

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ



Доцент кафедры биохимии

Леднёва И.О.

# ПЛАН ЛЕКЦИИ

- Кинетика ферментативных реакций.
- Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, pH, концентрации фермента.
- Типы ингибирования. Применение ингибиторов ферментов в медицине.
- Механизмы регуