V – скорость ХФР;

V_{max} – максимальная скорость ХФР;

K_M – константа Михаэлиса;

$[S]$ – концентрация субстрата.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Порядок реакции и методы его определения.
2. История развития ферментативной кинетики.
2. Уравнение Михаэлиса-Ментена.
3. Ограничение кинетики Михаэлиса-Ментена.
4. Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса.
5. Природа константы K в уравнения Михаэлиса-Ментена.
6. В чем физический смысл константы Михаэлиса.

7. Какой формы график зависимости скорости ХФР от концентрации субстрата согласно уравнения Михаэлиса-Ментена?

8. Какие координаты в зависимости Лайнуивера – Берка?

9. Что такое кинетическая константа?

10. Какие имеются доказательства первого постулата?

2.4 Кинетический анализ двухстадийных ферментативных реакций, не подчиняющихся уравнению Михаэлиса-Ментена

Третий постулат ферментативной кинетики гласит: концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, то есть $[S]_t = [S]_0$. Это означает наличие достаточно большого избытка субстрата. Однако во многих случаях это условие не выполняется. С одной стороны, большой избыток субстрата не используется в реакциях «in vitro» с некоторыми ферментами из-за частого ингибирования субстратом ферментативной активности самого фермента. Обычно не достигается избыток субстрата и «in vivo».

В ферментативных реакциях, где субстрат не находится в избытке и, следовательно, его концентрация меняется с течением времени в ходе реакции, константа диссоциации примет вид:

$$K_s = \frac{([S]_0 - [ES] - [P])([E]_0 - [ES])}{[ES]} \quad (2.19)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

$[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[P]$ – концентрация продукта ХФР.

Начальная скорость реакции тогда будет:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_t}{K_s + [S]_t}, \quad (2.20)$$

где V_{\max} – максимальная скорость ХФР;
 K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;
 $[S]_t$ – концентрация субстрата на данный момент времени.

2.4.1 Изменение концентрации субстрата в ходе ферментативной реакции (обоснование третьего постулата)

Уравнение (2.20) можно решить используя два разных варианта условий ХФР, когда $[S]_0 \neq [S]_t$:

1) если это неравенство выполняется из-за больших значений t , т. е. когда более 5% от начальной концентрации субстрата израсходовано за время реакции (в начале реакции условие избытка субстрата выполнялось);

2) если концентрацией фермента нельзя пренебречь по сравнению с концентрацией субстрата и, таким образом, нужно принимать во внимание концентрацию фермент - субстратного комплекса (время реакции мало, но условие избытка субстрата не выполнено изначально).

2.4.1.1 Решение первого варианта: Если t велико, а $[ES] \ll [S]_0$, уравнение (2.20) переходит в следующее:

$$K_s = \frac{([S]_0 - [P])([E]_0 - [ES])}{[ES]} \quad (2.21)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;
 $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;
 $[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса;
 $[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;
 $[P]$ – концентрация продукта ХФР.

Для значения концентрации субстрата $[S]_t$, которая меняется в ходе реакции, удовлетворительным приближением служит значение $([S]_0 + [S]_t)/2$. Тогда среднюю скорость можно выразить как:

$$v = \frac{V_{\max} ([S]_0 + [S]_t)}{2K_M + [S]_0 + [S]_t} \quad (2.22)$$

где V_{\max} – максимальная скорость ХФР;

K_M – константа Михаэлиса;

$[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[S]_t$ – концентрация субстрата на данный момент времени.

2.4.1.2 Решение второго варианта. Когда условие избытка субстрата не выполнено изначально, но расход субстрата не превышает 5%. В этом случае можно пренебречь концентрацией продукта $[P]$, но нельзя не учитывать концентрацию фермент-субстратного комплекса $[ES]$.

$$K_s = \frac{[S][E]}{[ES]} \quad (2.23)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса;

$[E]$ – концентрация фермента;

Квадратное уравнение относительно концентрации субстрата:

$$[S]^2 + \alpha[S] - K_s[S]_0 = 0 \quad (2.24)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

$[S]_0$ – концентрация субстрата в начале реакции;

$[S]$ – концентрация субстрата;

α – коэффициент, который равен:

$$\alpha = K_s + [E]_0 - [S]_0, \quad (2.25)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

$[S]_0$ – концентрация субстрата в начале реакции;

$[S]$ – концентрация субстрата.

Решением данного квадратного уравнения является

$$[S] = \frac{\sqrt{\alpha^2 + 4K_s[S]_0} - \alpha}{2} = \lambda K_s \quad (2.26)$$

где K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

$[S]_0$ – концентрация субстрата в начале реакции;

$[S]$ – концентрация субстрата;

α – коэффициент.

$$\lambda = \frac{\sqrt{\alpha^2 + 4K_s[S]_0} - \alpha}{2K_s} \quad (2.27)$$

Тогда скорость реакции V можно выразить уравнением

$$v = k_2[ES] = k_2 \frac{[E][S]}{K_s} = \frac{\lambda k_2[E]_0}{1 + \lambda} = \frac{\lambda V_{\max}}{1 + \lambda} \quad (2.28)$$

где k_2 – константа диссоциации второй стадии;

$[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

V_{\max} – максимальная скорость ХФР.

Выражая из последнего уравнения λ , получим

$$\lambda = \frac{1}{\frac{V_{\max}}{v} - 1} \quad (2.29)$$

где V – скорость ХФР;

V_{\max} – максимальная скорость ХФР.

При сравнении значений, рассчитанных данным методом, со значениями, полученными из точного, проинтегрированного уравнения Михаэлиса - Ментена, оказывается, что ошибка в определении K_m составляет только 1% и 4% при расходовании 30% и 50% субстрата соответственно. Следовательно, данными уравнениями можно пользоваться для расчета кинетических параметров ХФР при больших промежутках времени реакции и расходовании субстрата.

2.4.2 Методика нахождения кинетических констант при условии $[S]_0 \neq [S]_t$

Методика нахождения констант в данном случае выглядит следующим образом.

1. В предварительных экспериментах (при избытке субстрата) определяют V_{\max} ;
2. В условиях $[E]_0 \sim [S]_0$ определяют скорости реакции при разных концентрациях субстрата;
3. По уравнению (2.29) рассчитываем параметр λ для каждой вычисленной скорости;
4. По вычисленным параметрам λ определяем K_s .

По точке пересечения данной прямой с осью абсцисс находим K_s , тангенс угла наклона равен $1/[E]_0$. Таким образом, изучение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$ позволяет определить абсолютную концентрацию активных центров фермента.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Что гласит третий постулат ферментативной кинетики?
2. Приближенное решение уравнения Михаэлиса-Ментен в случае больших времен протекания реакции.
3. Какие условия для первого варианта приближенного решения уравнения Михаэлиса-Ментен?

4. Какие условия для второго варианта приближенного решения уравнения Михаэлиса-Ментен?

5. Какова методика нахождения кинетических констант при условии $[S]_0 \neq [S]_t$?

2.5 Влияние обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции

2.5.1 Механизмы влияния обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции

Вещества, изменяющие каталитическую активность фермента, называются *эффекторами*.

Взаимодействие фермента с эффектором представляет собой химическую реакцию и поэтому может быть полностью обратимым, частично обратимым или практически необратимым. Если процесс ингибирования необратим, то кинетическая реакция не подчиняется механизму Михаэлиса - Ментен, основой которого является наличие равновесия между свободной и связанной формами фермента.

В случае обратимых ингибиторов для описания кинетики ферментативной реакции можно воспользоваться уравнением Михаэлиса-Ментена. По влиянию ингибиторов на параметры ХФР их классифицируют:

а) конкурентные – ингибиторы, в присутствии которых повышается K_m , а V_{max} не меняется. Вызываемый такими ингибиторами эффект можно частично или полностью снять путем повышения концентрации субстрата. Примером может служить обратимое конкурентное ингибирование фермента сукцинилдегидрогеназы малоновой кислотой, субстратом которой является янтарная кислота (рисунок 2.3);

б) неконкурентные – ингибиторы, инактивирующие фермент или фермент – субстратный комплекс путем уменьшения V_{max} , но не влияющие на K_m . В этом случае повышение концентрации субстрата не приводит к повышению скорости

реакции. К неконкурентным ингибиторам относятся ионы тяжелых металлов, обратимо реагирующие с -SH группами цистеинов.

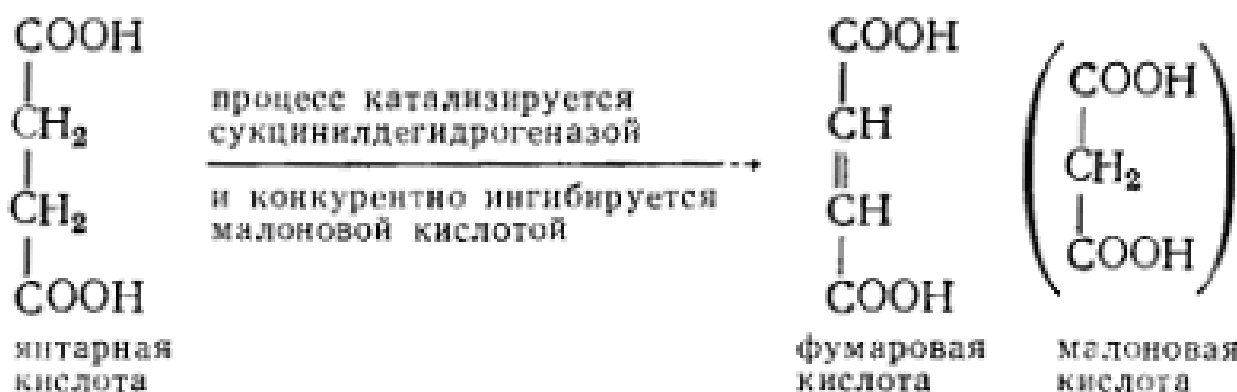


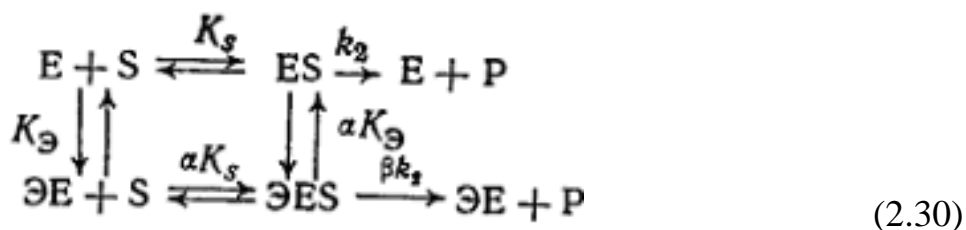
Рисунок 2.3 – Обратимое конкурентное ингибирование фермента сукцинилдегидрогеназы малоновой кислотой

Многие из конкурентных ингибиторов по своей химической природе близки субстратам. Такие ингибиторы называются *субстратными аналогами*.

Неконкурентные ингибиторы связываются с аллостерическим центром фермента.

2.5.2 Кинетика ферментативных реакций, протекающих с участием эффектора

В общем случае влияние обратимого эффектора на двухстадийную ферментативную реакцию может быть передано схемой:



где E - фермент;

S - субстрат;

P – продукт реакции;

k_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

k_3 – константа диссоциации комплекса фермент – эффектор;

ЭЕ – комплекс фермент – эффектор;

ЭЕС – тройной комплекс эффектор – фермент – субстрат.

Для начальной скорости ферментативной реакции (при условии $[S]_0, [Э]_0 \gg [E]_0$, где $[Э]$ – концентрация эффектора, α – коэффициент, показывающий во сколько раз меняется скорость первой стадии в присутствии эффектора, а β – коэффициент, изменения скорости второй стадии при установившихся равновесиях первой и второй стадиях ХФР, справедливо:

$$v = \frac{k_2 \frac{\alpha K_3 + \beta [Э]}{\alpha K_3 + [Э]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_3 + [Э]}{\alpha K_3 + [Э]} + [S]_0} \quad (2.31)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[ES]$ – концентрация фермент – субстратного комплекса;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[Э]$ – концентрация эффектора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

k_3 – константа диссоциации комплекса фермент - эффектор;

α – коэффициент изменения скорости первой стадии;

β – коэффициент, изменения скорости второй стадии.

В зависимости от численных значений α и β эффектор может выступать в роли либо ингибитора, либо активатора ферментативной реакции. Выделяют следующие виды ингибирования:

- полное конкурентное ингибирование;

- полное неконкурентное ингибирование;
- бесконкурентное ингибирование;
- простая активация;
- смешанное ингибирование;
- смешанное активирование.

2.5.2.1 Полное конкурентное ингибирование ($\alpha \rightarrow \infty$, β не имеет определенного смысла), скорость ХФР определяется уравнением:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]_0} \quad (2.32)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

k_i – константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор.

Зависимость в координатах Лайнуивера - Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат (рисунок 2.4).

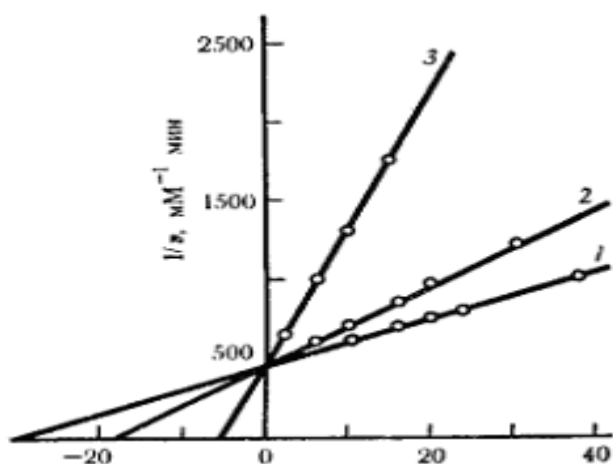


Рисунок 2.4 – График зависимости при полном конкурентном ингибировании

Если отложить экспериментальные данные в координатах ($K_{M(\text{каж})}$, $[I]$), константу конкурентного ингибирования K_i можно определить по формуле 2.33:

$$K_{M(\text{каж})} = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (2.33)$$

где K_m – константа Михаэлиса;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_i – константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор.

2.5.2.2 Полное неконкурентное ингибирование ($\alpha \rightarrow 1, \beta = 0$). В этом случае, скорость ХФР определяется уравнением:

$$v = \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{[I]}{K_i}} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (2.34)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

k_i – константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор.

Зависимость в координатах Лайнуивера - Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс (рисунок 2.5).

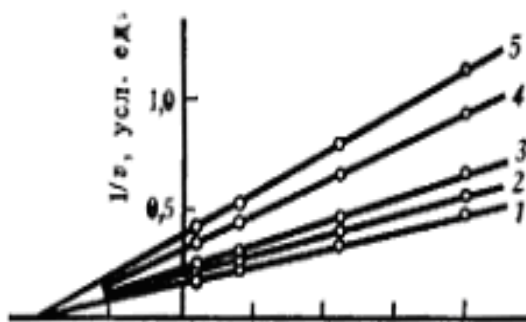


Рисунок 2.5 – График зависимости при полном неконкурентном ингибировании

Если представить экспериментальные данные в координатах $(1/k_{\text{кат}}, [I])$, константу неконкурентного ингибирования K_i можно определить, зная величину k_k :

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (2.35)$$

где k_k – каталитическая константа;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

K_i – константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор.

2.5.2.3 *Бесконкурентное ингибирование ($\alpha=\beta<1$). В этом случае скорость ХФР:*

$$v = \frac{\alpha k_2 \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} + [S]_0} \quad (2.36)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

K_i – константа ингибирования;

α – коэффициент изменения скорости первой стадии;

β – коэффициент, изменения скорости второй стадии.

Значения констант k_{kat} и $K_{M(каж)}$ ферментативной реакции при увеличении концентрации эффектора уменьшаются в одинаковой степени, поэтому графики в координатах Лайнуивера - Берка имеют вид семейства параллельных прямых (рисунок 2.6).

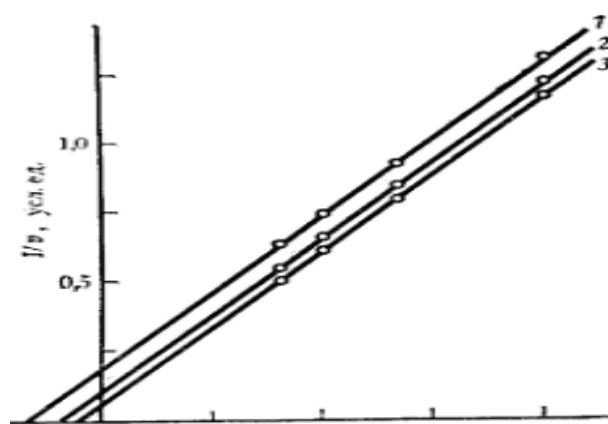


Рисунок 2.6 – График зависимости при бесконкурентном ингибировании

Для анализа уравнения выражение для каталитической константы

$$k_{kat} = \alpha k_2 \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} \quad (2.37)$$

где k_k – каталитическая константа;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

K_i – константа ингибирования;

α – коэффициент изменения скорости первой стадии.

удобно преобразовать к следующему виду:

$$\frac{1}{\frac{k_{kat}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_i}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{[I]} \quad (2.38)$$

где k_k – каталитическая константа;

$[I]$ – концентрация ингибитора;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

K_i – константа ингибирования;

α – коэффициент изменения скорости первой стадии.

Из графика, построенного в координатах $(1/(k_{kat}/k_2 - 1), 1/[I])$, можно отдельно найти значения α и K_i .

2.5.2.4 Неконкурентная активация ($\alpha=1, \beta>1$). В этом случае субстрат и активатор связываются независимо с активным центром, образуя тройной комплекс (фермент – субстрат – активатор), что приводит к увеличению скорости образования продукта ХФР. Поэтому начальная скорость ХФР определяется выражением:

$$v = \frac{k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} [E]_0 [S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (2.39)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;

$[E]_0$ – концентрация фермента в начале реакции;

$[A]$ – концентрация активатора;

K_s – константа диссоциации фермент – субстратного комплекса;

k_2 – константа диссоциации второй стадии;

K_A – константа активирования;

β – коэффициент, изменения скорости второй стадии.

Зависимость в координатах Лайнуивера - Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс.

2.5.2.5 Смешанные типы ингибирования и активации ($\alpha \neq 1, \beta \neq 1$). В случае смешанных типов ингибирования или активации графики в координатах

Лайнуивера - Берка имеют вид пучка прямых, соответствующих различным концентрациям эффектора, и пересекающихся в общей точке в правом верхнем, левом верхнем или левом нижнем квадранте в зависимости от значений α и β (рисунок 2.7).

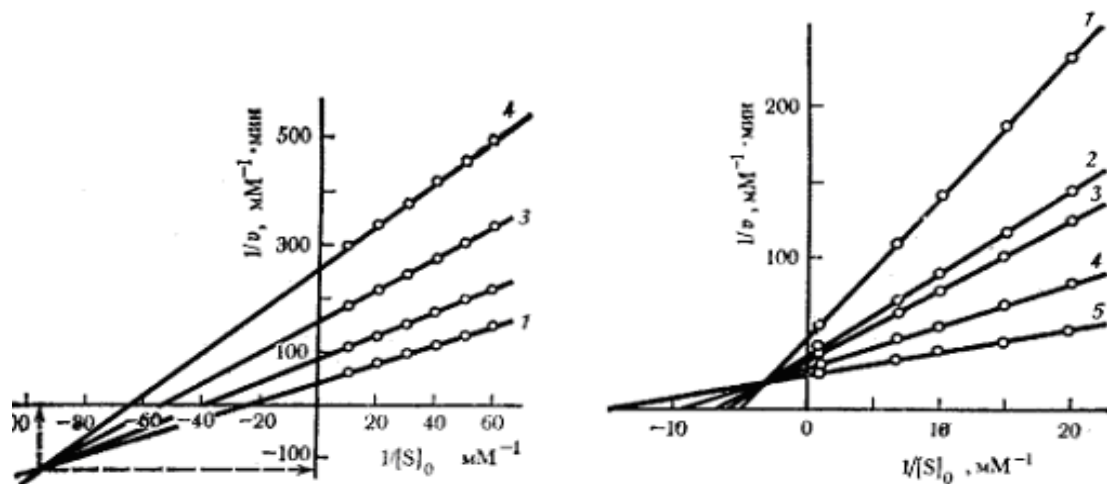


Рисунок 2.7 – Графики зависимости при смешенном типе ингибирования

Координаты точки пересечения пучка прямых определяется значениями констант α и β .

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Какие могут быть варианты взаимодействия фермента с эффектором?
2. Что обозначает обратимое ингибирование?
3. Что обозначает не обратимое ингибирование?
4. Что обозначает конкурентная активация?
5. Что обозначают коэффициенты α и β ?
6. Как будет выглядеть график зависимости при смешенном типе ингибирования?
7. Как будет выглядеть график зависимости при неконкурентной активации?
8. Как будет выглядеть график зависимости при бесконкурентном ингибировании?

9. Как будет выглядеть график зависимости при полном неконкурентном ингибировании?

10. Как будет выглядеть график зависимости при полном конкурентном ингибировании?

3 Механизмы регуляция активности ферментов

3.1 Виды механизмов регуляции. Определение метаболизма. Понятие конститутивных и адаптивных ферментов

Метаболизм представляет собой совокупность всех обменных процессов в организме. Выделяют два основных направления метаболизма в живых системах:

- *анаболизм* – синтез веществ, требующий затрат энергии;
- *катаболизм или энергетический обмен* – распад веществ с выделением энергии в результате которого клетка обеспечивается макроэргами.

Эти процессы в живых системах идут параллельно и одновременно, регуляция метаболизма на всех уровнях организации от клетки до целого организма осуществляется белками ферментами.

В зависимости от регуляции направления метаболизма все ферменты можно разделить на 3 большие группы:

- 1) *анаболические* (регулируют процесс синтеза веществ);
- 2) *катаболические* (катализируют реакции энергетического обмена);
- 3) *амфоболические* (регулируют оба процесса).

Вывод: таким образом, регуляция метаболизма в организме сводится к регуляции деятельности ферментов.

Выделяют два основных механизма регуляции активности ферментов:

- 1) *экстенсивный* (медленный), осуществляется за счет регуляции скорости синтеза ферментов и идет медленно, т.к. для синтеза необходимы часы;
- 2) *интенсивный* (быстрый) – регуляция активности уже готовых ферментов, присутствующих в клетке.

Первый экстенсивный механизм. Скорость реакции в клетке определяется количеством фермента: чем выше концентрация фермента, тем выше скорость реакции. Увеличение скорости синтеза фермента и регулирует скорость реакции.

Уменьшение скорости реакции происходит за счет гидролиза фермента – уменьшения его количества в клетке.

Скорость синтеза белков – ферментов зависит от условий в клетке. Существуют белки – ферменты, которые всегда присутствуют в клетке в определенном количестве - *конститутивные белки-ферменты*.

Другие проявляются при определенных условиях в ответ на проявление определенного субстрата – *адаптивные белки-ферменты*.

3.1.1 Классификация механизмов регуляции активности ферментов по интенсивному пути

Второй, более быстрый интенсивный путь активации, направленный на регуляцию активности уже готовых ферментов, представлен следующими механизмами:

1) *с ковалентной модификацией:*

- *необратимая ковалентная модификация* – ограниченный протеолиз;
- *обратимая ковалентная модификация* – регуляция ковалентным связыванием – прямое воздействие на активный центр фермента с помощью ингибитора или активатора;

2) *без ковалентной модификации* – без прямого воздействия на активный центр фермента:

- *конформационный (аллостерический) механизм:*
- *диссоциативный механизм (олигомеризация фермента);*
- *адсорбционный механизм (за счет связывания ферментов с мембранными структурами клетки).*

3.1.2 Понятие активаторов и ингибиторов

На скорость химической реакции влияют различные вещества: *активаторы и ингибиторы*. Они носят общее название – *эффекторы*.

Активаторы ферментов – это вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции. Чаще всего в качестве активаторов выступают ионы металлов, такие, как железо, медь, кобальт, магний и др. Следует различать металлы, находящиеся в составе металлоферментов, так называемые кофакторы, и выступающие в качестве активаторов ферментов. Кофакторы могут прочно связываться с белковой частью фермента, что же касается активаторов, то они легко отделяются от апофермента. Кофакторы являются обязательными участниками каталитического акта; в их отсутствие фермент неактивен. *Активаторы* усиливают каталитическое действие, но их отсутствие не препятствует протеканию ферментативной реакции. Как правило, металл – кофактор взаимодействует с отрицательно заряженными группировками субстрата. Металл с переменной валентностью принимает участие в обмене электронов между субстратом и ферментом.

Металлы – активаторы принимают участие в образовании стабильной переходной конформации фермента, что способствует более быстрому образованию фермент-субстратного комплекса. Например, ионы магния стабилизируют ферменты нуклеинового обмена, а ионы кальция – альфа-амилазу.

Скорость ферментативных реакций может быть частично снижена или полностью заблокирована определенными веществами, так называемыми *ингибиторами* ферментов. Некоторые ингибиторы ферментов являются для организма животных и человека эффективными лекарственными веществами, другие – смертельными ядами.

По характеру действия *ингибиторы* разделяют на *необратимые и обратимые*.

При *необратимом ингибировании* – фермент полностью теряет свою активность.

Обратимые ингибиторы взаимодействуют с ферментом без образования ковалентной связи. После инкубации с обратимым ингибитором активность фермента восстанавливается при удалении свободного ингибитора путем диализа.

Характерная для соответствующей системы степень ингибирования достигается в общем случае относительно быстро и далее не зависит от времени, что указывает на наличие равновесия при образовании комплекса ингибитора (I) с ферментом (E): $E + I \leftrightarrow EI$.

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов: *конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное*.

Конкурентным называют *ингибитор*, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по строению обычно сходны с субстратом; они конкурируют с ним за связывание с ферментом и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Характерная черта конкурентного ингибирования состоит в том, что эффективность ингибирования зависит от соотношения концентраций субстрата и ингибитора (а не от абсолютной концентрации ингибитора). Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается.

При взаимодействии фермента с *конкурентным ингибитором* изменяется значение K_m соответствующей ферментативной реакции.

Сходство субстрата и конкурентного ингибитора достаточно для взаимодействия и образования фермент-ингибиторного комплекса, но недостаточно для ферментативной реакции.

Многие лекарственные вещества ингибируют ферменты человека и животных по конкурентному типу.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются, и, как правило, не имеют сходства с субстратом. Эффективность неконкурентного ингибирования определяется концентрацией ингибитора и не зависит от соотношения концентраций ингибитора

и субстрата. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра. При взаимодействии фермента с неконкурентным ингибитором изменяется V_{\max} ферментативной реакции. Они могут обратимо связываться как со свободным ферментом, так и с ES-комплексом и не конкурируют с субстратом, т. е. не вытесняют его из комплекса с ферментом.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент - субстратного комплекса, препятствуя его распаду.

Активность многих ферментов тормозится избытком субстрата, причем имеется несколько механизмов этого процесса.

Если в образовании фермент – субстратного комплекса участвует несколько функциональных групп фермента, то возможно одновременное присоединение к активному центру двух или более субстратов, что однозначно приведет к образованию неактивного комплекса.

В случае избытка субстрата возможно его присоединение не только к активному центру, но и к другим химическим группировкам, функционально связанным с активным центром. Такого рода взаимодействие может помешать ферментативной реакции.

3.1.3 Необратимая ковалентная модификация, ограниченный протеолиз

Относится к интенсивному механизму регуляции. В организме человека и млекопитающих регулирует активность ферментов свертывания крови - регуляция *ограниченным протеолизом*. Осуществляется механизм в 3 этапа:



где, E – протеолитический фермент:

S – субстрат, ES фермент – субстратный комплекс;

R – продукт реакции.

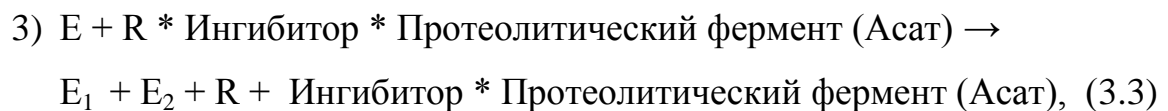
Если реакция идет в прямом направлении с образованием R, то тогда продукт реакции R соединяется с ингибитором протеолитического фермента. В живом организме так осуществляется регуляция активности внутриклеточных протеолитических фермент - ферментов Асат или Алат.



где *Ингибитор*Алат* – неактивная форма фермента;

*R*Ингибитор*Алат* - тройной комплекс.

В ходе второй стадии механизма образуется тройной комплекс - *R*Ингибитор*Асат*: продукт, ингибитор, протеолитический фермент. Комплекс является активным в отношении фермента E - (например, Асат) и вызывает его распад – протеолиз до неактивных фрагментов E₁ и E₂. Причем, протеолитический фермент (Асат) наиболее чувствителен действию тройного комплекса:



где комплекс *Ингибитор*Протеолитический фермент Асат* – неактивная форма фермента,

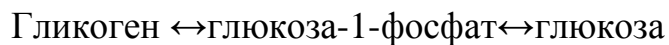
E₁ и E₂ – неактивные фрагменты фермента Асат после протеолиза.

Если уменьшается концентрация продукта, то прекращает образовываться тройной комплекс. Следовательно, протеолитический фермент (Асат) прекращает разрушаться, фермент становится активным и вновь идет прямая ХФР (1 стадия).

3.1.4 Обратимая ковалентная модификация, регуляция ковалентным связыванием

Модификация активности фермента может заключаться в его ингибировании за счет образования ковалентных связей между ферментом и другим низкомолекулярным веществом, происходящим в клетке по принципу *обратимого конкурентного ингибирования*. У эукариот самым распространенным механизмом регуляции являются реакции фосфорилирования ферментов.

Пример: синтез и распад гликогена в клетках печени и в мышцах.



Процесс синтеза и распада регулируется ферментами: гликогенфосфорилаза (А и В) – катализирует реакцию распада гликогена до глюкозы и гликогенсинтетаза (А и В) – катализирует реакцию синтеза гликогена.

Для гликогенфосфорилазы (ГФ), веществом регулятором выступает цАМФ. Поэтому ГФА – это активная форма фермента, образованная присоединением с помощью ковалентной связи циклического АМФ. ГФВ – неактивная форма гликогенфосфорилазы.

Если в клетке есть циклический АМФ, ГФА активируется за счет реакции фосфорилирования и присоединения фосфатной группы – начинается реакция распада гликогена до глюкоза-1-фосфат и глюкозы. Если цАМФ мало, то ГФ не фосфорилируется и фермент становится не активным – реакция распада гликогена до глюкозы приостанавливается.

Для гликогенсинтетазы таким веществом – регулятором является глюкоза-6-фосфат.

Принцип ковалентного связывания: к участку фермента присоединяется молекула низкомолекулярного вещества с образованием ковалентной связи. При этом фермент снижает свою активность.

В живых системах ковалентная модификация также представлена реакциями аденилирования, уридилирования. При этом нуклеотиды связываются с ферментами ковалентными связями и регулируют скорость азотистого обмена. Активность фермента будет зависеть от количества азота в клетке.

3.1.5 Механизмы регуляции активности ферментов в без ковалентной модификации

3.1.5.1 Аллостерический механизм: происходит за счет конформационных изменений фермента.

Аллостерический механизм – это механизм, при котором контроль активности ферментов реализуется путем изменения его конформации.

Изменение конформации происходит за счет присоединения метаболита – регулятора к аллостерическому центру фермента, пространственно удаленному от активного центра.

Изменение конформации фермента ведет к изменению его каталитической активности за счет изменения структуры активного центра: либо он активируется, либо он ингибируется.

Метаболит – регулятор, модифицирующий активность активного центра, называемый *аллостерическим регулятором*.

Олигомерная молекула фермента, состоящая из нескольких субъединиц может содержать несколько активных и аллостерических центров, каждый из которых, чувствителен к определенным эффекторам. В таком олигомере возможно два варианта взаимодействия между центрами:

1. Ал.Ц \rightarrow АЦ₁ и АЦ₂
2. АлЦ₁ \rightarrow АЦ₁; АлЦ₂ \rightarrow АЦ₂.

Первый тип взаимодействия между активным центром фермента и субстратом называется *кооперативным*. Кривая зависимости скорости химической реакции от концентрации субстрата для аллостерических ферментов, регулируемых по кооперативному механизму приобретает сигмоидальную форму.

Аллостерический механизм регуляции активности ферментов делится на 2 вида:

- 1) *согласованный аллостерический механизм* (разработали Шанже, Моно, Уайман);
- 2) *последовательный аллостерический механизм* (разработал Кошланд).

3.1.5.2 *Согласованный аллостерический механизм.* Фермент существует в двух формах (рисунок 3.1). Если фермент состоит из двух R субъединиц – R - форма, если из T субъединиц – T - форма. Фермент может существовать в двух формах: RR и TT.

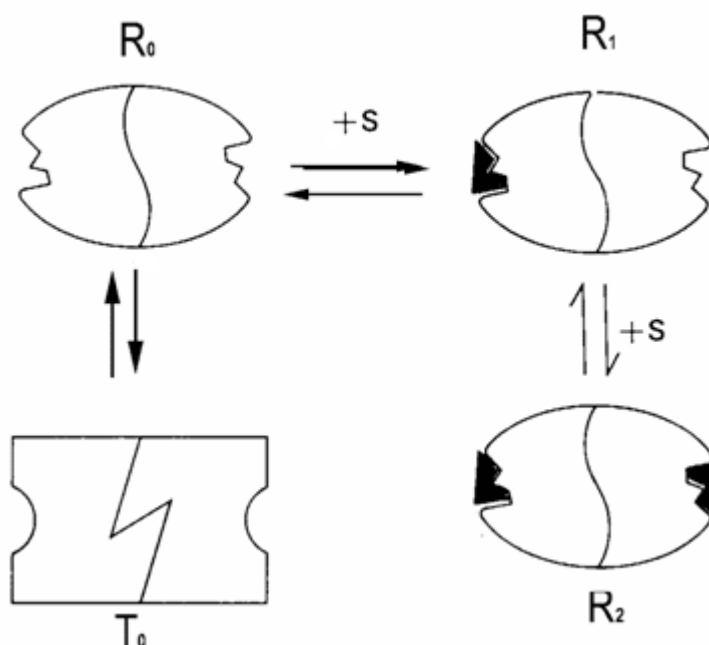


Рисунок 3.1 – R и T формы фермента

Присоединение субстрата ведет к изменению конформации одной субъединицы. При присоединение еще одной молекулы субстрата изменяется конформация другой субъединицы – т. е. согласованный механизм.

3.1.5.3 *Последовательный аллостерический механизм.* Связывание субстрата изменяет конформацию той субъединицы, к которой присоединяется субстрат, переводя ее из неактивной в активную форму. Конформация другой субъединицы при этом не меняется.

Конформационные изменения, вызванные субстратом на одной субъединице могут повысить, либо понизить сродство к субстрату другой субъединицы.

Аллостерическое взаимодействие между ферментом и лигандом может быть двух видов:

1) *гомotropное* (взаимодействие субъединиц фермента с идентичными лигандами);

2) *гетеротропное* (взаимодействие субъединиц фермента с различными лигандами).

При согласованном механизме аллостерических взаимодействий гомотропные эффекты всегда положительны и кооперативны, а гетеротропные могут быть и положительными, и отрицательными.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Какие существуют виды механизмов регуляции активности ферментов?
2. Дайте определение метаболизма.
3. Какие существуют основные направления метаболизма?
4. Дайте понятие конститутивных и адаптивных ферментов.
5. Дайте классификация механизмов регуляции активности ферментов по интенсивному пути.
6. Опишите механизмы регуляции активности ферментов по экстенсивному пути.
7. Дайте понятие эффекторов, активаторов и ингибиторов.
8. В чем состоит механизм необратимой ковалентной модификации.
9. Какие существуют стадии в ограниченном протеолизе?
10. Какие механизмы относятся к регуляции ковалентным связыванием?

3.2 Ассоциативный механизм регуляции активности ферментов

К *олигомерам* относят ферменты, состоящие из двух или нескольких субъединиц. Эти ферменты представляют собой переход в новую *мультимерную структуру*, которая называется *четвертичная структура белка - фермента*. Если олигомер состоит из одинаковых субъединиц - *гомогенный олигомер*, из разных - *гетерогенный*. Отдельные субъединицы – *протомеры*.

Мультимерная структура, содержащая три и более субъединицы, называется *химерой*. При образовании четвертичной структуры меняется молекулярная масса белка - фермента, и главное - его функциональные свойства. В живом организме один и тот же фермент может быть представлен в разных формах.

Каждая из форм будет обладать разной ферментативной активностью. В одних условиях фермент больше склонен к образованию ассоциатов (тетрамеров, димеров и т.д.). В других условиях существует в форме мономеров. Для каждого фермента активность мономерных и олигомерных форм разная. Для одних ферментов активны тетрамеры, а для других димеры.

В том случае, если активна ассоциативная форма фермента, то значит активный центр фермента образовался на месте контакта субъединиц. Если активный центр расположен в одной субъединице, то активна только его мономерная форма.

3.2.1 Механизмы ассоциаций ферментов

Различаю два типа ассоциаций олигомерных ферментов:

- 1) ассоциации с образованием замкнутых олигомерных структур;
- 2) линейная ассоциация протомеров неограниченной длины.

1. *Ассоциации с образованием замкнутых олигомерных структур*: образуется при взаимодействии двух и более идентичных центров ассоциаций, расположенных на разных субъединицах. Димер имеет замкнутую форму, поэтому центры ассоциации закрыты. Такой механизм образования ассоциаций называется *изологическим*. Примером образования является фермент: гликоген фосфорилаза В. При этом димер - активная форма, тетрамер - неактивная. Происходит экранирование АЦ фермента. Расположенного в центре замкнутой ассоциации от субстрата.

2. *Линейная ассоциация протомеров неограниченной длины*: образуется при взаимодействии двух и более различных центров ассоциации. Примером может

служить фермент лизоцим: $M \rightleftharpoons M_2 \rightleftharpoons M_3 \rightleftharpoons M_4 \dots$. Активной является только одна форма фермента, которая имеет определенную молекулярную массу.

С практической точки зрения определить присутствие в клетке различных форм олигомерных ферментов возможно с помощью констант ассоциации.

3.2.2 Зависимость активности фермента от его олигомерной ассоциации

Характер распределения ферментативной активности между различными формами ассоциаций ферментов показывает, что удельная активность ассоциативных ферментов зависит от концентрации ферментов.

Зависимость может быть:

- 1) *линейной*
- 2) *нелинейной.*

Нелинейная зависимость:

1. *Прямо пропорциональная.* Чем выше концентрация, тем выше удельная скорость реакции. Характерен для ферментов, у которых АЦ образуется в месте контакта субъединиц, т.е. активной формой является ассоциативная форма.

Например, фермент НАДзависимая изоцитратдегидрогеназа.

2. *Обратно пропорциональная.* Чем выше концентрация фермента, тем ниже удельная активность фермента, тем ниже скорость реакции. При образовании ассоциативной формы, АЦ становится недоступным для субстрата, т.е. олигомерная форма будет неактивна.

Нелинейная зависимость. Для некоторых ферментов активными являются только определенные ассоциативные формы фермента оптимального размера.

Например, фермент фосфофруктокиназа существует в виде мономера, димера, тетрамера и т.д.: $M \rightleftharpoons M_2 \rightleftharpoons M_4$ и т.д.. При этом M_2 -единственно активная форма. Олигомеризация этого фермента идет по пути образования ассоциаций неограниченной длины. Химер неактивный.

3.2.3 Регуляция активности олигомерных ферментов специфическими лигандами

Состояние равновесия между различными формами олигомерных ферментов может регулироваться специальными лигандами - это субстрат или аллостерический эффектор (активатор или ингибитор):

1) осуществляется за счет специфических аллостерических лигандов, которые выступают в качестве либо активатора, либо ингибитора и ковалентно связываются с аллостерическим центром фермента. Это приводит к конформационным изменениям структуры субъединицы, следовательно, к изменениям структуры центров ассоциаций, которые отвечают за белок - белковые взаимодействия.

Например, для глюкоуронилтрансферазы В димер неактивен, а тетрамер активен;

2) центры связывания олигомерного фермента совпадают с активным центром фермента, и тогда, при образовании олигомерной формы, активный центр будет закрыт от субстрата. В живом организме переход от одной формы к другой является обратимым.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

- 1 Какие ферменты называются олигомерными?
- 2 Какие особенности структуры олигомерных ферментов?
- 3 В чем состоит механизм гетерологической ассоциации ферментов?
- 4 Какая существует зависимость активации фермента от его олигомерной ассоциации?
- 5 Как осуществляется регуляция активности олигомерных ферментов специфическими лигандами?
- 6 Какой механизм образования ассоциаций называется изоологическим?

3.3 Адсорбционный механизм регуляции активности ферментов

3.3.1 Физиологическое значение адсорбции ферментов на субклеточных структурах

Ферменты могут обратимо связываться с такими субклеточными структурами, как мембранах клеток и органелл (митохондрией, лизосом, рибосом, включений, на цитоскелете, на миофибриллах).

Физиологическая роль такого связывания:

1) обратимая адсорбция фермента приводит к изменению его каталитических и регуляторных свойств, т.е. является фактором, регулирующим активность фермента;

2) адсорбция фермента на мембране обеспечивает *компартаментализацию* метаболитов на мембране. Это состояние в котором метаболический процесс протекает изолированно, без выхода *интермедиантов* (участников ХФР: фермента, субстрата, продукта реакции, эффектора и т.д.) в окружающий объем;

3) адсорбированные ферменты могут образовывать *метабоны* - *мультиферментные структуры*, которые регулируют крупные метаболические процессы;

4) ферменты могут адсорбироваться на порах мембран и участвовать в активном транспорте метаболитов через мембрану;

5) адсорбированные формы ферментов более стабильны, чем свободные формы ферментов. Таким образом, адсорбция может служить фактором, снижающим скорость распада ферментов в клетке.

3.3.2 Адсорбционный механизм регуляции

Основные признаки существования адсорбционного механизма:

1) существование обратимого равновесия между свободной формой фермента и адсорбированным ферментом;

2) изменение каталитических характеристик фермента при адсорбции;

График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата представлен на рисунке 3.2.

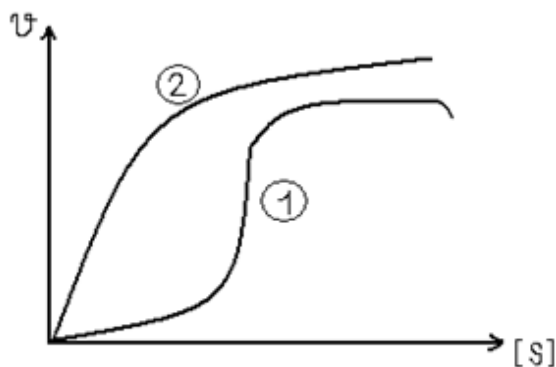


Рисунок 3.2 – Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата: 1) свободная форма фермента; 2) адсорбированная форма фермента.

Чем больше содержание фермента во второй адсорбированной форме, тем больше будет нарастать скорость ХФР: (1) график имеет сигмоидальную форму, из чего следует наличие кооперативного эффекта по субстрату и низкой активности фермента. Из графика видно, что адсорбированная форма (2) является активной.

3) чувствительность подвижного равновесия между свободной и связанной формами фермента к присутствию клеточных метаболитов -регуляторов. Их называют еще эффекторами (ингибиторы и активаторы):

Рассмотрим адсорбционный механизм на примере 6-осфофруктокиназы. Фермент существует в двух формах: свободной и адсорбированной на мембране эритроцитов человека. Между этими формами существует равновесие. Метаболитом – эффектором является АТФ, высокие концентрации которого являются ингибиторами. Активность фермента изменяется при адсорбции на мембране человека. Переход фермента в адсорбированное состояние сопровождается исчезновением кинетической кооперативности по субстрату – фруктозо – 6 - фосфату.

Для данного фермента присутствуют все три признака наличия адсорбционного механизма регуляции активности фермента, а именно:

1) переход свободной формы в связанную осуществляется на мембране эритроцита;

2) происходит исчезновение эффекта кооперативности по субстрату для связанной формы фермента, что подтверждает изменение его каталитических свойств;

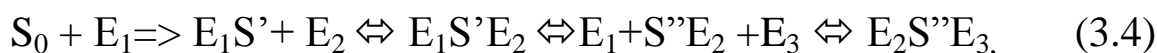
3) в присутствии АТФ адсорбированная форма фермента становится менее чувствительной к ингибитору по сравнению со свободной формой, т.е. начинает проявлять свою активность.

Пример 2: фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) может быть в двух формах: свободной и связанной. Субстратом является NADH, повышение концентрации которого, способствует переходу ЛДГ в свободную активную форму.

3.3.3 Эстафетная модель работы фермента

Адсорбционный механизм регуляции активности фермента обеспечивает *компартиментализацию* метаболитов у поверхности субклеточных структур, на которых фермент адсорбируется.

Рассмотри эстафетную модель работы ферментов гидролиза при которой осуществляется данный механизм работы ферментов:



где S_0 – начальная форма субстрата;

E_1 – первый фермент;

E_2 – второй фермент;

E_3 – третий фермент;

E_1S' – адсорбированная форма первого фермента с субстратом.

1) прямая передача интермедианта из активного центра одного фермента в активный центр другого;

2) обратимая адсорбция фермента на субклеточных структурах;

а) первый фермент E_1 освобождается от интермедианта и адсорбируется на поверхности и переходит в неактивную форму;

б) второй фермент E_2 со своим продуктом высвобождается в объем, приобретая активные свойства.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1 Какое физиологическое значение имеет адсорбция ферментов на субклеточных структурах?

2 Что такое интермедианты?

3 Что такое компартментализация метаболитов?

4 В чем состоит адсорбционный механизм регуляции ферментативной активности?

5 Какие существуют признаки адсорбционного механизма регуляции активности ферментов?

6 Приведите примеры такой регуляции?

7 Что такое эстафетная модель работы ферментов?

8 Как осуществляется такой механизм?

9 Приведите примеры эстафетной модели

3.4 Факторы, влияющие на ферментативную активность. Влияние pH и температуры на кинетику ферментативных реакций

3.4.1 Факторы, влияющие на ферментативную активность

На каталитическую активность ферментов влияют многие факторы, которые могут изменять строение или химическую природу ферментов. К числу таких факторов относятся:

- 1) pH;
- 2) температура;
- 3) силы, действующие в текучих средах (гидродинамические силы, гидростатическое давление и поверхностное натяжение);
- 4) химические агенты (спирт, мочевины или пероксид водорода);
- 5) облучение (свет, звук, ионизирующая радиация).

Иногда снижение каталитической активности, вызванное, например, изменением pH, обратимо. В таких случаях возврат к первоначальным условиям сопровождается восстановлением активности фермента. В известном смысле такая ситуация аналогична рассмотренному случаю обратимого ингибирования. Небольшие изменения одного из перечисленных выше факторов, только слегка сдвигают равновесие (или квазистационарное состояние), характерное для данной ферментативной реакции. В общем случае отклонение от условий, типичных для биологического окружения нативного фермента, должно быть относительно небольшим (или кратковременным). В противном случае возрастает вероятность инактивации фермента.

3.4.2 Обратимое влияние температуры на каталитическую активность фермента

Граница между "обратимой" и "необратимой" инактивацией белков не всегда четко определена. Например, подвергнутый кратковременному нагреванию фермент

при охлаждении до свойственной ему "рабочей" температуры может полностью восстановить свою активность. С другой стороны, более продолжительное нагревание при той же температуре или столь же кратковременная термообработка при более высокой температуре могут привести к тому, что при последующем охлаждении активность фермента восстановится лишь частично. Такое поведение белков - ферментов становится понятным, если учесть связь между их строением и функцией, влияние молекулярной динамики на функцию белка и возможность разрыва некоторых слабых связей в нативной структуре фермента при изменении условий среды.

При высокой температуре, когда начинает доминировать процесс термической инактивации фермента, нарушаются зависимости скорости реакции от температуры.

Так ферментативные реакции имеют колоколообразную зависимость скорости реакции от температуры, что объясняется наложением двух эффектов - возрастанием скорости реакции при увеличении температуры и ускорением тепловой денатурации белковой молекулы, приводящей к инактивации фермента при высоких температурах. Денатурация большинства белков начинается в диапазоне температур от 45° С до 50° С и завершается очень быстро при 55° С.

3.4.3 Влияние рН на кинетику ферментативных реакций в растворах

Ферменты, как и все белки, состоят из аминокислот. В зависимости от рН радикалы некоторых аминокислот, а значит, и белок в целом могут приобретать заряд. Заряженные группы часто входят в состав активных центров ферментов, так как в основе целого ряда механизмов ферментативного катализа лежит катализ кислотного или основного типа. Необходимым условием для осуществления кислотного или основного катализа может быть наличие определенного заряда на ионизируемых группах активного центра. Отсюда следует, что каталитически активная форма фермента существует только в одном строго определенном состоянии ионизации, и в зависимости от рН в нее может превращаться большая или меньшая часть всего имеющегося в смеси фермента (рисунок 3.3).

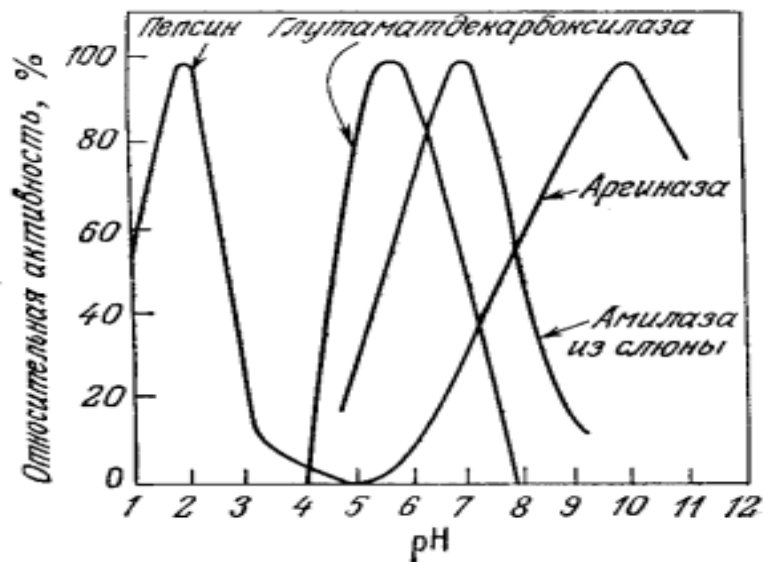


Рисунок 3.3 – Зависимость активности ферментов от pH

При значениях pH, значительно отличающихся от оптимальных, происходит нарушение сил, стабилизирующих конформацию нативного белка - фермента, что может привести к его *денатурации* – утрате третичной конформации, и соответственно потери каталитической активности. В этом случае даже после восстановления оптимального pH *ренатурация* фермента становится маловероятной.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Какие факторы влияют на ферментативную активность?
2. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций в растворах.
3. Как изменяется скорость ХФР при изменении температуры?
4. Какие процессы происходят при денатурации в структуре фермента?
5. Что такое ренатурация?

4 Пептидный синтез и химическая модификация белков и пептидов

4.1 История и значение пептидного синтеза

Пептидный синтез – это построение пептидной цепи, путем соединения аминокислот, с помощью химических методов. По своей структуре, вновь синтезированный пептид состоит из 40-60 аминокислотных остатков.

Первый синтетический пептид был проведен в 1882 году Курциусом, который синтезировал дипептид N – бензоилглицил – глицин. Исторически «отцом» пептидного синтеза считают Э. Фишера, который в 1901 году получил глицил – глицин и являлся автором хлорангидридного метода синтеза. Эра химического синтеза пептидов началась с 1953 года, когда Дю Винью, синтезировал пептидные гормоны: вазопрессин и окситоцин. Далее, в 1965 году был синтезирован инсулин (Х. Цан; П. Катсояннис; Кунг), а в 1963 году – синтезирован тридцати девяти членный гормон кортикотропин (Швицер, Зибер).

Синтез пептидов используется для:

- 1) структурно - функциональных исследований (изучают структуру белков и пептидов);
- 2) получения аналогов природных пептидов с биологической активностью;
- 3) получения пептидов с заданными свойствами;
- 4) получения синтетических антигенов, для создания вакцин и диагностикумов;
- 5) создания лекарственных препаратов для медицины и ветеринарии.

4.2 Методы определения первичной структуры белка

Биологическая роль белков напрямую зависит от его первичной структуры, которая определяет:

- 1) его вторичную и третичную структуру;
- 2) расположение функциональных групп;
- 3) структуру активного центра фермента;
- 4) функциональные особенности.

В ходе анализа первичной структуры белка изучают:

- 1) таксономические взаимоотношения между различными видами животных;
- 2) биологическую эволюцию видов;
- 3) изучение «мутантных» белков, позволяющих выявить причины наследственных заболеваний человека и животных.

4.2.1 Этапы определения первичной структуры белка

Основными методами изучения первичной структуры белка являются:

- 1) непосредственный анализ АК последовательности в структуре белка;
- 2) расшифровка последовательности нуклеотидов соответствующих генов (метод генетического кода).

Наиболее надежным является сочетание двух этих методов. Схема анализа первичной структуры белка представлена на рисунке 4. 1.

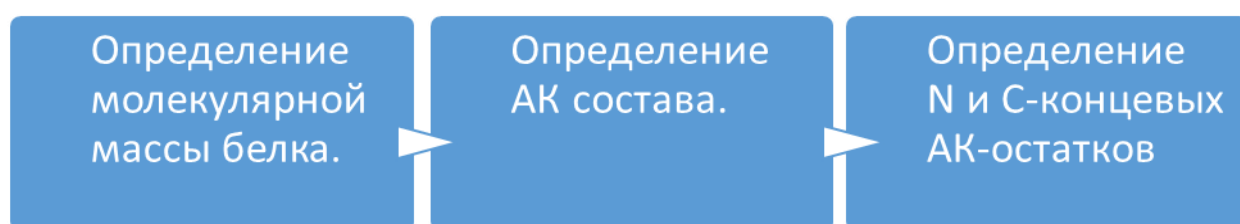


Рисунок 4.1 – Схема анализа первичной структуры белка

Этапы определения первичной структуры белка следующие:

- 1) полипептидная цепь подвергается специфическому расщеплению до полипептидов (за счет химических реагентов);
- 2) смесь полипептидов разделяют;
- 3) определение АК-состава и АК-последовательности (структуры) каждого из

оставшихся полипептидов отдельно;

4) установление порядка расположения пептидных фрагментов в исходной полипептидной цепи (для этого белок подвергают расщеплению при помощи другого агента и получают второй, отличный от первого набор пептидных фрагментов);

5) анализ структуры второго набора полипептидных фрагментов;

6) установление первичной структуры белка;

7) определение положения дисульфидных мостиков, если они имеются.

4.2.2 Методы определения аминокислотного состава белка

Анализ аминокислотного состава включает полный кислотный гидролиз исследуемого белка или пептида с помощью HCl (соляной кислоты) и количественное определение всех аминокислот в гидролизате.

Условия гидролиза:

1) гидролиз образца проводят в запаянных ампулах;

2) вакуум;

3) температура – 110°C;

4) время – 24 часа.

В результате такого гидролиза:

- полностью разрушается триптофан;

- частично разрушаются серин, треонин, цистиин, цистин;

- глутамин превращается в глутаминовую кислоту;

- аспаргин в аспарагиновую кислоту;

- сохраняются пептидные связи между АК с разветвленной белковой цепью:

(Val; Ile; Leu). То есть стабильны связи: Val-Val, Val-Ile, Ile-Ile, Leu-Val, Leu-Leu.

С целью надежного определения аминокислотного состава проводится параллельный гидролиз в течении 24, 48, 72 и 96 часов и все пробы количественно анализируются. Для анализа содержания в белках триптофана вместо соляной кислоты используется метансульфо кислота.

На следующем этапе проводится количественное определение аминокислот в аминокислотном анализаторе (разработан в 1958 году С. Муром и У. Стейном).

В основе лежит метод ионообменной хроматографии на колонке, заполненной сульфированной смолой. Интенсивность окрашивания, освобождающегося аммиака с нингидрином, дает цветное окрашивание, характерное для каждой аминокислоты. В современном аминокислотном анализаторе надежно определяется 1 нмоль аминокислоты.

Флуорескамин и О-фталевый альдегид в реакциях с аминокислотами образуют флуоресцирующие соединения (рисунок 4.2). Этим методом можно регистрировать 10-50 нмоль АК.

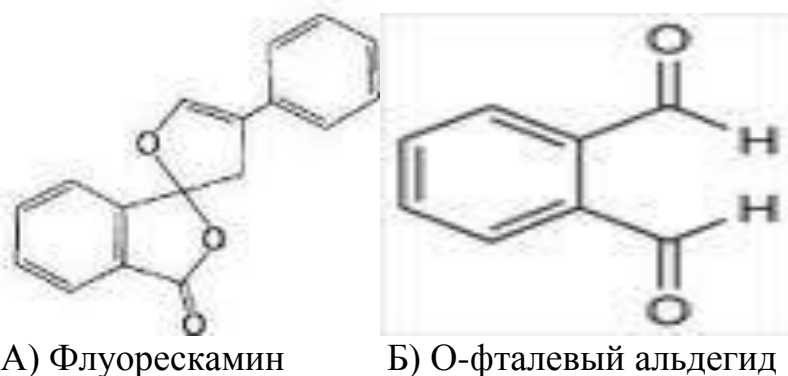


Рисунок 4.2 – Флуоресцирующие соединения

Эти соединения в реакциях с АК образуют флуоресцирующие соединения. Этим методом можно регистрировать 10 - 50 нмоль АК.

В полипептидной цепи с одной стороны расположены АК несущие аминогруппу, а с другой стороны С – концевые, несущие карбоксильную группу.

Анализ концевых остатков белка в определении последовательности АК в белке дает возможность оценить число полипептидных цепей после гидролиза белка. На втором этапе с помощью анализа N-концевых остатков АК осуществляется контроль за процессом разделения пептидных фрагментов.

4.2.3 Методы определения N-концевых АК

Динитрофенильный метод определения N-концевых АК, был предложен в 1945 году Фредериком Сенгером.

При реакции аминогруппы белка или АК с 2,4-динитрофторбензолом образуется динитрофенильное (ДНФ) производное окрашенное в желтый цвет, последующий кислотный гидролиз с HCl приводит к разрыву пептидной связи и образованию ДНФ-производной N-концевой АК. ДНФ-аминокислота экстрагируется эфиром, а идентифицируется методом тонкослойной хроматографии (рисунок 4.3).

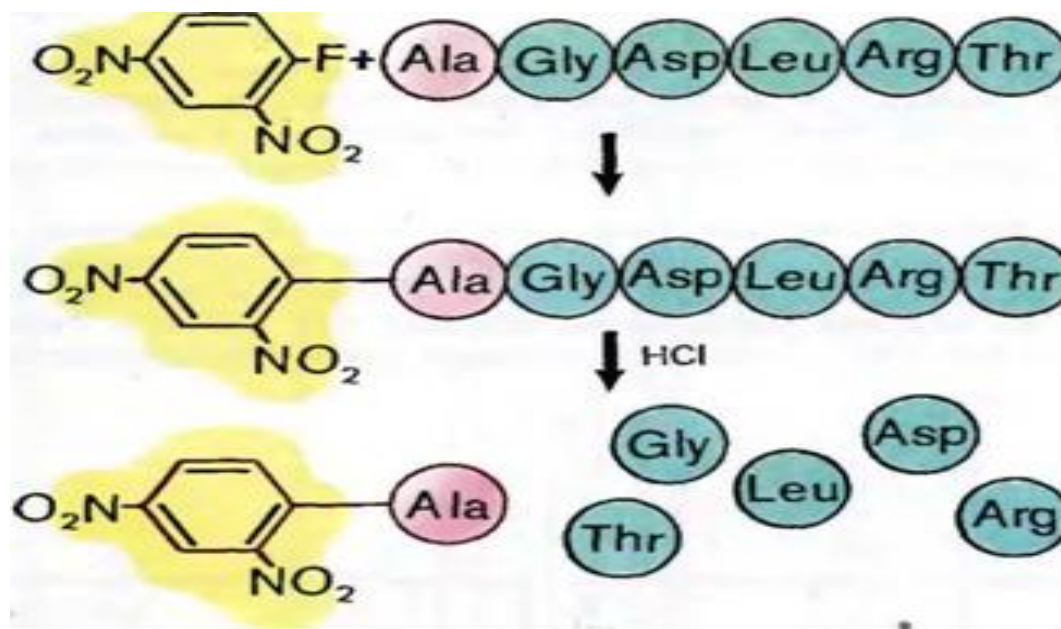


Рисунок 4.3 – Динитрофенильный метод определения N-концевых АК.

Дансильный метод определения N-концевых АК был предложен В. Греем и Б. Хартли. Метод основан на введении в аминогруппу белка или АК «метки», не удаляющейся при гидролизе. Используется реактив дансихлорид (1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид). ДНС – аминокислота обладает интенсивной флуорисценцией в спектре $\lambda=365\text{nm}$ для идентификации достаточно 0,1-0,5 нмоль вещества. Последующая идентификация ДНС – АК проводится следующими методами:

- 1) тонкослойной хроматографией;
- 2) жидкокristаллической хроматографией с использованием флуоресцентного детектора.

4.2.4 Определение С – концевой аминокислоты

Определение С-концевой АК проводится методом гидраинолиза (по С. Акабори), когда пептид или белок связывается с безводным гидразином при температуре от 100 до 200°C. При этом С-концевая АК остается в виде свободной АК и может быть выделена из смеси и идентифицирована:



Ограничение данного метода:

- 1) при гидролизе разрушаются аминокислоты: глутамин, аспаргин, цистеин, цистин;
- 2) гидразиды серина, треонина и глицина очень нестойки и легко превращаются в свободные АК.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Что позволяет изучать анализ первичной структуры белка?
2. Назовите этапы определения первичной структуры белка.
3. Какие существуют методы определения аминокислотного состава белка?
4. Какие существуют методы анализа N-концевых остатков АК?
5. Какие существуют методы анализа С-концевых остатков АК?

4.3 Методы фрагментации полипептидной цепи

Расщепление молекулы белка на полипептидные фрагменты – это первый этап в определении первичной структуры белка.

Существуют 2 метода расщепления белка:

1) химический – обладает высокой специфичностью, с низким выходом (50%), только до крупных полипептидов;

2) ферментативный - обладает относительной специфичностью, используется для широкого спектра белков, выход высокий (100%), в результате образуются и крупные и мелкие пептиды.

4.3.1 Ферментативный гидролиз

Используется 2 большие группы ферментов:

1) с относительной субстратной специфичностью;

2) с абсолютной субстратной специфичностью.

С относительной субстратной специфичностью:

1) трипсин (бычий экскрет), активность pH=7-9, обладает относительной субстратной специфичностью в 2-х связях: -Lys- X- и -Arg- X- .

Гидролиз будет происходить по остаткам лизина и аргинина.

2) альфахемотрипсин А – это фермент из группы сериновых протеаз, оптимум pH = 7,8-9. Действует на следующие виды пептидных связей:

- на группу ароматических аминокислот с высокой скоростью гидролиза (тирозин, триптофан и фенилаланин);

- группа аминокислот метионин, гистидин, лейцин с более низкой скоростью гидролиза.

2) протеиназа – источником фермента является *St. aureus* (золотистый стафилококк), фермент относится к сериновым протеиназам, pH = 4-7,8 и расщепляет следующие виды пептидной связи: - Glu-X- и - Asp- Leu.

Из группы ферментов с абсолютной субстратной специфичностью

используются:

- 1) лизин – специфическая протеиназа;
- 2) клострипоин (из клостридий) действует на пептидную связь, образованную аргинином.

4.3.2 Метод ограниченного протеолиза

Метод гидролиза белка, при котором гидролизу подвергается только ограниченное число пептидных связей, расположенных на поверхности белка называется *ограниченным протеолизом*.

Ограниченный протеолиз широко распространен в живых системах, например:

- 1) процесс активации зимогенов протеиназ желудочно-кишечного тракта;
- 2) активация протеиназ сыворотки крови.

Условия проведения ограниченного протеолиза:

- 1) сохранение нативной конформации белка;
- 2) подбор протеолитического фермента и условий гидролиза, при которых будут подвергаться гидролизу только наиболее доступные пептидные связи;
- 3) избегать денатурирующих агентов в процессе гидролиза.

На практике эти условия выполняются если гидролиз проводят тогда, когда снижают активность протеолитического фермента:

- 1) понижение температуры;
- 2) изменение pH;
- 3) наибольшее количество субстрата.

Схема ограниченного протеолиза представлена на рисунке 4.4

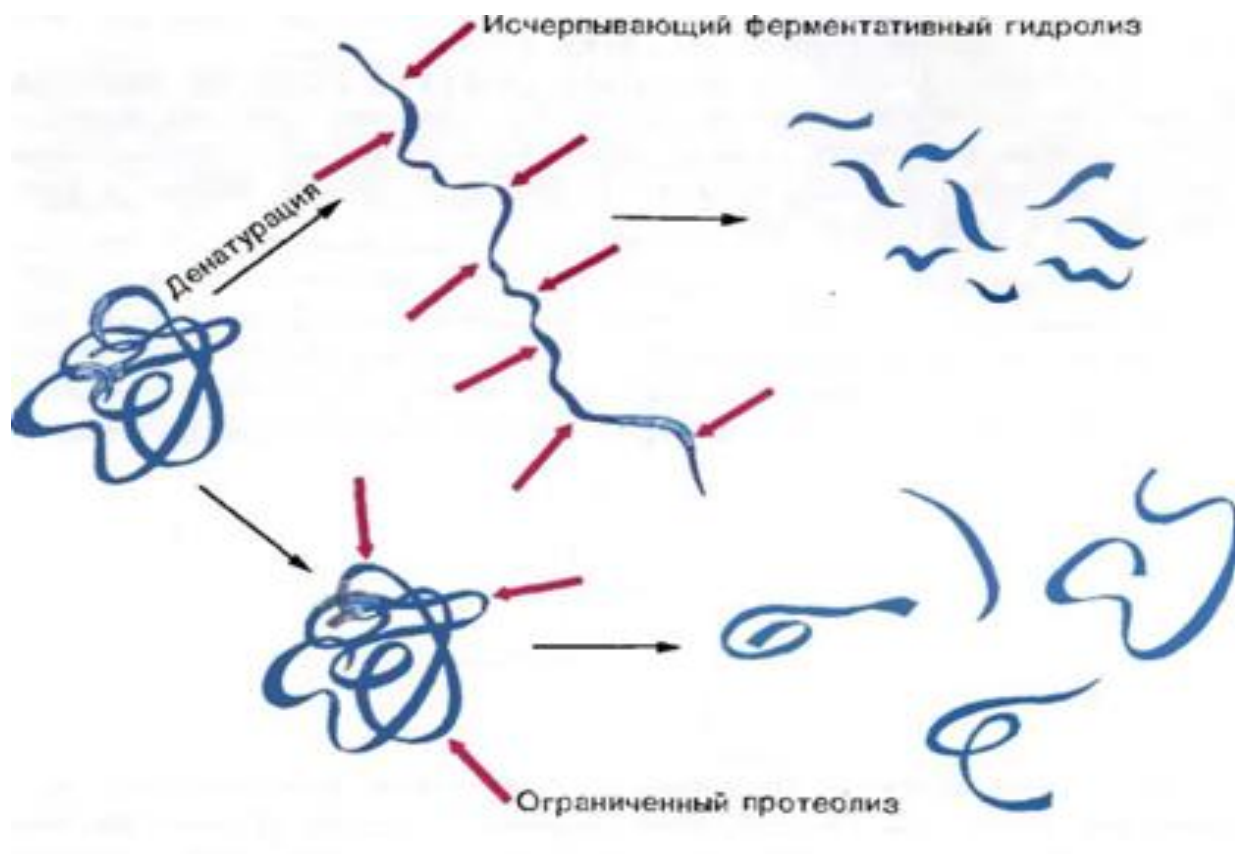


Рисунок 4.4 – Схема ограниченного протеолиза белка

Химические методы расщепления белка

Химические методы расщепления белка проводятся с использованием бромциана и бромсукцинимида и BNPS - скатола и ряда других химически активных веществ.

Расщепление бромцианом $Br-C=N$. Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в течение 15-30 часов в сильноокислой среде (чаще всего в 70%-ной муравьиной кислоте) при 100 – кратном избытке бромциана на каждый остаток метионина. В этих условиях связи, образованные остатками метионина, обычно расщепляются на 90-100%. Исключение составляют связи метионина с серином и треонином, расщепляющиеся лишь частично. В условиях обработки белка бромцианом может иметь место частичный гидролиз связи Asp - Pro, неустойчивой в кислой среде

Расщепление N-бромсукцинимидом действует по триптофану (рисунок 4.5).

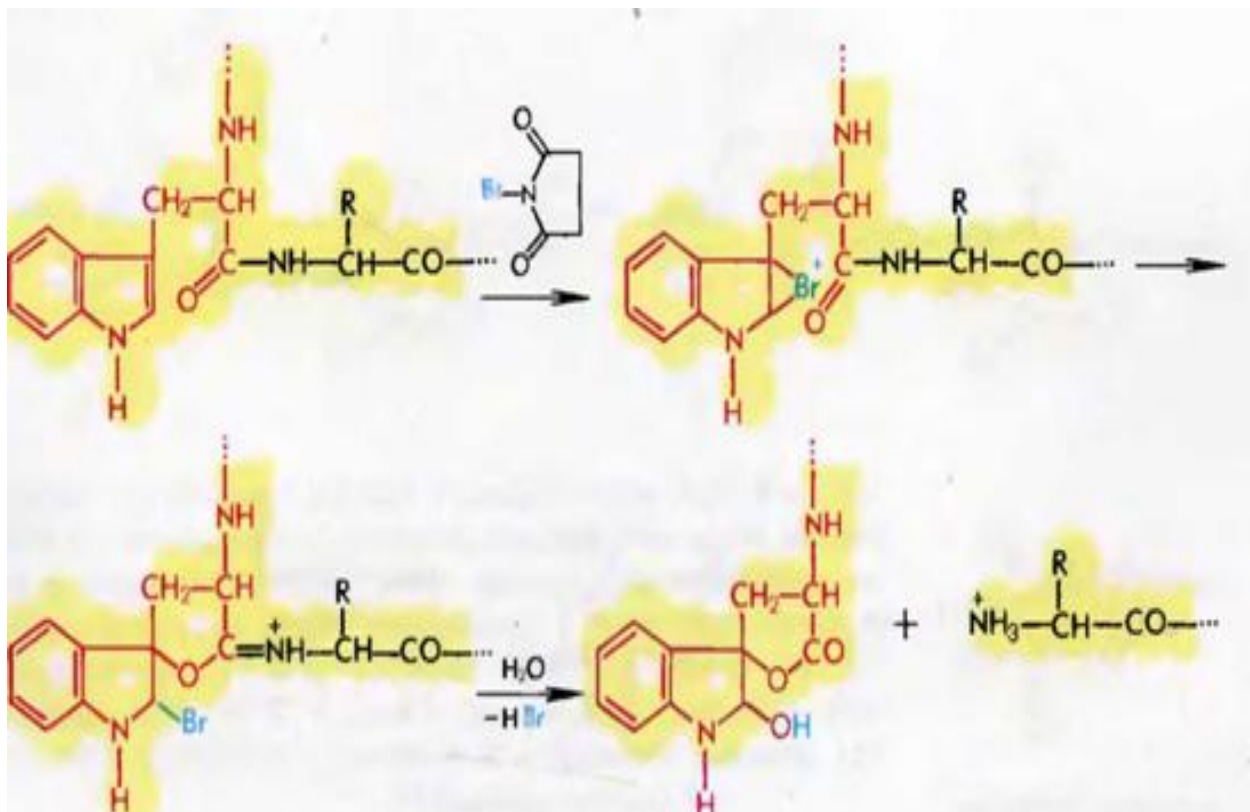


Рисунок 4.5 – Схема расщепление белка N-бромсукцинимидом

Расщепление BNPS – скатолом (2- (2-нитрофенилсуль-фенил) - 3-метил-3-броминдол). Температура - 37, рН-5,0; время - 24 часа, выход от 30 до 70%. Схема расщепление белка BNPS – скатолом представлена на рисунке 4.6.

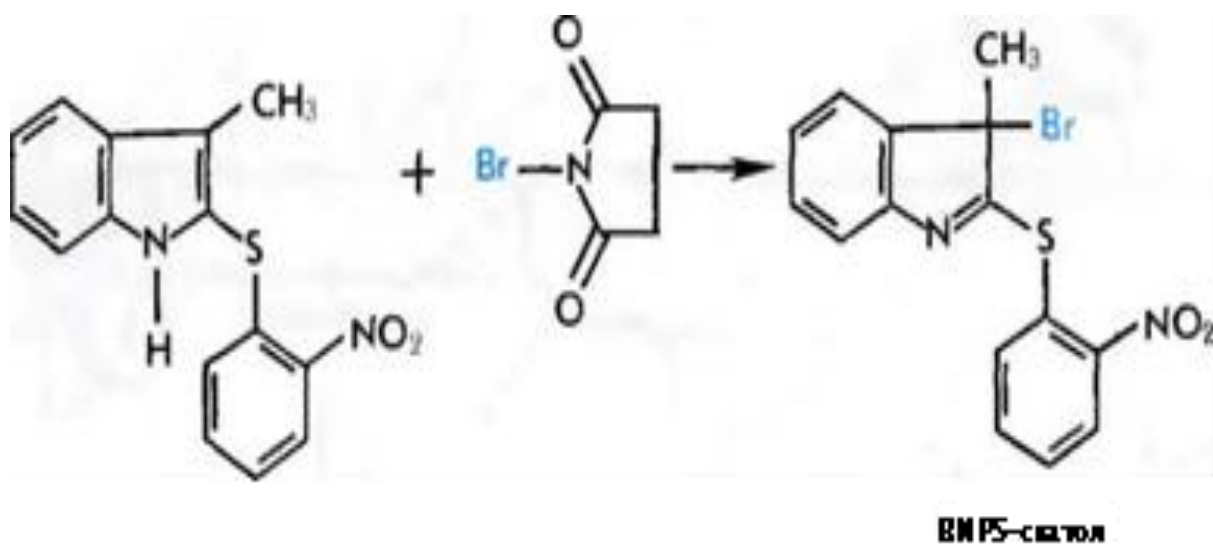


Рисунок 4.6 – Схема расщепление белка BNPS-скатолом

Q-йодобензойная кислота. Действует по остаткам триптофана, $t=20$, время-24

часа, выход-70%.

Гидроксиламин действует по связи аспарагиновой кислоты глицина рН=10,5 t=35-60, время – 24 часа, выход от 50 до 70%.

НТЦБ-2-нитро-5 цианатобензойная кислота, действует по остаткам цистеина. НТЦБ цианирует остаток цистеина, превращая его в остаток Р-тиоцианатоаланина, который в мягких условиях (рН 8,0-9,0; 37° С; 12-16 ч) циклизуется в 2-иминотиазолидинкарбоновую кислоту с разрывом пептидной связи. Расщепление полипептидной цепи по остаткам цистеина в указанных условиях специфично и обычно проходит с выходом от 80 до 90%.

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Какие две группы методов расщепления белка применяют на практике.
2. Назовите преимущества ферментативных методов гидролиза белка.
3. Назовите условия проведения ограниченного протеолиза.
4. Какие ферменты используются.
5. Какие преимущества и недостатки химических методов расщепления белка.
6. Назовите основные химические реагенты, используемые для химического расщепления белка.
7. Назовите условия расщепления белка с использованием бромциана.

4.4 Пептидный синтез

Пептидный синтез – это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов.

Обычно речь идет о получении пептидов, содержащих до 40-45 аминокислот, таким способом можно осуществить синтез и небольших белков и пептидов.

4.4.1 Классический пептидный синтез в раствор

Подразделяется на *ступенчатый синтез линейных пептидов*, осуществляется последовательным присоединением аминокислот от С - конца к N - концу цепи, и на *блочный синтез линейных пептидов*, когда построение цепи ведется из предварительно синтезированных фрагментов.

Основные методы пептидного синтеза:

1) *синтез пептидов на полимерном носителе*. При этом растущая полипептидная цепь ковалентно присоединена к нерастворимому или растворимому полимеру и отделение ее от полимера осуществляется на завершающей стадии синтеза.

2) использование нерастворимого носителя или *твердофазный синтез*, проводится в полностью автоматизированном варианте. Созданные для этих целей приборы получили название синтезаторов.

3) *жидкофазный синтез* на основе растворимых полимеров (см рисунок 4.7).



Рисунок 4.7 – Жидкофазный синтезатор CEM на основе растворимых полимеров.

4) Синтез гомо- и гетерополиаминокислот представляет собой синтез гомо- и гетерополиаминокислот, построенных из повторяющихся остатков одной – двух аминокислот путем полимеризации или сополимеризации производных аминокислот (N - карбоксиангидридов и т. п.).

4.4.2 Ферментативный пептидный синтез

Представляет собой синтез пептидов с помощью ферментов. Хотя идея такого синтеза весьма привлекательна и многие ферменты способны катализировать образование пептидной связи (реакции, обратной протеолизу), существенных результатов пока этим методом получить не удалось.

Пептидный синтез включает следующие последовательные стадии:

1 стадия. Блокирование (защита). На этой стадии необходимо защитить белок от участия в реакции функциональных групп АК и пептида.

2 стадия. Конденсация активированной карбоксильной группы одной АК или пептидного синтеза аминогруппы другой АК или пептида.

3 стадия. Удаление защитной группы для получения свободного пептида

(рисунок 4.8).

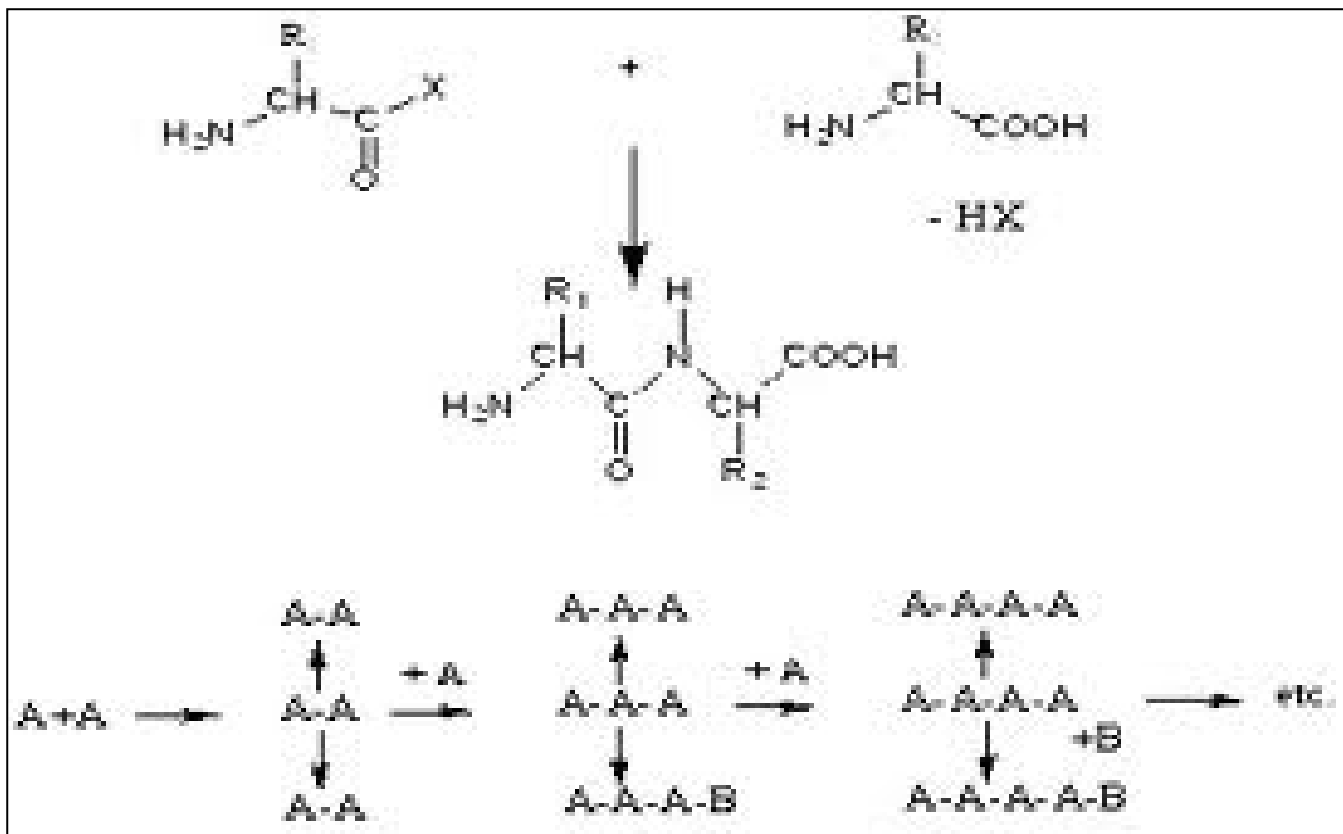
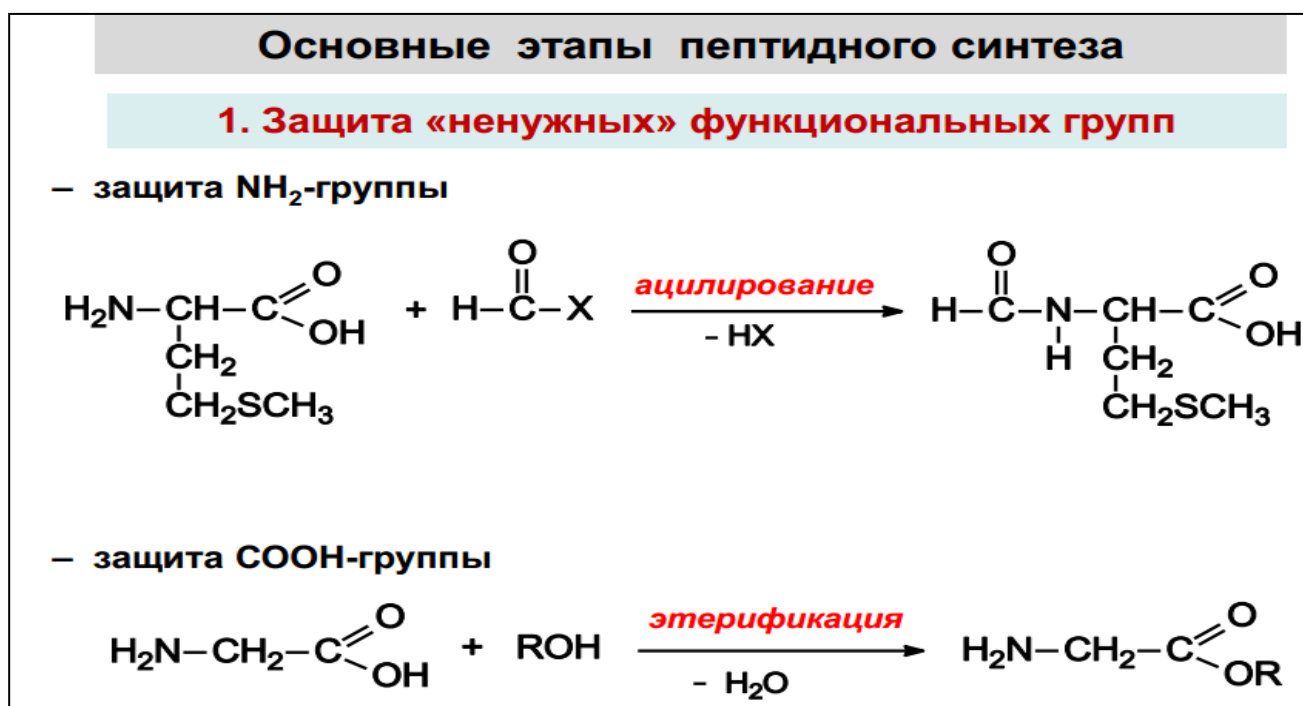


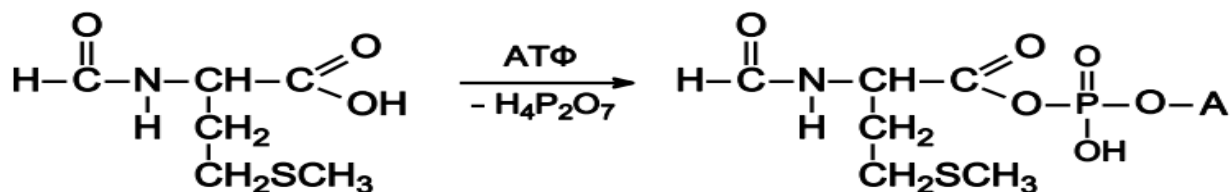
Рисунок 4.8 – Схема пептидного синтеза

Основные этапы пептидного синтеза, которые включают четыре последовательные стадии, представлен на рисунке 4.9.

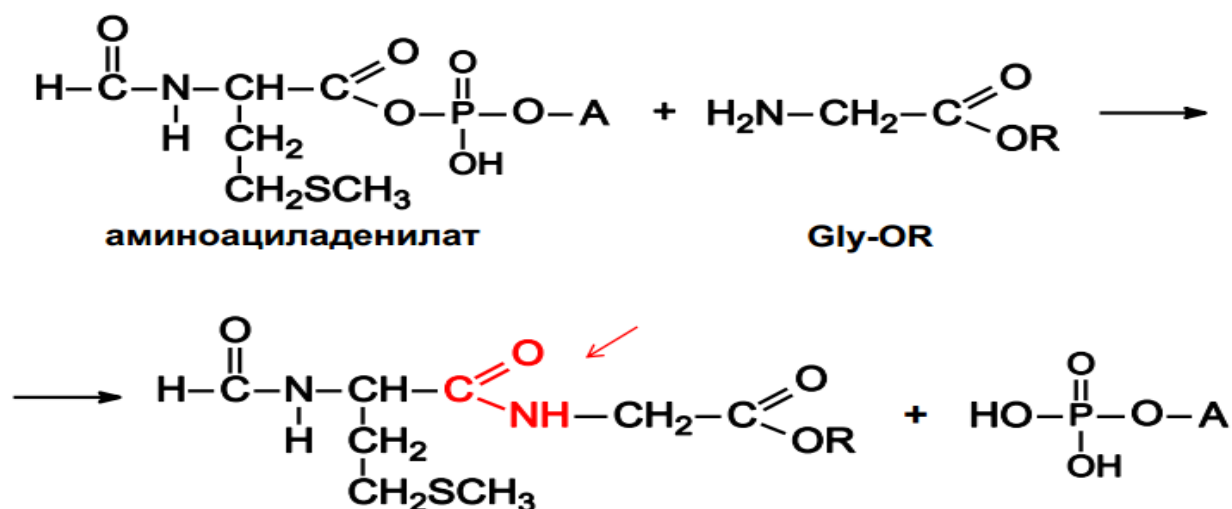


2. Активация карбоксильной группы

– метод смешанных ангидридов



3. Образование пептидной связи



4. Снятие защитных групп

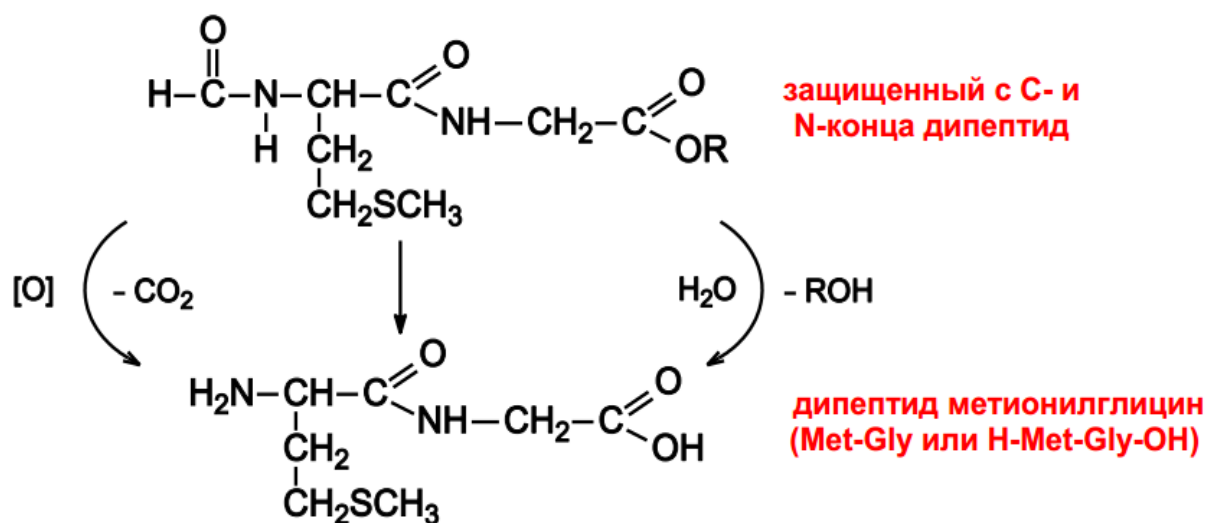


Рисунок 4.9 – Этапы пептидного синтеза

4.4.3 Метод твердофазного синтеза пептидов

Очень перспективный метод синтеза пептидных связей предложил в 1960 г. Меррифилд (США) метод твердофазного синтеза пептидов.

(1-я стадия). Первая аминокислота с защищенной аминогруппой присоединяется к твердому носителю ионообменной смолы, содержащей первоначально группы $-\text{CH}_2\text{Cl}$ с образованием так называемой якорной связи.

(2-я стадия). Затем наращивают пептидную цепь, пропуская через смолу растворы соответствующих реагентов. Для этого сначала убирают группу, защищающую конечную NH_2 -группу

(3-я стадия). Пропуская через смолу раствор другой аминокислоты с защищенной аминогруппой в присутствии водоотнимающих реагентов, образуют пептидную связь между первой и второй аминокислотой.

(4-я стадия). Если затем убрать защитную группу синтез пептида можно вести далее. После наращивания пептидной цепи до нужной величины гидролизуют «якорную» сложноэфирную связь и смывают полипептид со смолы.

Схема твердофазного синтеза пептидов представлен на рисунке 4.10.

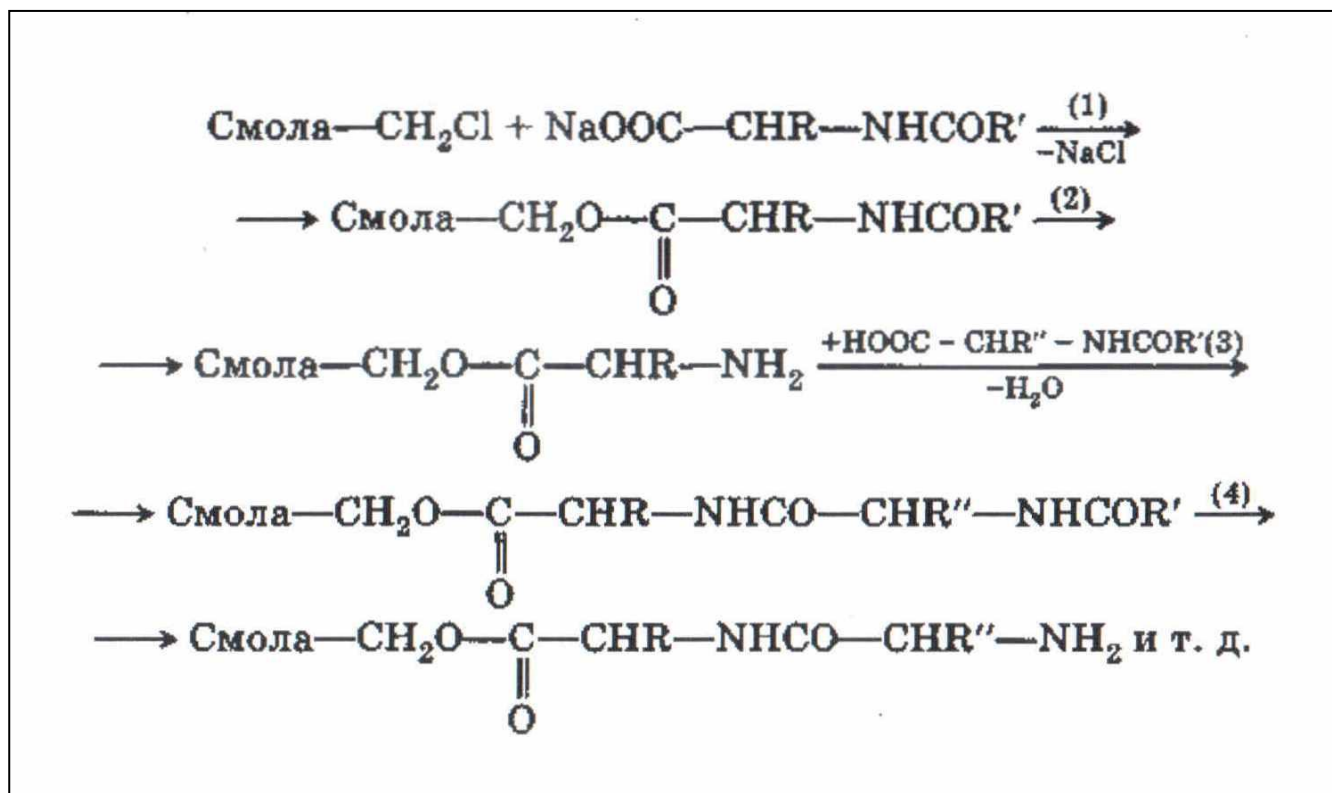


Рисунок 4.10 – Схема твердофазного синтеза пептидов

4.4.4 Методы создания пептидной связи

Образование пептидной связи сводится к отщеплению молекулы воды от двух аминокислотных остатков.

Для того чтобы сделать эту реакцию возможной и, более того, обеспечить ее высокую скорость и полноту, необходимо «активировать» карбоксильную группу. Такая активация должна сводиться к увеличению электрофильности карбонильного атома углерода.

Методы конденсации различаются природой группы X'. Среди них выделяют:

- 1) хлорангидридный метод;
- 2) азидный метод;
- 3) ангидридный;
- 4) метод активированных эфиров;
- 5) карбодимидный метод.

4.4.4.1 Хлорангидридный метод

Хлорангидридный метод в настоящее время применяется редко. Хлорангидриды получают обработкой производных аминокислот и пептидов хлористым тиоилом или белков и пятихлористым фосфором.

4.4.4.2 Азидный метод

Метод Т. Курциуса находит широкое применение в синтезе пептидов. Гидразиды получают либо прямым гидразинолизом эфиров защищенных аминокислот или пептидов, либо из защищенных гидразидов (-CO-NH-NH-Z-, -O-NH-NH-Вое и т. д.). Азиды можно получать и непосредственно из HOOC-производных с помощью дифенилфосфорилазида $N_3PO(OC_6H_5)_2$, применяемого в

качестве конденсирующего агента (в частности, для получения циклопептидов).

4.4.4.3 Метод ангидридов

Симметричные ангидриды ациламино кислот легко получают обработкой последних дициклогексилкарбодиимидом или этоксиацетиленом. Более распространенным является применение смешанных ангидридов, в частности с производным угольной кислоты. Быстрый ступенчатый метод синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов носит название REMA-синтеза.

4.4.4.4 Метод активированных эфиров

Среди арильных активированных эфиров наиболее широко используются п-нитрофениловые (-ONср) (М. Боданский, 1956), 2,4-динитрофениловые, о-нитрофениловые и о-нитротифениловые, 2,4,5-трихлорфениловые (-ОТср), пентахлорфениловые (-ОРср). В последние годы большое распространение получили активированные эфиры на основе производных гидроксиламина, и прежде всего N-гидроксисукцинимидные эфиры.

4.4.4.5 Карбодиимидный метод

Дициклогексилкарбодиимид предложен в 1955 г. Дж. Шиэном и Г. Хессом при синтезе пенициллина. Первой стадией реакции является активирование карбоксильного компонента путем образования реакционноспособного производного О-ацелизомочевины. В настоящее время широко применяются так называемые водорастворимые карбодиимиды: 1-этил-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид, п-толуолсульфонат (1-циклогексил-3-(2-метилморфолиноэтил)-карбодиимида и др.

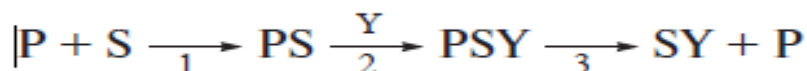
4.5 Защитные группировки, используемые в пептидном синтезе

4.5.1 Требования к защитным группам

Защитная группа – это функциональная группа, которая вводится в молекулу для обеспечения протекания необходимой химической реакции.

Суть метода заключается во временном обратимом блокировании (защите) тех функциональных групп, которые необходимо сохранить при проведении запланированных химических превращений по другим частям молекулы.

При этом реализуется следующая цепочка химических превращений:



- где: 1) введение защитной группы (protecting group - P) в исходный субстрат S;
2) реакция между защищенным субстратом PS и используемым реагентом Y;
3) последующее удаление блокирующей группы P и образование продукта SY.

Защитные группы должны отвечать следующим *требованиям*:

- а) избирательно защищать (блокировать) определенные функциональные группы;
- б) быть устойчивыми к намеченным превращениям молекулы;
- в) избирательно удаляться, регенерируя исходную группу в условиях, когда остальные части молекулы не изменяются.

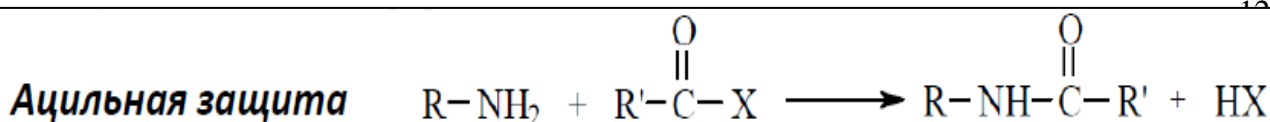
4.5.2 Два типа защитных групп в пептидном синтезе

Постоянными называют группировки, используемые для защиты боковых функциональных групп и удаляемые на заключительном этапе синтеза пептида.

Временными являются защитные группы для N-концевой аминогруппы и C-концевого карбоксила, снимаемые, соответственно, перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов.

4.5.3 NH₂-защитные группировки

Ацильного типа – не используются в качестве временных защитных группировок из-за невозможности их удаления без расщепления пептидных связей



(например, бензоильная или ацетильная группы) и легко происходящей рацемизации при получении активированных производных (рисунок 4.11)

Рисунок 4.11 – Схема ацильной защиты

Формильная и трифторацетильная группы находят применение для защиты N-групп лизина. Используют редко из-за жесткости условий их удаления.

Арильного типа также используются сравнительно редко. Исключением является Nps-группа, которая легко вводится с помощью соответствующего хлорида, а удаляется с помощью ацидолиза или тиолиза.

Защитные группы уретанового типа (рисунок 4.12). Они вводятся с помощью соответствующих хлоридов, азидов или карбонатов.

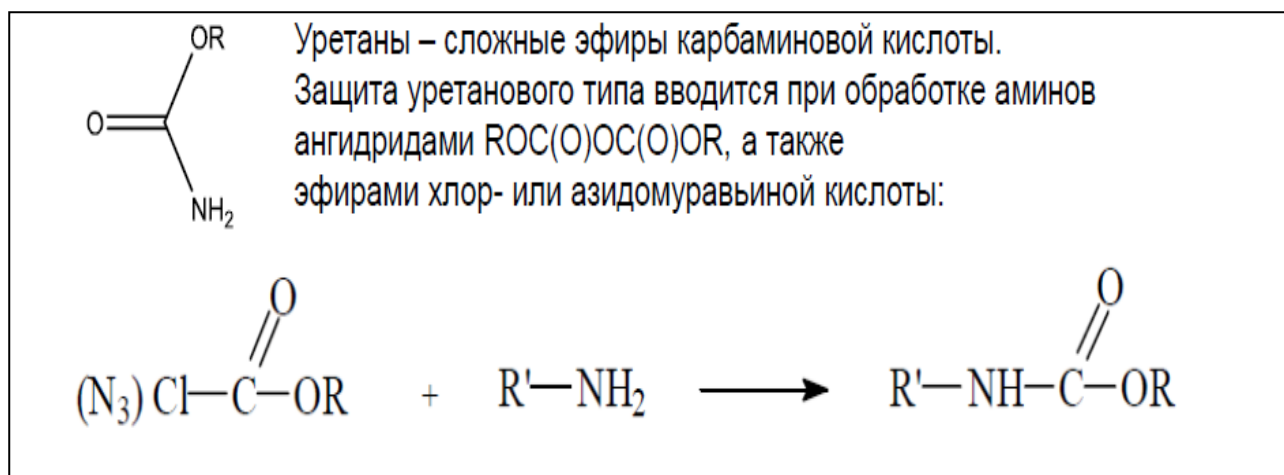


Рисунок 4.12 – Схема уретановой защиты

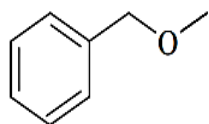
4.5.4 COOH-защитные группировки

Бензиловые эфиры и их производные получают прямой этерификацией аминокислот в присутствии кислотных катализаторов или обработкой защищенных производных аминокислот бензилбромидом в щелочной среде (рисунок 4.13). В тех случаях, когда этерификация не может быть использована, применяются специальные реагенты, обычно рекомендуемые для образования сложноэфирных

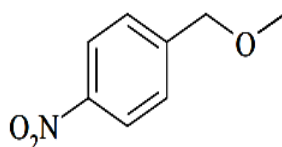
связей, а именно N-дициклогексилкарбодиимид (часто в присутствии катализатора 4-иметил-аминопиридина) и N-карбонилдиимидазол.

Для блокирования карбоксильных групп в ряде случаев применяют солеобразование, хотя при этом не исключаются побочные реакции в ходе синтеза.

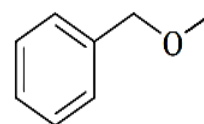
Наиболее часто для защиты карбоксильных групп применяются:



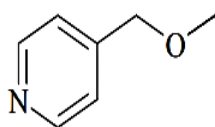
бензиловый эфир



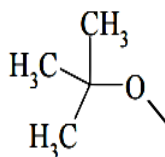
4-нитробензиловый эфир



фениловый

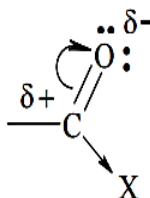


4-пиколиловый



трет-бутиловый

Активация карбоксильной группы, вступающей в образование пептидной связи, сводится к увеличению электрофильности карбонильного углерода, обеспечивая высокую скорость и полноту синтеза пептида:



Очень важна природа группы X.

Рисунок 4.13 – Защита карбоксильных групп бензиловыми эфирами

4.5.5 Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот

Существуют два различных тактических подхода к синтезу пептидов: с максимальной защитой боковых функций аминокислот и с минимумом защитных группировок.

В первом случае удастся резко ограничить возможность побочных реакций в ходе синтеза, а во втором – существенно облегчить конечное деблокирование защищенного производного пептида.

Выбор соответствующего варианта определяется в основном природой синтезируемого пептида. Так как сохранение реакционноспособных функциональных групп в пептиде сокращает методические возможности экспериментатора, в подавляющем числе синтезов защищают боковые группы Ser, Thr, Tyr, Arg, His, Asp, Glu.

Многообразие структурных типов защитных групп, простота методов их селективного введения или удаления сделали *метод защитных групп* важным инструментом тонкого органического синтеза. Метод защитных групп находит широкое применение во многих областях современной органической химии, но наиболее ярко ценность этого метода прослеживается в области пептидного синтеза.

4.6 Химическая модификация белков и пептидов

4.6.1 Химическая модификация

Задачи химической модификации белково-пептидных веществ, как правило, связаны с выяснением связи между их структурой и биологической функцией. Естественно, при этом могут преследоваться и другие цели, например, создание практически важных препаратов с заданными свойствами.

В зависимости от решаемых задач и применяемых методов принято различать следующие типы химической модификации белков и пептидов.

Замена одного или нескольких аминокислотных остатков на другие и получение на этой основе разнообразных аналогов природных соединений. Такая модификация пептидов достигается методами пептидного синтеза, а белков - посредством так называемого «направленного мутагенеза».

Модификация отдельных аминокислотных остатков с помощью селективных химических реагентов. Специфичность реакции определяется природой боковой цепи аминокислотного остатка, пространственным строением модифицируемого соединения и условиями реакции.

Модификация с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих

одновременно с двумя или более функциональными группами белков.

Направленная биоспецифическая модификация по «точному адресу», так называемое «аффинное мечение». Широко известно, например, применение субстратоподобных агентов для химического исследования природы и локализации активного центра ферментов или иных систем. Как биоспецифическую модификацию можно рассматривать и некоторые процессы модификации белков, такие, как фосфорилирование, ацилирование, гликозилирование, метилирование, протекающие в клетке с участием соответствующих ферментов.

Введение различных химических меток, репортерных групп, расширяющих возможности физико-химических методов (ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ и др.) при исследовании структуры и функции белков.

Ковалентное присоединение белка или пептида к полимеру с целью получения так называемых «иммобилизованных» препаратов (например, иммобилизованных ферментов) или создания высокоселективных носителей для биоспецифической (аффинной) хроматографии.

Топохимическая модификация (трансформация) пептидных систем, используемая при конструировании биологически активных аналогов природных соединений.

Ниже более подробно рассматриваются некоторые из перечисленных типов химической модификации.

4.6.2 Селективная модификация аминокислотных остатков

Белок является полифункциональным соединением, в котором каждый аминокислотный остаток выполняет определенную роль в поддержании нативной конформации или проявлении биологической функции. Если используются модифицирующие агенты достаточно широкой специфичности, конечный результат зависит от доступности тех или иных функциональных групп белка в данных условиях. В частности, ацилирование с помощью радиоактивно меченного

уксусного ангидрида было предложено в качестве метода локализации остатков лизина, расположенных на поверхности белковой глобулы (Б. Хартли). Этот прием широко применяется и для исследования топографии мембранных белков, когда доступными действием так называемых непроникающих реагентов оказываются лишь группировки, расположенные вне мембраны.

В настоящее время известно значительное число специфических реагентов, селективно модифицирующих боковые цепи аминокислот. Большинство из приведенных ниже реакций применяется для выявления функционально важных аминокислотных остатков. Многие из них используются также при исследовании структуры белков и пептидов.

Лизин. Аминогруппы остатков лизина являются весьма удобными мишенями для модификации. Наибольшее распространение при этом получили следующие методы:

а) ацилирование с помощью уксусного, трифторуксусного или янтарного ангидридов, S-этил-трифторацетата; иногда применяется обратимое ацилирование малеиновым или цитраконовым ангидридами;

б) арилирование;

в) реакция с имидоэфирами;

г) образование шиффовых оснований с последующим восстановлением боргидридом натрия;

д) гуанидирование (до производных гомоаргинина);

е) карбамоилирование, а также дансилирование. Последняя реакция широко используется при анализе первичной структуры белков и пептидов (см. с. 37), а также для введения флуоресцентной метки в белки. Все перечисленные реакции могут применяться и для модификации N-концевой аминокислотной группы белков и пептидов.

Аргинин. Для модификации гуанидиногруппы остатков аргинина используются гидразинолиз до производных орнитина и конденсация с 1,2-дикетонами (например, 1,2-циклогександионом), позволяющая обратимо модифицировать остатки аргинина.

Цистеин. Сульфгидрильная группа остатка цистеина является одной из наиболее реакционноспособных в белках, и она особенно часто подвергается химической модификации. Для этой цели применяются:

а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацетамидом (используется для защиты сульфгидрильных групп от окисления в ходе структурного изучения белков и пептидов);

б) аминоэтилирование с помощью этиленimina (азиридина);

в) реакция с п-хлормеркуриобензойной кислотой (П. Д. Бойер, 1954), часто применяется для количественного определения SH-групп в белках и пептидах;

г) окисление с помощью O_2 , H_2O_2 или надмуравьиной кислоты до производных цистеиновой кислоты (В. Хирш, 1956), одновременно могут подвергаться окислению остатки Trp (в формилкинуруенин) и Met (в сульфоксид и сульфон);

д) окисление в мягких условиях с образованием меж- или внутримолекулярных дисульфидных связей под действием иода, феррицианида $[Fe(CN)_6]$, о-иодозобензойной кислоты, H_2O_2 ;

е) реагенты, приводящие к получению несимметричных дисульфидов, в частности реагент Элмана, применяемый для количественного определения сульфгидрильных групп в белках, и азобензол-2-сульфенилбромид;

ж) конденсация с N-этилмалеимидом, модификации могут подвергаться также остатки His и Lys, но при pH 7,0 скорость реакции с SH-группой в 10^3 раз выше.

4.6.3 Бифункциональные реагенты

К бифункциональным реагентам относят химические соединения, содержащие две (обычно одинаковые) пространственно разделенные реакционноспособные группировки. Бифункциональные реагенты широко используются для ковалентной «сшивки» пространственно сближенных участков как одной белковой молекулы, так и двух разных белков, функционирующих в едином комплексе. С помощью таких реагентов изучают третичную и четвертичную структуры белков и выясняют области контактов различных белковых молекул между собой или с другими

биополимерами. К бифункциональным реагентам относятся, например, глутаровый альдегид, взаимодействующий с аминогруппами, и N-замещенные производные малеимида, реагирующие с сульфгидрильными группами белков. Менее специфичны алкилгалогениды, способные модифицировать аминосульфгидрильную, а также имидазольную группы, и арилгалогениды, реагирующие, кроме того, и с фенольным гидроксидом. Широкое распространение в качестве бифункциональных реагентов находят диимидоэфиры, модифицирующие аминогруппы белков: Особую группу составляют реагенты, содержащие дисульфидные связи или другие группировки (эфирные, азо-, сульфоновые), расщепляемые в достаточно мягких условиях (расщепляемые бифункциональные реагенты).

Использование расщепляемых реагентов облегчает процесс идентификации «сшиваемых» с их помощью белков при исследовании топографии многокомпонентных белковых систем.

Частным случаем биоспецифической модификации является фотоаффинная модификация, основанная на использовании производного природного лиганда, содержащего фотореактивную группировку. При облучении УФ-светом происходит образование свободных радикалов, способных реагировать с самыми различными группировками белковой молекулы (в том числе и с СН-группой) в местах наиболее тесных контактов с лигандом.

В качестве предшественников активированных соединений обычно применяют разнообразные производные арилазидов и диазо-соединений, генерирующие при фотолитическом разложении нитрены и карбены, соответственно (рисунок 4.14):

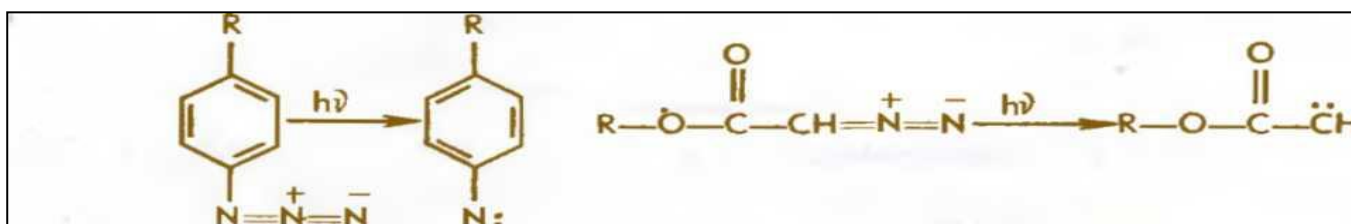


Рисунок 4.14 – Схема активирования с помощью производных арилазидов и диазо-соединений

Преимущество метода заключается в возможности проводить модификацию на определенном этапе функционирования системы, однако выход «целевых» продуктов взаимодействия, как правило, низок из-за внутримолекулярных перегруппировок радикалов и других конкурирующих процессов. Поэтому при идентификации продуктов сшивок необходимо использовать радиоактивно меченные фотоаффинные реагенты.

В качестве примера фотоаффинной модификации рассмотрим локализацию в ДНК-зависимой РНК-полимеразе участков, контактирующих с 5'-концевой группой синтезируемой РНК (рисунок 4.15).

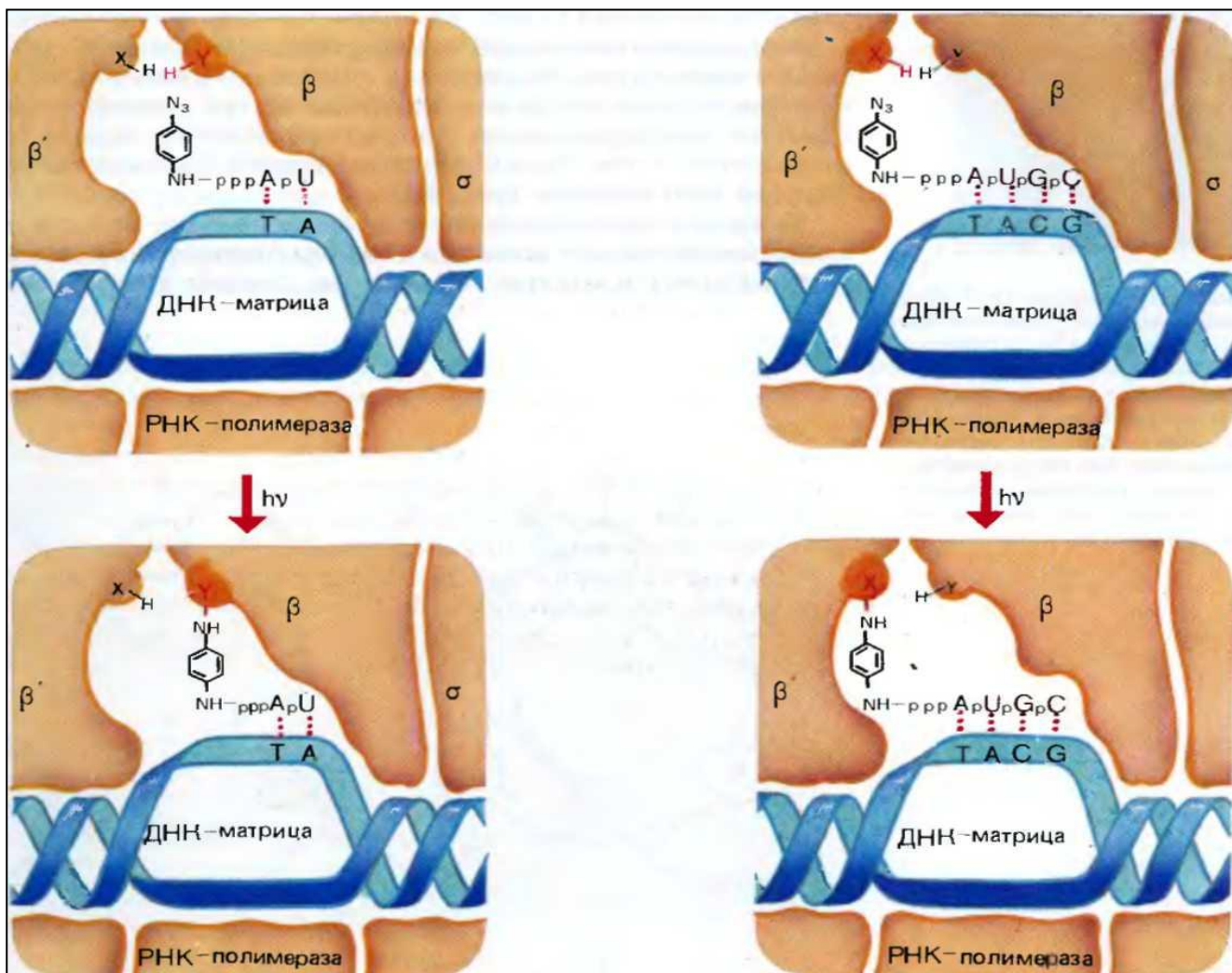


Рисунок 4.15 – Фотоаффинная модификация РНК-полимеразы аналогами РНК-продукта.

Были отработаны условия, в которых РНК-полимера за способна синтезировать олигонуклеотиды определенной длины, содержащие на 5'-конце фотореактивную (γ -азидоанилидную) группу. После облучения светом транскрипционного комплекса (РНК - полимеразы - ДНК - РНК) в зависимости от длины синтезированного олигорибонуклеотида модифицировались различные субъединицы фермента. В частности, в случае динуклеотида главным образом модифицировалась Р-субъединица, а в случае тетрануклеотида - Р'-субъединица. Полученные результаты свидетельствовали о том, что центр связывания продукта изменяется в процессе синтеза РНК (Е. Д. Свердлов, 1980).

Топохимическая модификация (трансформация) пептидных систем. Общепринятый путь исследования зависимости между строением и биологическим действием природных пептидов заключается в получении их аналогов заменой одних аминокислотных остатков на другие и в сравнительном изучении биологических свойств синтезированных соединений.

Другой подход основан на модификации молекул с использованием особых приемов и приводит к аналогам нового типа, в которых при радикальном изменении молекулы как системы в целом сохраняются многие стереоэлектронные характеристики природного соединения. Такие аналоги, нередко успешно имитирующие исходный пептид и эффективно взаимодействующие с соответствующим рецептором или иным партнером в биохимическом процессе, называются топахимическими (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, 1967).

Примерами могут служить пептиды, полученные изменением направления ацилирования в пептидной цепи – так называемые ретро-изомеры, аналоги, образованные полным обращением конфигурации всех аминокислотных остатков (энантио-изомеры), и особенно аналоги, сконструированные комбинацией этих двух приемов (ретро-энантио-изомеры). Такого рода модификации касаются как циклических, так и линейных пептидов, однако в последнем случае для топахимического подобия аналогов необходимо, чтобы N- и C-концевые группы были соответствующим образом блокированы.

К числу топохимических операций следует отнести и циклизацию биологически активных линейных пептидов за счет амидных, дисульфидных или других ковалентных связей.

Такая модификация особенно эффективна оказывается особенно эффективной, если предварительно удастся доказать, что природный пептид взаимодействует с соответствующим рецептором в свернутой или квазициклической конформации. С другой стороны, если полученное циклическое производное обладает высокой биологической активностью, это служит веским аргументом в пользу того, что исходный линейный пептид имеет свернутую «биоспецифическую» конформацию. Особенностью такого рода трансформаций является возможность, при сравнительно небольшом изменении отдельных функциональных групп пептида, зафиксировать с разной степенью жесткости (в зависимости от величины образованного цикла) конформационные характеристики исследуемого соединения, т. е. получить в относительно «замороженном» состоянии одну из предпочтительных конформации пептидной цепи.

Нельзя не отметить и такой прием, как замена в природном пептиде амидных связей на близкие им в стереоэлектронном отношении сложноэфирные; в случае биологически активных депсипептидов возможна и обратная замена – сложноэфирных связей на амидные, а также комбинация этих приемов.

Наконец, следует упомянуть и возможность модификации целых фрагментов пептида или белка без разрушения его общей биологически активной конформации: замену отдельных участков полипептидной цепи на углеводородные звенья (-СНг-СНг-СНг-), взаимную перестановку в молекуле пептида функционально важных фрагментов или получение биологически активных гибридных молекул, сочетающих в себе элементы структур близких по функции природных пептидов. Термин «топохимические аналоги» и в этом случае сохраняет свое значение.

Топохимический принцип трансформации природных пептидов оказался весьма плодотворным при получении интересных в биологическом отношении аналогов пептидных антибиотиков (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников), пептидных гормонов (Г. И. Чипенс, Р. Хиршман), нейропептидов (М. Гудмэн).

Контрольные вопросы по изучаемой теме

1. Назовите основные этапы синтеза белка.
2. Что такое защитных группы и какие к ним предъявляются требования в пептидном синтезе.
3. Какие виды защитных групп используются в пептидном синтезе.
4. Назовите NH₂- защитные и COOH- защитные группировки.
5. Назовите защитные группировки для боковых цепей аминокислот.
6. Перечислите основные методы создания пептидной связи.
7. В чем сущность хлорангидридного метода.
8. В чем сущность азидного метода.
9. В чем сущность карбодиимидного метода создания пептидной связи.
10. В чем сущность карбоксиангидридного метода.
11. Синтез полиаминокислот.
12. Какие существуют методы определения определения аминокислотной последовательности.
13. Какие мотоды модификации белков и пептидов вы знаете.
14. Какими методами проводится качественный и количественный анализ белково-пептидных комплексов.
15. Какова роль N- фенилметионил- РНК в биосинтезе белка.

5 Лабораторный практикум

5.1 Проведение реакций осаждения белков с оценкой их первичного и вторичного состава с помощью цветных реакций

Реакции осаждения белков используют при разделении белковых фракций в процессе выделения и очистки белков, для получения безбелковых растворов (например, при выделении ДНК из животных тканей), для экспресс – обнаружения белка в биологических жидкостях (например, в моче).

Изменение зарядов белковых молекул и/или снятие гидратной оболочки приводит к агрегации белковых молекул и выпадению их в осадок – денатурации белка. При нагревании молекулы белков денатурируют, т.е. теряют свою нативную структуру, разворачиваются, но остаются во взвешенном состоянии, что проявляется в помутнении разбавленного белкового раствора.

Цель работы

Провести реакции осаждения растворов белков различными методами.

Оценить с помощью цветных реакций до начала и после окончания реакций осаждения качественный состав растворов белков.

Принцип метода

Для осаждения белка нужно лишить его стабилизирующих факторов: снять заряд, удалить гидратную оболочку или разрушить третичную структуру (вызвать денатурацию), используя различные химические реагенты или нагревание.

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Нагревание вызывает денатурацию белка, сопровождающуюся помутнением раствора.

2. Минеральные и органические кислоты вызывают дегидратацию и перезарядку части белковых молекул, сопровождающуюся их денатурацией.

3. Соли тяжелых металлов вызывают денатурацию белка, что обусловлено адсорбцией ионов металлов на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимого комплекса.

4. Органические растворители снимают гидратную оболочку и понижают

устойчивость белка в растворе, но осадок выпадает только в нейтральных и слабокислых растворах. Длительное действие органического растворителя вызывает денатурацию белка.

5. Интенсивность окраски в цветных реакциях пропорциональна количеству реагирующих функциональных групп. Поэтому цветные реакции могут быть использованы для качественного и количественного определения белков, для определения присутствующих в них аминокислот или для анализа состава белков:

- с помощью *биуретовой* реакции определяют наличие пептидных групп в олигопептидах и в белках (универсальная реакция для любых белков);

- с помощью *нингидриновой* реакции определяют наличие α-аминогрупп в свободных аминокислотах, олигопептидах и белках (универсальная реакция для любых белков);

- с помощью *ксантопротеиновой* реакции определяют наличие в белках ароматических аминокислот;

- с помощью *реакции Фоля* определяют наличие в составе белков серосодержащей аминокислоты - цистеина.

Ход работы

1. Приготовление растворов белков.

Раствор I: белок одного куриного яйца разводят в 300 мл дистиллированной воды и фильтруют; для приготовления раствора II используют 1%-ный раствор желатины. Раствор I содержит овальбумин (яичный белок), а раствор II - желатин (овальбумин содержит все 20 аминокислот, а желатина только 17).

2. Провести цветные реакции с каждым раствором белка и результаты занести в таблицу 5.1.

Таблица 5.1 – Цветные реакции

Реакция	Номер про – бирки	Ход работы	Окраска до осаждения	Окраска после осаждения растворов
Биуретовая	1	Раствор I - 5 капель, 10 % раствор NaOH - 5 капель, 1 % раствор SiSO_4 - 1 капля		
	2	Раствор II - 5 капель, 10 % раствор NaOH - 5 капель, 1 % - раствор SiSO_4 - 1 капля		
Нингидриновая	1	Раствор I - 5 капель, 1% раствор нингидрина в ацетоне - 2 капли; нагревают		
	2	Раствор II - 5 капель, 1 % раствор нингидрина в ацетоне - 2 капли; нагревают		
Ксантопротеиновая	1	Раствор I - 5 капель, HNO_3 (конц.) - 3 капли; осторожно нагревают		
	2	Раствор II - 5 капель, HNO_3 (конц.) - 3 капли; осторожно нагревают		
Фоля	1	Раствор I - 5 капель, 30 % раствор NaOH - 5 капель, 5 % раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ - 1 капля; нагревают до кипения		
	2	Раствор II - 5 капель, 30 % раствор NaOH - 5 капель, 5 % раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ - 1 капля; нагревают до кипения		

3. Провести осаждение белка различными методами и результаты занести в таблицу (таблица 5.2):

Таблица 5.2 – Реакции осаждения белка

Реакция осаждения	Ход работы	Наблюдения	Чем обусловлена реакция
Нагреванием	В пробирку вносят 10 капель раствора яичного белка, нагревают до появления осадка		
Органическими кислотами – (трихлоруксусная кислота (ТХУ))	В пробирку вносят 10 капель раствора белка, добавляют 5 капель 10 % раствора ТХУ, перемешивают		
Солями тяжелых металлов (CuSO ₄)	В пробирку вносят 5 капель раствора белка, прибавляют 1 каплю 7 % раствора CuSO ₄ , перемешивают		

4. Провести цветные реакции с растворами белка после осаждения.
5. Сформулируйте выводы.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Где на практике используются реакции осаждения белков?
2. Что происходит со структурой белка при его осаждении?
3. Расскажите механизм биуретовой реакции.
4. Расскажите механизм ксантопротеиновой реакции.
5. Расскажите механизм реакции Фоля.
6. Расскажите механизм нингидриновой реакции.
7. Будет ли давать яичный альбумин положительные биуретовую, нингидриновую реакции после осаждения тяжелыми металлами? Объясните почему.
8. Будет ли положительной реакция Фоля у яичного альбумина после осаждения тяжелыми металлами и почему?

5.2 Количественное определение белка биуретовым методом

Определение концентрации белка проводят при изучении, выделении и очистке белков; в промышленности в процессе получения ферментов, пищевых белков, белковых лекарственных препаратов.

Существует много различных методов количественного определения белков. Среди них широкое распространение получили колориметрические методы, основанные на способности белков давать окрашенные комплексы с рядом реактивов (цветные реакции). Среди этих методов наиболее распространены биуретовый метод и его модификация (метод Лоури).

Цель работы

Освоить работу фотоэлектроколориметра (ФЭК). Научиться строить стандартные калибровочные кривые. Определить содержание белка в пробе с неизвестной концентрацией.

Принцип метода

Биуретовый метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплексного соединения азота, входящего в состав пептидных связей белка, с ионами двухвалентной меди в щелочной среде (биуретовая реакция). Интенсивность развивающейся окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка и определяется спектрофотометрически. Для количественного определения белка измеряют интенсивность окраски стандартных растворов белка с известной концентрацией (величину оптической плотности D_{T}). По полученным данным строят график зависимости оптической плотности окрашенных растворов от концентрации в них белка (стандартную калибровочную кривую). На оси ординат всегда откладывают величину O как функцию от задаваемых значений.

Измеряют оптическую плотность V_x окрашенного раствора с неизвестной концентрацией белка и по стандартной кривой определяют в нем концентрацию белка. В качестве стандартного раствора белка обычно используют раствор сывороточного альбумина.

Ход работы

1. Приготовьте биуретовый реактив из исходного концентрата (медь сернокислая – 120 ммоль/л, калий йодистый – 300 ммоль/л, калий – натрий виннокислый – 320 ммоль/л, гидроксид натрия – 3 моль/л) и разведите его перед работой непосредственно перед работой в соотношении 1:19.
2. Приготовьте растворы трех концентраций:
 - 0 мг/мл;
 - 20 мг/мл;
 - 30 мг/мл.
3. В три пробирки внесите растворы в соответствии с таблицей 5.3, перемешайте и инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре.

Таблица 5.3 – Этапы количественного определения белка

Реактивы и этапы	Контроль	Стандартный раствор белка			Раствор неизвестного белка, мг/мл
		0 мг/мл	20 мг/мл	30 мг/мл	
Раствор яичного альбумина, мл	-	0,2	0,2	0,2	0,2
H ₂ O, мл	0,2	-	-	-	-
Биуретовый реактив, мл	5	5	5	5	5

4. Проведите спектрофотометрию против H₂O при длине волны = 545 нм и толщине кюветы 1 см и определите величину оптической плотности D_T для каждого раствора.
5. Постройте калибровочную кривую зависимости оптической плотности окрашенных растворов от концентрации в них белка. На оси ординат всегда откладывают величину O как функцию от задаваемых значений.

б. Измерьте оптическую плотность раствора с неизвестной концентрацией белка и по стандартной кривой и определите в нем концентрацию белка.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Где на практике используют количественное определение белка?
2. Как приготовить биуретовый реактив?
3. На каких цветных реакциях основано количественное определение белка и почему?
4. Как строить калибровочную кривую?

5.3 Диализ солевого раствора белка

Диализом называют процесс разделения высокомолекулярных веществ (например, белков) и низкомолекулярных (например, солей) с помощью полупроницаемых мембран.

Полупроницаемыми называют мембраны, диаметр пор которых позволяет проходить только низкомолекулярным соединениям. Примером естественных полупроницаемых мембран могут быть капсулы Боумена-Шумлянського в почках. Широко используют искусственные полупроницаемые мембраны целлофан и коллодий, на основе которых созданы диализаторы, в том числе «искусственная почка».

Метод диализа используют в научных лабораториях, промышленности, клинической практике.

Цель работы. Доказать, что низкомолекулярное соединение $KaCl$ проходит через полупроницаемую мембрану, а высокомолекулярный белок не проходит и остается в диализируемом растворе.

Принцип метода. Метод основан на том, что низкомолекулярные вещества легко диффундируют через полупроницаемые мембраны в чистый растворитель, образуя диализат. Диффузия будет продолжаться, пока не произойдет выравнивание

концентраций диффундируемого вещества между диализируемым раствором и диализатом. Процесс возобновится, если диализат заменить чистым растворителем или если эта смена будет происходить постоянно (проточный диализ).

Ход работы

1. Подготовка диализатора. Полупроницаемой мембраной могут быть диализные трубки или целлофановые диализные мешочки. Целлофан (квадрат 10x10 см) смачивают дистиллированной водой, делают в нем углубление и получают диализный мешочек.

2. Приготовление диализируемого раствора. В диализный мешочек помещают 20 капель яичного белка, разведенного в 5 % растворе $KaCl$ (белок одного яйца разводят в 300 мл 5 % раствора $KaCl$), и перемешивают. Края целлофана зажимают между двумя стеклянными палочками, скрепленными между собой резиновыми кольцами.

3. Диализ. Мешочек с солевым раствором белка помещают в стакан с дистиллированной водой так, чтобы часть мешочка с раствором белка была полностью погружена в воду. Сразу же на просвет можно заметить струйки солевого раствора, опускающиеся из мешочка на дно стакана, что обусловлено изменением рефракции воды.

4. Анализ результатов диализа. Через 60 мин после начала диализа проводят качественные пробы на белок (биуретовую реакцию) и на ионы хлора (с $AgNO_3$) в соответствии с таблицей 5.4.

Таблица 5.4 – Порядок выполнения исследования

Реактив	Проба на белок		Проба на ионы Cl в диализате
	в диализате	в диализируемом растворе	
Диализат	10 капель	-	10 капель

Продолжение таблицы 5.4			
Диализируемый раствор	-	10 капель	-
10 % раствор NaOH	5 капель	5 капель	-
1 % раствор SiSO_4	1 капля	1 капля	-
10 % - ный раствор HNO_3	-	-	1 капля
1 % раствор AgNO_3	-	-	1 капля
Наблюдения			

5. Сформулируйте выводы.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Где происходит диализ белка в организме человека?
2. Что может служить в качестве диализатора.
3. Что такое полупроницаемые мембраны?
4. Как готовить диализируемые растворы?
5. Какие реакции подтверждают эффективность диализа и почему?
6. Что такое проточный диализ?

5.4 Бумажная хроматография аминокислот

Хроматографический метод, разработанный русским ученым М.С. Цветом, является одним из относительно простых и быстрых методов разделения смеси веществ.

Существует несколько разновидностей метода в зависимости от принципа разделения смеси на составляющие компоненты (адсорбционная, ионообменная, аффинная хроматография).

Примером адсорбционной хроматографии является распределительная хроматография на бумаге, которая оказалась наиболее удобной для разделения аминокислот, отличающихся гидрофобностью радикалов, а также для идентификации неизвестных аминокислот путем сравнения их подвижности с подвижностью известных аминокислот («свидетелей»).

Цель работы

Провести разделение смеси двух неизвестных аминокислот, считать для каждой из них коэффициент распределения (K_r) и идентифицировать аминокислоты по сравнению с K_r стандартных аминокислот (глутаминовой кислоты и лейцина).

Принцип метода

Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях: в воде, которая удерживается фильтровальной бумагой и является неподвижной фазой растворителя, и в подвижной фазе органического растворителя (бутанол: уксусная кислота: вода в соотношении: 5:1:4).

По мере продвижения растворителя по бумаге происходит многократное перераспределение аминокислот между подвижной и неподвижной фазами растворителя. Чем больше гидрофобность аминокислоты, тем быстрее она будет продвигаться по бумаге и наоборот. В соответствии с этим расстояния, которые аминокислоты пройдут с подвижной фазой растворителя по бумаге, будут различными.

Скорость передвижения каждой аминокислоты может быть выражена коэффициентом распределения (K_r). *Коэффициентом распределения* называют отношение расстояний (в мм) от места нанесения аминокислоты (старта) до середины ее пятна (величина a) к расстоянию от места старта до границы фронта растворителя (величина b). Чем выше гидрофобность аминокислотного радикала, тем ближе к единице будет величина K_r .

Коэффициент распределения для каждой аминокислоты постоянен при стандартных условиях проведения опыта (тип бумаги, температура, тип растворителя, влажность) и служит средством идентификации аминокислот по сравнению с аминокислотами - «свидетелями».

Ход работы

1. Диск хроматографической бумаги диаметром 12 см размечают карандашом (рисунок 5.1).

2. В места, отмеченные точками, наносят по 2 мкл образцов стандартных растворов аминокислот (0,6 % раствор глутаминовой кислоты и 0,5 % раствор лейцина) и смесь неизвестных аминокислот. Высушивают бумажный диск с образцами на воздухе.

3. Разрезают хроматографический диск по линиям разреза, отгибают по линии сгиба получившуюся ножку и укорачивают ее до длины 3 см.

4. Помещают диск в хроматографическую камеру (чашку Петри) так, чтобы ножка была погружена в органический растворитель.

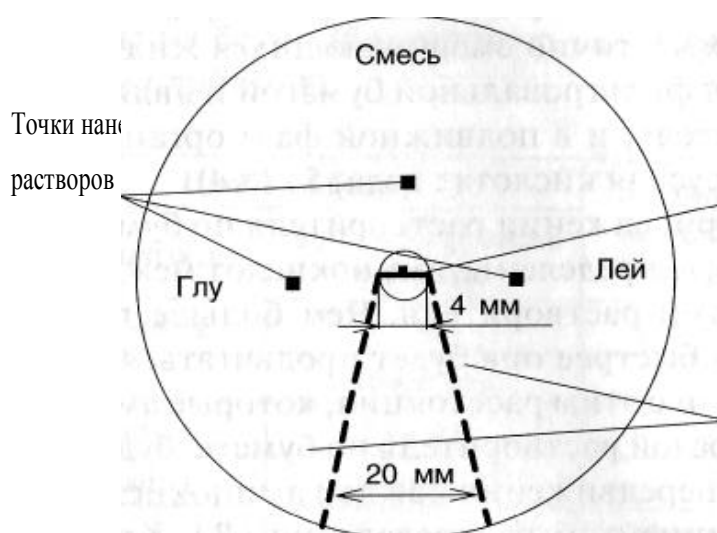


Рисунок 5.1 – Диск хроматографической бумаги

5. Когда фронт растворителя пройдет 5-6 см, извлекают хроматограмму из камеры и тщательно обводят карандашом образовавшийся фронт растворителя.
6. Высушивают диск в сушильном шкафу при температуре от 60 до 80 °С.
7. Погружают диск в 0,5% раствор нингидрина в ацетоне и вновь высушивают до проявления пятен аминокислот.
8. Рассчитывают значение K_r , для каждой аминокислоты, вклеивают полученную хроматограмму или зарисовывают ее.
9. Самостоятельное формулирование выводов.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Что такое хроматография?
2. Какие есть разновидности хроматографии?
3. К какому виду хроматографии относится распределительная хроматография на бумаге?
4. Что такое коэффициент распределения аминокислоты?
5. Что такое аминокислоты - «свидетели»?
6. как приготовить хроматографический диск.
7. Что является «фронтом» растворителя?
8. На чем основана распределительная хроматография аминокислот?
9. Как проявляется хроматограмма?

5.5 Титрометрическое определение активности каталазы

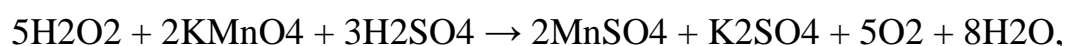
Оборудование и реактивы: кипящая водяная баня; пипетки на 5, 10, 20 и 25 мл; цилиндры измерительные с носиком на 10 и 25 мл; колба мерная на 100 мл; колбы конические на 200 мл; ступка с пестиком фарфоровые; перманганат калия (0,1 н); серная кислота (10 %); карбонат натрия; пероксид водорода (0,1 н); свежий растительный материал (картофель или морковь).

Ход работы

- 1) 2 г сырого картофеля (или моркови) растирают в ступке, постепенно добавляя 2-3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя карбонат натрия до прекращения выделения пузырьков углекислого газа;
- 2) растертую массу количественно переносят в мерную колбу и доводят водой до объема 100 мл;
- 3) смесь оставляют стоять в течение 30 минут, после чего ее фильтруют;
- 4) далее определяют активность по схеме:
- 2 опытных пробы и 2 контрольных, согласно таблице 5.5:

Опыт и контроль титруют 0,1 н. раствором перманганата калия (до образования устойчивого в течение примерно 1 мин бледно-розового окрашивания). Отмечают количество раствора перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося (после ферментативного разложения) пероксида водорода в опытной колбе и на титрование всего пероксида водорода в контрольной. По разности между опытным и контрольным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет ведут в соответствии с уравнением реакции:



согласно которому 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

Пример расчета: из 1,25 г моркови приготовлена вытяжка каталазы объемом 100 мл: на титрование опытной пробы затрачено 15,5 мл, контрольной 30,2 мл 0,1 н раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно $(30,2 - 15,5)$ 14,7 мл 0,1 н. раствора перманганата калия и, следовательно, равно $(14,7 \cdot 1,7)$ 24,99 мг. Значит, в 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное разложить $(24,99 \cdot 100 / 20 \cdot 1,25) = 99,96$ мг пероксида водорода, а за 1 мин – $(99,96 : 30)$ 3,33 мг. Так как 1 мкмоль пероксида

водорода составляет 0,034 мг, то в 1 г моркови присутствует (3,33: 0,034) 100 Е каталазы.

Таблица 5.5 – Порядок работы

Опыт	Контроль
20 мл вытяжки фермента	20 мл вытяжки фермента
–	Нагревание 10 мин на кипящей водяной бане
25 мл 0,1 н перекиси водорода	25 мл 0,1 н перекиси водорода
Инкубация 30 минут при комнатной температуре	
5 мл 10 % H ₂ SO ₄	5 мл 10 % H ₂ SO ₄

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Рассчитайте содержание каталазы в исследуемом материале.
2. Напишите систематическое название данного фермента, его код по систематическому каталогу и опишите его биологическую роль.

5.6 Определение активности амилазы

Фермент амилаза (а – 1,4 Д – глюкан-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1) катализирует реакцию гидролиза α-1,4-гликозидных связей крахмала. Конечными продуктами гидролиза крахмала являются мальтоза и мальтотриоза. Основным источником амилазы у человека и животных являются поджелудочная железа и слюнные железы. Обе формы фермента идентичны по каталитическим свойствам и почти не различаются по электрофоретической подвижности. Активность амилазы может возрастать в присутствии ионов хлора. Оптимум рН фермента приходится на 6,5-7,5. Фермент содержит один ион кальция на молекулу белка. Поэтому в присутствии оксалата и цитрата наблюдается ингибирование активности амилазы, которая обусловлена связыванием ионов кальция этими соединениями.

Принцип метода

В основе предлагаемого метода используется реакция гидролитического расщепления нерастворимого цветного крахмального субстрата α -амилазой, протекающая с выделением свободного синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя в единицу времени пропорционально активности фермента.

Оборудование: рН – метр, спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, центрифуга, магнитная мешалка, термостат.

Посуда: пипетки на 0,1 мл - 2 шт., на 1 мл - 2 шт., 2 мл - 2 шт.; колбы мерные на 50 мл – 2 шт.; стакан на 50 мл; воронка.

Реактивы: концентрированный буферный раствор (0,6 М фосфатный буферный раствор, рН 7, с 0,1 М NaCl); субстрат (цветной крахмал) – 0,6 г; осаждающий раствор (3 % раствор ТХУ с 1,85 М магнием серноокислым).

Приготовление рабочих растворов. *Буферный раствор.* В мерную колбу емкостью 50 мл вносят 5 мл концентрированного буферного раствора и разбавляют водой до метки. Перед использованием проверяют рН буфера.

Суспензия субстрата. В стакан емкостью 50 мл вносят 10 мл разбавленного буферного раствора и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке медленно добавляют 0,1 г субстрата (цветного крахмала). Продолжают перемешивать до возникновения гомогенной суспензии (15-20 мин). Приготовленную таким образом суспензию можно хранить одну неделю при температуре от +1 до +4°C.

Ход работы

Определение активности α – амилазы проводят следующим образом. В опытную и контрольную пробирки вносят по 1 мл суспензии субстрата. Пробирки прогревают в течение 5 мин при 37°C, затем добавляют в опытную пробирку 1,0 мл сыворотки крови (или супернатанта ткани, в которой определяется активность фермента), а в контрольную пробирку – 1,0 мл дистиллированной воды. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют точно 15 мин при 37°C. После этого добавляют в обе пробирки по 2,0 мл осаждающего раствора, перемешивают при

комнатной температуре 15 мин. Супернатант отделяют от образовавшегося осадка центрифугированием 5-10 мин при 3000 об/мин, переносят в кювету шириной 0,5 см, затем измеряют поглощение (D) растворов из опытной пробирки по сравнению с раствором из контрольной пробирки при 590 нм.

Метод расчета. Активность α -амилазы (v) в пробе определяют по следующей формуле:

$$v = D \times 1083 \text{ (Е/л)}, \quad (5.1)$$

где v – активность амилазы,

D – поглощение растворов.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. К какой группе ферментов относится амилаза, назовите ее порядковый номер по международной номенклатуре.
2. Какую реакцию катализирует данный фермент?
3. Что является субстратом. А что продуктом реакции?
4. На чем основано определение активности данного фермента?
5. Как рассчитать активность амилазы?

5.7 Определение активности пероксидазы

Принцип метода

Пероксидаза является самым распространенным ферментом растений и животных. По своему строению относится к гемсодержащим гликопротеинам. Пероксидаза - самый распространенный фермент биогенных тканей, катализирует реакции индивидуального и совместного окисления субстратов, является компонентом антиоксидантных систем. Пероксидаза относится к группе двухкомпонентных ферментов, в составе которых гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с трехвалентным железом, и полипептидная цепь. Последняя включает от 203 до 308 аминокислот, и, в зависимости от природы изофермента, формирует

компактную третичную структуру, представленную двумя доменами (большим и малым). Фермент имеет размер белковой глобулы, равный 50 А, содержащий около 43% α -спиральных участков.

Гемин нековалентно закреплен в углублении полипептидной цепи между доменами и удерживается там за счет гидрофобных связей и солевого мостика, образованного между остатком пропионовой кислоты гемина с одной из аминокрупп апобелка. Гемин можно обратимо отделить от белка при кислых рН.

К оксидазным субстратам фермента относится диоксифумаровая кислота и другие вещества, окисление которых сопровождается образованием продуктов свободнорадикального окисления.

В реакциях пероксидазного окисления субстратами фермента могут быть неорганические и органические соединения, окисляющиеся перекисью водорода. В реакциях пероксидазного окисления на поверхности фермента проявляются два участка, где происходит связывание субстратов, с расположенным вблизи регуляторным участком. При этом гем пероксидазы ориентирован таким образом в структуре белковой глобулы, что его винильные группы обращены внутрь белковой части, а пропионовокислые остатки обращены наружу и за счет ионных связей с функциональными группами белка принимают участие в связывании, ориентации и фиксации гема с апобелком фермента.

Углеводы, расположенные на поверхности белковой глобулы фермента, выполняют следующие функции: ориентируют фермент на поверхности мембраны; защищают белковую глобулу от разрушительного действия свободных радикалов; повышают стабильность пероксидазы к действию высоких температур.

В реакциях индивидуального и совместного пероксидазного окисления субстратами пероксидазы могут быть антиоксиданты (аскорбиновая кислота, дигидрокверцетин, кверцетин, гидрохинон и др.). Малые концентрации антиоксидантов инициируют реакции пероксидазного окисления, тогда как их высокие концентрации понижают каталитическую активность пероксидазы, ингибируя активность фермента. В зависимости от природы антиоксиданта, в

реакциях совместного окисления субстратов наблюдаются эффекты активирования пероксидазы. При этом проявляется индивидуальный механизм действия фермента.

Для определения активности пероксидазы используются неорганические и органические соединения, при окислении которых перекисью водорода образуются окрашенные продукты.

Оборудование и реактивы

Бензидин, перекись водорода, пипетки, колбы, электронные весы, фарфоровые ступки, пестики, секундомер, ФЭК.

Ход работы:

1) Готовят раствор бензидина: заранее включить водяную баню, чтобы она успела нагреться до 60 градусов. В специальном стаканчике сразу на водяной бане начать приготовление раствора. В стаканчик добавляют 20 мл дистиллированной воды, затем 18,4 мг бензидина и 1-2 капли ледяной уксусной кислоты. При этом все постоянно взбалтывают. После растворения бензидина добавляют 0,545 г уксуснокислого натрия. Затем, после его растворения, все охлаждают и доливают дистиллированную воду до 30 мл.

2) Приготовление раствора H_2O_2 0,3 % 10 мл

3) Навеску растительного материала (100 мг) растирают в ступке с водой, переносят в мерную колбу на 25 мл, и доводят водой до метки.

4) Вытяжку настаивают 10 мин и фильтруют через складчатый фильтр.

5) Для определения активности берут две кюветы. По 1-й кювете устанавливают ноль прибора. В нее помещают 2 мл бензидина, 2 мл фильтрата, 2 мл воды.

Во вторую кювету вливают 2 мл бензидина, 2 мл фильтрата, и 2 мл 0,3% пероксида водорода. Добавление перекиси служит началом реакции.

6) Одновременно с вливанием перекиси включают секундомер. Раствор синее, отмечают время, за которое значение достигает или 0,1 или 0,2. Время должно быть от 20 до 50 сек.

7) Активность пероксидазы рассчитывают по формуле:

$$A = D \cdot E / t \cdot d, \quad (5.2)$$

где: E – разведение

t – время, с

d – 1 см, толщина кюветы

D= 0,2

Пример расчета E: на определения активности фермента взято 2 мл вытяжки фермента, что соответствует разведению: $100/12,5= 8$ мг навески.

Вытяжка имеет определенную ферментативную активность A.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. К какой группе ферментов относится пероксидаза, назовите ее порядковый номер по международной номенклатуре.
2. Какую структуру имеет данный фермент?
3. Что является субстратами?
4. На чем основано определение активности пероксидазы?
2. Как рассчитать активность пероксидазы?

5.8 Влияние pH среды на активность амилазы

Принцип метода

Ряд факторов среды (pH и температура), а также присутствие активаторов и ингибиторов могут оказывать влияние на активность ферментов.

Фермент α -амилаза (диастаза) содержится в слюне и ускоряет гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей в молекулах полисахаридов (крахмала, гликогена) до декстринов и мальтозы. Процесс распада полисахаридов в присутствии α -амилазы включает в себя ряд стадий: крахмал – амилодекстрины – эритродекстрины – ахродекстрины – альтотетроза – мальтотетроза.

При этом нерасщепленный крахмал при взаимодействии с раствором йода дает синее окрашивание, амилодекстрины – фиолетовое, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины, альтотетроза и мальтотетроза – желтое. Кроме того, конечный

продукт гидролиза крахмала – мальтоза – имеет свободную альдегидную группу, которую можно обнаружить реакцией Троммера (Фелинга).

В основе пробы Троммера лежит окислительно-восстановительная реакция восстановления гидрата окиси меди (синего цвета) в гидрат закиси меди (красного цвета) при нагревании. Таким образом, по окраске раствора, содержащего слюну и крахмал, с йодом или проведением реакции Троммера можно выявить степень активности α -амилазы.

Реактивы и оборудование: пробирки, пипетки, термостат, 0,5% раствор крахмала, 0,1% раствор йода

Ход работы. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и по 2 капли слюны, разведенной 10 раз. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат при температуре 37°C. Через 5 мин из четвертой пробирки (рН в ней должно быть наиболее оптимально для действия амилазы) берут контрольную пробу для реакции с йодом. Если получают синее окрашивание, пробу повторяют через 5 мин. Когда в пробе будет получено красное или желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по 1 капле 0,1% раствора йода, их содержимое перемешивают и фиксируют окраску. Оптимум рН для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (при реакции с раствором йода получается красная или желтая окраска).

Результаты оформить в таблицу 5.6.

Таблица 5.6 – Влияние рН на активность амилазы слюны

№ пробирки	Кол-во 0,2М NaHPO ₄	Кол-во 0,1М лимонной к-ты, мл	рН среды	Кол-во капель 0,5% р-ра крахмала	Кол-во капель слюны	Окрашивание в реакции с йодом
1	2	3	4	5	6	7
1	0,58	0,42	5,6	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	

3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. К какому классу ферментов относится амилаза. Ее номер по международной классификации.
2. Особенности строения ее активного центра.
3. Какую реакцию катализирует фермент и что является субстратом в данной реакции.
4. Определите рН - оптимум активности амилазы.
5. Сформулируйте выводы об диапазоне РН действия фермента и его оптимуме. Обоснуйте свой вывод.

5.9 Влияние температуры на активность фермента амилазы

Цель работы: изучить свойства ферментов как биологических катализаторов.

Задачи: изучить влияние температуры на активность ферментов.

Теоретическая часть. Ферменты (энзимы) – это специфические белки, выполняющие в организмах роль биологических катализаторов. Они увеличивают скорость протекания реакций, но, как и небиологические катализаторы, не могут вызывать реакции, невозможные по термодинамическим условиям. Ферменты могут быть как простыми, так и сложными белками. Простыми белками является большинство гидролитических ферментов (пепсин, трипсин, уреаса и др.).

Особое значение при катализе играет активный центр фермента. Активный центр – это часть молекулы ферментативного белка, к которому присоединяется субстрат. Он образован остатками аминокислот, в него могут также входить ионы металлов, витамины и др. Активный центр состоит из ряда функциональных групп, определенным образом ориентированных в пространстве. Поэтому активный центр фермента может взаимодействовать только с определенным субстратом, который может к нему присоединиться.

Поскольку ферменты являются белками, на их активность влияют температура (они термолабильны), рН среды, наличие различных химических веществ и т. д. Следовательно, скорость ферментативного катализа зависит от многих факторов: температуры, рН среды, концентрации субстрата и фермента и т.д.

Одним из важнейших факторов, от которого зависит активность фермента, является температура. С изменением температуры активность фермента изменяется. Каждый фермент имеет свой температурный оптимум. У большинства ферментов тепло кровных животных он лежит в интервале 37-40°C. Повышение температуры выше 70°C приводит к потере активности фермента. Фермент необратимо инактивируется вследствие денатурации белка. Понижение температуры, как и повышение, приводит сначала к уменьшению, а потом и к полной потере активности фермента. Но при низких температурах ферменты не разрушаются, поэтому при последующем повышении температуры их активность восстанавливается (обратимая инактивация).

подавляющее большинство ферментов теплокровных животных при 0°C прекращают свою деятельность, т. е. теряют свою активность. В отличие от них ферменты хладнокровных животных, в частности рыб, при такой температуре имеют достаточно высокую активность. Потеря их активности происходит при гораздо более низкой температуре. Наибольшую устойчивость к действию низких температур проявляет фермент липаза, который вызывает гидролиз простых липидов (триглицеридов). Он теряет свою активность при температуре –25°C.

Активность ферментов меняется в зависимости от реакции среды. Для каждого фермента существуют оптимальные значения рН, при котором он

проявляет максимальную активность. Так, для пепсина оптимальное значение $pH = 1,5-2,5$, в то время как трипсин при таких условиях полностью теряет способность гидролизовать белки. Оптимум его действия наступает при $pH = 8-9$. Активность ферментов зависит от температуры. Та температура, при которой активность фермента наибольшая, называется температурным оптимумом. Для организма человека оптимальная температура находится в пределах $37-40^{\circ}C$. Снижение t° приводит к уменьшению активности ферментов, и при очень низких температурах от 0° до $+4^{\circ}C$ ферментативная активность практически прекращается, т.к. резко изменяются кинетические свойства ферментов. Поэтому снижение активности ферментов имеет обратимый характер: при повышении температуры ферментативная активность полностью восстанавливается.

Повышение t выше оптимальной температуры приводит к постепенному снижению активности и при достижении определенной t для каждого фермента – к полной инактивации фермента, которая является необратимой. При $t = 60^{\circ}C$, (для некоторых $70-100^{\circ}C$) происходит денатурация белка-фермента, разрушение активного центра фермента, образование E-S-комплекса становится невозможным, и ферментативная реакция прекращается.

Ход работы. Берут четыре пробирки, наливают в них по 10 капель 0,5% раствора крахмала (субстрата). Затем первую пробирку ставят в снег (лед), вторую оставляют при комнатной температуре от 15 до $20^{\circ}C$, третью ставят в термостат при температуре $45^{\circ}C$, четвертую – в водяную баню при температуре $75^{\circ}C$. В четыре другие пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1 капле 0,1%-ного раствора йода. Через 5 мин в пробирки с крахмалом добавляют по 10 капель слюны, разведенной в 10 раз (1 капля слюны и 9 капель воды), хорошо перемешивают и оставляют при той же температуре (0 , $15-20$, 45 и $75^{\circ}C$).

Через 5 мин после того, как в пробирки добавили слюну, из каждой из них берут по 1-2 капли жидкости и вносят в заготовленные пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрасится в синий цвет, реакцию повторяют через 5 мин со вновь приготовленными пробирками с раствором йода, а затем повторяют еще через 5 мин.

Различная окраска при реакции с йодом, а, следовательно, разная степень гидролиза крахмала обусловлена разной скоростью ферментативного катализа при разных температурных условиях опыта. В работе важно уловить нужный момент для йодной пробы, так как при длительном гидролизе полное расщепление крахмала может произойти и при низких температурах опыта. Результаты работы оформляются в виде табл. 5.7, делаются выводы.

Таблица 5.7 – Влияние температуры на действие фермента

Температура	Окраска крахмала с йодом через определенное время (мин)	
	5	10
1 (15-20°C)		
4 (45°C)		
3 (75°C)		
2 (0°C)		

1 – комнатная температура

2 – снег

3 – водяная баня

4 – термостат

Контрольные вопросы к лабораторной работе

- 1) Как активность фермента (амилазы) зависит от температуры?
- 2) При какой температуре фермент денатурирует (утрачивает природную структуру) и инактивируется (утрачивает функции)?
- 3) Какой диапазон температур для амилазы является оптимальным и почему?

5.10 Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Амилаза – фермент, гликозил – гидролаза, расщепляющий крахмал до олигосахаридов, относится к ферментам пищеварения.

По субстратной специфичности амилазы классифицируют на альфа-, бета- и гамма-амилазу. α -Амилаза является кальций-зависимым ферментом. К этому типу относятся амилаза слюнных желез и амилаза поджелудочной железы. Она способна гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов в любом месте. Таким образом, процесс гидролиза ускоряется и приводит к образованию олигосахаридов различной длины. У животных α -амилаза является основным пищеварительным ферментом. Активность α -амилазы оптимальна в нейтральной среде (pH = 6,7-7,0). Фермент обнаружен также у растений (например, в овсе), в грибах (в аскомицетах и базидиомицетах) и бактериях.

β -Амилаза присутствует у бактерий, грибов и растений, но отсутствует у животных. Она отщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь, образуя, таким образом, дисахарид мальтозу. При созревании фруктов β -амилаза расщепляет плодовой крахмал на сахара, что приводит к сладкому вкусу зрелых плодов. В семенах β -амилаза активна на стадии, предшествующей прорастанию, тогда как α -амилаза важна при непосредственно прорастании семени.

β -Амилаза пшеницы является ключевым компонентом при образовании солода. Бактериальная β -амилаза участвует в разложении внеклеточного крахмала.

γ -Амилаза отщепляет последнюю α -1,4-гликозидную связь, приводя к образованию глюкозы. Кроме этого, γ -амилаза способна гидролизовать α -1,6-гликозидную связь. В отличие от других амилаз, γ -амилаза наиболее активна в кислых условиях (при pH = 3).

Крахмал - $(C_6H_{10}O_5)_n$ белый порошок, нерастворимый в холодной воде и образующий коллоидный раствор в горячей воде. Это природный полимер.

Его молекулы состоят из линейных и разветвленных цепей, содержащих остатки α -глюкозы. Фрагмент структуры крахмала (рисунок 5.3) выглядит следующим образом:

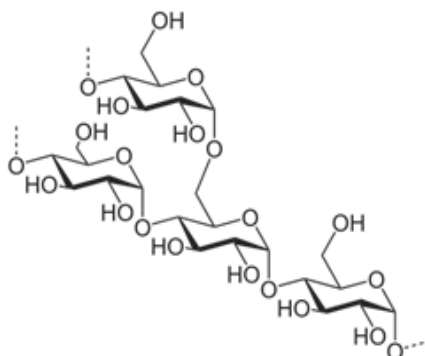


Рисунок 5.3 – Структура молекулы крахмала

Крахмал является природным высокомолекулярным соединением и представляет собой смесь двух полисахаридов: амилозы и амилопектина. Число повторяющихся звеньев в различных молекулах амилозы и амилопектина варьируется от нескольких сотен до нескольких тысяч. Поэтому говорят только о средней молекулярной массе крахмала.

В горячей воде крахмальные зерна набухают и образуют коллоидный раствор, называемый крахмальным клейстером. Крахмал не обладает сладким вкусом.

Крахмал способен гидролизоваться при нагревании в кислой среде, в присутствии воды и дает интенсивное синее окрашивание с йодом - это качественная реакция на йод.

Крахмал может образовывать эфиры за счет гидроксильных групп, однако они не имеют практического значения.

Принцип метода. Вещества, увеличивающие каталитическое действие фермента, называются активаторами. Активаторы обычно не входят в состав самого фермента, но образуют с ним комплексные соединения в процессе катализа и способствуют протеканию реакции. Вещества, тормозящие активность фермента, называются ингибиторами. Среди активаторов и ингибиторов часто встречаются ионы

металлов, входящие в состав различных солей. Для амилазы слюны активаторами являются ионы Ca^{2+} , Zn^{2+} , NaCl , а ингибитором - Cu^{2+} .

Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных препаратов. Данное направление является перспективным, к настоящему времени получены новые лекарственные препараты для лечения гипертонической болезни – ингибиторы АПФ (ангиотензинпревращающего фермента), лечения атеросклероза – ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины), снижающие синтез холестерина. В больших дозах ингибиторы могут оказаться ядами.

Ход работы. Берут три пробирки и наливают в первую – 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 8 капель дистиллированной воды и 2 капли 1% раствора хлорида натрия, в третью – 8 капель дистиллированной воды и 2 капли 1% раствора медного купороса. В каждую пробирку добавляют по 10 капель слюны, разведенной 5 раз (2 капли слюны и 8 капель воды) и по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 5 мин.

В три другие пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1 капле 0,1% раствора йода. Через 5 мин из каждой пробирки, в которой проводят опыт, отбирают по 2–3 капли содержимого и переносят с пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрасится в синий цвет, реакцию повторяют еще через 5 мин со вновь приготовленными пробирками с раствором йода, а затем повторяют еще через 5 мин. Различная окраска при реакции с йодом, а следовательно, разная степень гидролиза крахмала обусловлена разной скоростью ферментативного катализа при добавлении различных веществ. Результаты работы оформляются в виде таблицы 5.8 и делаются выводы.

Таблица 5.8 – Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ пробирки	Фермент	Эффектор	Субстрат	Наблюдения
1	Амилаза	NaCl	Крахмал	
2	Амилаза	CuSO ₄	Крахмал	
3	Амилаза	H ₂ O	Крахмал	

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Какое вещество является катализатором в данной реакции и почему.
2. Какое вещество является ингибитором.
3. Какой механизм ингибирования в данной реакции.
4. Какие виды ингибирования ферментов вы знаете.

5.11 Очистка алкогольдегидрогеназы методом гель - хроматографии

Принцип метода. Гель - хроматография – это способ разделения веществ на основе разницы в их молекулярной массе (размера частиц). В качестве носителей в гель-хроматографии используются сефадексы (G -10, G -15, G - 25, G - 50, G - 75, G - 100, G - 150, G - 200), основой которых является полисахарид декстран, сшитый поперечными связями, формирующими трехмерную сетчатую структуру с высокой степенью гидрофильности за счет большого количества на их поверхности полярных гидроксильных групп. Сефадекс не растворим в воде и стабилен в кислотных, щелочных и солевых растворах. После погружения в воду сефадекс набухает, приобретая способность фракционировать различные молекулы в зависимости от их размера. Крупные частицы, имеющие более высокую молекулярную массу, двигаются значительно быстрее частиц меньших размеров, которые задерживаются внутри гранул сефадекса.

Таким образом достигается разделение (фракционирование) молекул, которое используется для:

- а) обессоливания растворов;
- б) отделения мелких по размеру и молекулярной массе молекул от крупных.

Гель-фильтрация используется для очистки ферментов от субстратов и кофакторов или белков от аминокислот и пептидов и т. д.

Оборудование: фотоэлектроколориметр с проточной кюветой или Uvicord (ЛКВ, Швеция), хроматографическая колонка (1x30 см), лиофильная сушка.

Посуда: стакан; пипетка на 5 мл; пробирки для сбора фракций элюции - 50 шт.

Реактивы: 500 мл 0,05 М раствор глицина; 100 мл 96%-ный этанол; сефадекс G - 25 fine. Приготовление рабочих растворов. Раствор глицина готовится путем растворения 1,875 г глицина в 500 мл дистиллированной воды.

Хроматографическая колонка наполняется сефадексом G-25 fine, который предварительно набухал в течение 24 ч при комнатной температуре в дистиллированной воде. Перед употреблением колонка промывается 0,05 М раствором глицина.

Построение калибровочного графика. В работе используют калибровочный график, построенный для определения белка по Лоури.

Ход работы. Семена пшеницы гомогенизируют на механическом гомогенизаторе до получения однородной массы. Затем добавляют 0,05 М раствор глицина в соотношении 1:3 (на 1 г семян 3 мл раствора). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат центрифугируют 10 мин при 7000 g. В супернатант добавляют этанол до 70% концентрации, интенсивно встряхивают в течение 5 мин, смесь центрифугируют. Осадок после растворения в небольшом количестве 0,05 М раствора глицина наносят на колонку (1 x 30 см) с сефадексом G-25 fine, уравновешенную 0,05 М раствором глицина, элюирование проводят этим же раствором. Оптическую плотность элюируемых растворов измеряют при 280 нм с помощью прибора Uvicord (ЛКВ, Швеция) или на спектрофотометре оборудованном проточной кюветой. Фракции с наибольшей активностью и малым

фоном лиофилизируют. Образец содержит 90-95% алкогольдегидрогеназы от общего содержания белка. Концентрацию белка определяют по биуретовой реакции или методу Лоури.

Выход по белку, активности рассчитывают по показателям общего белка и общей активности, принимая их за 100% у исходных образцов, а степень очистки по величинам удельной активности, принимая показания исходных образцов за единицу.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Что такое гель – хроматография?
2. Что такое сефадексы. Где они используются и какими свойствами обладают?
3. За счет чего происходит разделение фракций при гель – хроматографии?

5.12 Обнаружение НАД в дрожжах

Принцип метода

НАД встречается во многих органах и тканях человека и животных, богаты им и дрожжи. Этот кофермент легко извлекается из дрожжей горячей водой (он термостабилен) и может быть обнаружен по образованию флуоресцирующего комплекса с ацетоном. Эта реакция характерна для N-производных амида никотиновой кислоты. Он применяется для определения метилникотинамида в моче.

Реактивы, исследуемый материал:

- 1) ацетон;
- 2) раствор NaOH – 300 г/л;
- 3) концентрированная соляная кислота;
- 4) спиртовой раствор фенолфталеина – 5 г/л;
- 5) дрожжи.

Ход работы

В пробирку помещают кусочек дрожжей величиной 4-5 мм, добавляют 1/3 пробирки воды и кипятят 20-30 сек., не допуская выбрасывания жидкости. Отфильтровывают в пустую пробирку 5-10 капель полученного экстракта, добавляют 3-5 капель ацетона и 1-2 капли раствора едкого натра. Оставляют пробирку на 2 мин.; затем добавляют 1 каплю раствора фенолфталеина и по каплям соляную кислоту до обесцвечивания фенолфталеина. Пробирку в процессе добавления кислоты встряхивают. Поместить пробирку на 2 мин. в кипящую водяную баню, затем охладить и поднести к включенному флуориметру.

Ацетоновый комплекс НАД флуоресцирует синим светом.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Что такое НАД и какую функцию он выполняет в ферментативном катализе?
2. В состав каких ферментов входит НАД?
3. На каком явлении основано определение НАД в дрожжах?

5.13 Обнаружение цитохромоксидазы в мышцах

Принцип метода

Цитохромоксидаза – заключительный фермент в цепи переноса электронов и протонов. Он способен окислять при участии кислорода не только цитохромы, но и некоторые другие соединения, в частности диметилпарафенилендиамин и а-нафтол. При окислении двух последних соединений образуется индофеноловая синь. Указанная реакция не протекает в тканях человека и животных, однако широко используется для обнаружения цитохромоксидазы. По первым слогам слов «нафтол» и «диметил» она была названа реакцией НАДИ, а реактив, содержащий нафтол и диметилпарафенилендиамин, реактивом НАДИ.

Реактивы, исследуемый материал: реактив НАДИ (готовят за 1 час до определения): 1 % водный раствор диметилпарафенилендиамина смешивают с

равным объёмом 1 % спиртового раствора, 1,5 % а-нафтола и 1,5 % раствора карбоната натрия; кусочек мышечной ткани.

Ход работы

В ступке с водой растирают кусочек мышцы. Часть полученной переносят в пробирку и подвергают тщательному кипячению. Затем кусочки мышцы, оставшиеся в ступке, и кусочки из пробирки отделяют от избытка воды фильтрованием. Фильтры с кусочками мышцы разворачивают. На мышцу наносят по 2-3 капли реактива НАДИ. Ненагретая мышца постепенно окрашивается в сине-фиолетовый цвет, а нагретая, где цитохромоксидаза инактивирована, окраски не дает.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип работы, ход (кратко). Сделайте выводы о свойствах НАД.

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Почему восстановление водородом метиленового синего происходит раньше, чем рибофлавина?

5.14 Обнаружение каталазы в крови

Принцип метода

При окислительных процессах может образовываться перекись водорода, которая разлагается ферментом каталазой (содержится в различных клетках, включая клетки крови) на воду и молекулярный кислород.

Реактивы, исследуемый материал:

раствор перекиси водорода – 30 г/л; кровь.

Ход работы

В пробирку следует внести 10-15 капель перекиси водорода и 3 капли крови. Отметить выделение пузырьков кислорода. При внесении в пробирку тлеющей лучинки она вспыхивает, так как выделяющийся кислород усиливает горение.

Указания к оформлению лабораторной работы

Результаты сравнивают по интенсивности окраски и делают заключение об открытии окислительного фосфорилирования и разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс.

5.15 Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение её активности

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.2) катализирует превращение янтарной кислоты в fumarовую. Кофактором фермента является ФАД. Фермент прочно связан с внутренней мембраной митохондрий.

Принцип метода

В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода краситель синего цвета 2,6 - дихлорфенолиндофенол, который восстанавливается в бесцветную лейкоформу. Конкурентное торможение фермента вызывает структурный аналог янтарной кислоты - малоновая кислота.

Реактивы: краситель - 2,6 - дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор;

фосфатный буфер, 1/15 М, рН 7,4; NaOH, 0,1 н. раствор; янтарная кислота (сукцинат), 3 % раствор (0,6 М);

малоновая кислота (малонат), 3 % раствор.

Ход работы

1-2 г свежей мышцы измельчают ножницами и растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную кашу переносят на двойной слой

марли, промывают 25 мл дистиллированной воды, отжимают и суспендируют в 4 мл воды. Суспензию разливают по 1 мл в четыре пробирки.

Содержимое первой пробирки кипятят в течение 12 мин. для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактивы согласно таблице 5.9:

Таблица 5.9 – Порядок выполнения работы

Номер пробирки	Количество реагента, мл			Краситель, капли
	Сукцинат	Вода	Малонат	
1 пробирка	1	0,5	-	2
2 пробирка	1	0,5	-	2
3 пробирка	-	1,5	-	2
4 пробирка	1	-	0,5	2

Через 15 мин. наблюдают, исчезновение синей окраски только во второй пробирке.

Указания к оформлению лабораторной работы

Результаты работы оформляют в виде таблицы, в которой указывают фермент, кофактор, донор электронов (в ткани или опыте), акцептор электронов (в ткани или опыте), продукт реакции (окраска), вывод.

6 Перечень вопросов, выносимых на экзамен

Раздел 1. Общие принципы структурной организации белков и молекулярные механизмы их сворачивания в функционально активную конформацию

1. Определение энзимологии как науки. Номенклатура и классификация ферментов (6 основных классов). Принципы построения названий ферментов. Привести примеры.

2. Понятие о мономерах и олигомерах. Первичная, вторичная и третичная структура белков мономеров. Элементы вторичной структуры белка.

3. Структура олигомерных ферментов. Гомогенные и гетерогенные олигомеры. Понятие изоферментов и принципы их классификации.

4. Надмолекулярная организация ферментов. Мультиферментные комплексы. Мультиферментные конъюгаты. Мультиферментные ансамбли.

5. Понятие о протетической группе в составе сложных ферментов. Определения понятий апофермента, кофактора, кофермента. Кофакторы ферментов (неорганические и органические) и их роль в работе ферментов.

6. Принципы пространственной организации молекулы ферментов. Силы, стабилизирующие третичную структуру белка.

7. Понятие об энергии активации, энтальпии и энтропии. Значение водородных связей в формировании нативной структуры ферментов.

8. Физическая форма третичной структуры ферментов.

9. Роль дисульфидных ковалентных связей в формировании третичной структуры белка.

10. Механизм сворачивания белка в третичную конформацию. Парадокс С. Левинталя и его решение. Свойства нативной конформации белка.

11. Стадии сворачивания белка. Иерархический принцип сворачивания.

12. Внутриклеточная регуляция формирования пространственной структуры белка. Два механизма регуляции: скорости сворачивания и защиты белка от неспецифической агрегации.

13. Понятие о шаперонах и шаперонинах. Их значения в формировании третичной структуры белка – фермента.

14. Структура активного центра фермента. Монокомпонентные и двухкомпонентные АЦ. Строение двухкомпонентных АЦ.

15. Формирование активного центра фермента. Характеристика нуклеофильных и электрофильных R-групп, входящих в структуру активного центра.

16. Локализация активного центра фермента. Свойства среды активного центра ферментов.

Раздел 2 Общие вопросы кинетики и термодинамики ферментативных реакций

1. Основные понятия термодинамики. Определение ТС и ее виды. Открытые, закрытые изолированные ТС.

2. Первый закон термодинамики. Определение и формулировка. Понятие энергии в ТС.

3. Второй закон термодинамики. Определение и формулировка закона.

4. Термодинамический процесс. Определение и его виды.

5. Энтальпия и энтропия. Определение и методика расчета.

6. Характеристические функции в термодинамике.

7. Химическая кинетика. Порядок реакции и его определение. Привести примеры.

8. Уравнение Михаэлиса-Ментена.

9. Ограничения кинетики Михаэлиса-Ментена

10. Семь основных постулатов для выполнения уравнения Михаэлиса-Ментена.

11. Обоснование первого постулата для выполнения уравнения Михаэлиса-Ментена. Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса.

12. Природа константы K в уравнении Михаэлиса-Ментена. График зависимости скорости ХФР от концентрации субстрата.

13. Приближенное решение уравнения Михаэлиса-Ментена в случае больших времен протекания реакции.

14. Зависимость скорости ХФР от концентрации субстрата.

15. Зависимость скорости ХФР от концентрации фермента.

Раздел 3 Механизмы регуляции активности ферментов

1. Определение метаболизма и его направления. Виды механизмов регуляции: интенсивные и экстенсивные. Понятие о конститутивных и адаптивных ферментах

2. Классификация механизмов регуляции активности ферментов по интенсивному пути.

3. Виды ингибирования. Конкурентное и бесконкурентное ингибирование.

4. Необратимая ковалентная модификация (ограниченный протеолиз).

5. Обратимая ковалентная модификация. Регуляция ковалентным связыванием.

6. Понятие об активаторах и ингибиторах. Обратимое и необратимое ингибирование ферментов.

7. Механизмы регуляции активности ферментов без ковалентной модификации.

8. Согласованный аллостерический механизм регуляции.

9. Виды аллостерического взаимодействия (гомotropное и гетеротропное)

10. Механизмы регуляции активности ферментов без ковалентной модификации.

11. Последовательный аллостерический механизм регуляции.
12. Регуляция активности ферментов специфическими лигандами: субстратом и специфическим эффектором.
13. Механизмы регуляции активности ферментов без ковалентной модификации.
14. Диссоциативный механизм регуляции. Понятие протомеров, химеров. Два типа образования ассоциаций протомеров в химеры: изоэволюционных и гетерологических. Их значение в регуляции активности ферментов.
15. Механизмы регуляции активности ферментов без ковалентной модификации. Адсорбционный механизм регуляции. Его физиологическое значение, локализация адсорбированных форм ферментов на субклеточных структурах. Понятие компартментализации метаболитов на мембране.
16. Три основных механизма адсорбционной регуляции.
17. Значение адсорбционного механизма регуляции. Компартментализация метаболитов
18. Эстафетная модель работы ферментов.
19. Адсорбционный механизм регуляции, его значение и «эстафетная модель» работы ферментов.

Раздел 4 Синтез белков и пептидов

1. Схема определения структуры белка.
2. Этапы определения первичной структуры белка.
3. Методы ферментативного гидролиза полипептидной цепи.
4. Метод кислотного гидролиза полипептидной цепи.
5. Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов.

6. Понятия о защитных группах.

7. Защитные группировки, используемые в пептидном синтезе.

8. Методы создания пептидной связи: хлорангидридный, азидный, карбодиимидный, карбоксиангидридный методы.

7 Фонд тестовых заданий

1.1 Согласно современной международной номенклатуры в названии ферментов используются:

- а) исторические названия;
- б) названия ферментов по типу катализируемой реакции;
- в) названия ферментов по наименованию субстрата реакции;
- г) по структуре фермента;
- д) по классам, подклассам и подподклассам.

1.2 Структурно обособленные и пространственно отдаленные друг от друга области белковой молекулы, обладающие определенной структурной автономией называются:

- а) субъединицами;
- б) конъюгатами;
- в) доменами;
- г) активными центрами.

1.3 В основе номенклатуры изоферментов (порядкового номера) находится:

- а) количество субъединиц;
- б) молекулярная масса;
- в) электрическая подвижность в катализе;
- г) химическая активность в катализе.

1.4 Какие ферменты катализируют реакции изомеризации:

- а) оксидоредуктазы;
- б) лигазы;
- в) гидролазы;
- г) изомеразы.

1.5 Какие ферменты катализируют реакции расщепления субстрата с образованием неопредельного вещества:

- а) оксидоредуктазы;
- б) лигазы;
- в) гидролазы;
- г) лиазы;
- д) трансферазы.

1.6 Какие группы ферментов выделяют по строению белковой молекулы:

- а) мономорфные;
- б) мономерные;
- в) мультиферментные;
- г) олигомерные;
- д) изомерные.

1.7 Гомогенный олигомер состоит:

- а) из одинаковых субъединиц;
- б) из разных субъединиц;
- в) из одинаковых доменов;
- г) из разных доменов;

1.8 Олигомер, состоящий из четырех субъединиц двух видов может иметь:

- а) 2 изомера;
- б) 6 изомеров;
- в) 4 изомера;
- г) 5 изомеров.

1.9 Участки гидрофобных АКО, расположенные на гидрофильной оболочке фермента, выполняют роль (один вариант ответа):

- а) ингибитора;
- б) активатора;
- в) субстрат-связывающей площадки;
- г) продукт-связывающей площадки.

1.10 В процессе сворачивания белок-фермент стремится уменьшить поверхность раздела, чтобы (один вариант ответа):

- а) увеличить потери энтропии;
- б) уменьшить потери энтропии;
- в) увеличить энтальпию;
- г) уменьшить энтальпию.

1.11 В первую стадию сворачивания белка-фермента происходит:

- а) Образование олигомеров;
- б) Образование полипептидов первичной структуры;
- в) образование элементов вторичной структуры;
- г) образование элементов супервторичной структуры белка.

Раздел 2 Общие вопросы кинетики и термодинамики ферментативных реакций

2.1 Совокупность тел или веществ, участвующих в обмене веществ или энергии между собой и окружающей средой, называется

- а) открытой термодинамической системой;
- б) закрытой термодинамической системой;
- в) изолированной термодинамической системой;
- г) нет правильного ответа

2.2 К интенсивным свойствам термодинамической системы можно отнести

- а) температуру
- б) давление;
- в) вес;
- г) объем.

2.3 Признаками равновесного ТП в ТС является:

- а) работа, совершаемая над системой максимальная
- б) работа, совершаемая над системой минимальная
- в) работа, совершаемая самой системой минимальная
- г) работа, совершаемая самой системой максимальная

2.4 Эндотермические реакции в ТС сопровождаются:

- а) повышением энтальпии
- б) понижением энтальпии
- в) $-dH$
- г) $+dH$

2.5 Если значение dS в ТС увеличивается, то это:

- а) увеличение упорядоченности молекул вещества
- б) уменьшение упорядоченности молекул вещества
- в) увеличение степеней свободы вращательного движения молекул
- г) уменьшение степеней свободы вращательного движения молекул

2.6 Законы термодинамики могут быть применимы к:

- а) открытым термодинамическим системам
- б) закрытым термодинамическим системам
- в) изолированным термодинамическим системам
- г) нет правильного ответа

2.7 К экстенсивным свойствам термодинамической системы можно отнести:

- а) температуру
- б) давление
- в) вес
- г) объем

2.8 Признаками неравновесного термодинамического процесса в системе является

- а) работа, совершаемая над системой максимальная
- б) работа, совершаемая над системой минимальная
- в) работа, совершаемая самой системой минимальная
- г) работа, совершаемая самой системой максимальная

2.9 Экзотермические реакции в ТС сопровождаются

- а) повышением энтальпии
- б) понижением энтальпии
- в) $-dH$
- г) $+dH$

2.10 Если значение dS в ТС уменьшается, то это свидетельствует об

- а) увеличение упорядоченности молекул вещества
- б) уменьшение упорядоченности молекул вещества
- в) увеличение степеней свободы вращательного движения молекул
- г) уменьшение степеней свободы вращательного движения молекул

2.11 С точки зрения физики, порядок химической реакции определяется

- а) последовательностью взаимодействия реагирующих веществ
- б) количеством одновременно реагирующих веществ

- в) количеством взаимодействующих молекул реагирующих веществ
- г) количеством взаимодействующих молей реагирующих веществ

2.12 Если в химической реакции участвует 1-а молекула вещества, то порядок реакции

- а) нулевой
- б) мономолекулярный
- в) бимолекулярный
- г) тетрамолекулярный

2.13 Скорость ферментативной реакции от концентрации фермента

- а) не зависит
- б) зависит прямо пропорционально (линейно)
- в) зависит нелинейно
- г) зависит обратно пропорционально (линейно)

2.14 Признаком стационарности химической ферментативной реакции является

- а) постоянная скорость реакции
- б) постоянная концентрация реагирующих веществ
- в) отношение изменения скорости реакции к изменению времени реакции равно «нулю»
- г) все выше перечисленное

2.15 Скорость ферментативной реакции определяется

- а) активностью фермента в единицах активности
- б) числом оборотов реакции за единицу времени
- в) удельной активностью
- г) нет правильного ответа

Список использованных источников

1 Биохимия: учебник / Под ред. Е.С. Северина. - 3-е изд., испр. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2005. - 784 с.: ил. - ISBN 5-9704-0012-2.

2 Биохимия: учеб. для студентов мед. вузов / под ред. Е. С. Северина.- 5-е изд. - М. : ГЭОТАР - Медиа, 2009. - 766 с. : ил. - Прил. : с. 735-760. - Предм. указ.: с. 748-760. - ISBN 978-5-9704-1195-7.

3 Биохимия: краткий курс с упражнениями и задачами / Под ред. члена-корреспондента РАН, проф. Е.С. Северина, проф. А.Я. Николаева. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. - 448 с.: ил. - (XX век). - ISBN 5-9231-0053-3.

4 Биохимия: руководство к практическим занятиям : учебное пособие / Под ред. проф. Н.Н. Чернова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 240 с.: ил. - ISBN 978-5-9704-1287-9.

5 Зубаиров, Д.М., Тимербаев В.Н., Давыдов В.С. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии /Д.М., Зубаиров, В.Н. Тимербаев, В.С. Давыдов.— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. - 392 с.: ил. - ISBN 5-9704-0007-6

6 Комов, В. П. Биохимия: учеб. для вузов / В. Т. Комов, В. Н. Шведова .- 3-е изд., стер. - М. : Дрофа, 2008. - 640 с. - (Высшее образование: Современный учебник). - Предм. указ.: с. 620-630. - ISBN 978-5-358-04872-0.

7 Клиническая биохимия: учеб. пособие для студентов мед. вузов / под ред. В. А. Ткачука .- 3-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 462 с. : ил.. - Библиогр.: с. 430. - Предм. указ.: с. 451-454. - ISBN 978-5-9704-0733-2.

8 Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём; пер. с нем. - 3-е изд. - М.: Мир; БИОНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 469 с.: ил. - ISBN 978-5-9963-0126-3 (БИОНОМ. ЛЗ), ISBN 978-5-03-003811-7.

9 Мусил, Я. Современная биохимия в схемах / Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц ; пер. с англ. С. М. Аваевой, А. А. Байкова. - М. : Мир, 1981. - 215 с : ил.. - Библиогр.: с. 208.

10 Науменко, О. А. Основы строения и кинетики ферментов в биологических

системах : учебное пособие / О. А. Науменко. - Оренбург : ОГУ. - 2017. - 182 с. : ISBN 978-5-7410-1666-4.

11 Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия : учебное пособие / Ю.А. Овчинников. - Москва : Просвещение, 1987. - 815 стр.

12 Практикум по биохимии: учеб. пособие / под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : МГУ, 1989. - 509 с. : ил. - ISBN 5-211-00406-X.

13 Рогожин, В. В. Практикум по биологической химии: учеб.-метод. пособие / В. В. Рогожин. - СПб. : Лань, 2006. - 256 с. : ил. - Библиогр. в конце гл. - ISBN 5-8114-0679-7.

14 Теоретические основы биохимии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Е. С. Барышева, О. В. Баранова, Т. В. Гамбург; М-во образования и науки Рос. Федерации, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: Kb). - Оренбург : ГОУ ОГУ, 2011. - 362 с. - Adobe Acrobat Reader 5.0. Издание на др. носителе [Текст] . - № гос. регистрации 0321102524. http://artlib.osu.ru/web/books/metod_all/11_20110615.pdf

Ответы для самоконтроля

Раздел 1	а), б)
1.1	2.3
д)	б), г)
1.2	2.4
в)	а), г)
1.3	2.5
в)	б), в)
1.4	2.6
г)	б), в)
1.5	2.7
г)	в), г)
1.6	2.8
б), г)	а), в)
1.7	2.9
а)	б), в)
1.8	2.10
г)	а), г)
1.9	2.11
в)	в), г)
1.10	2.12
б)	б)
1.11	2.13
в)	б)
Раздел 2	2.14
2.1	г)
а)	2.15
2.2	б), в)

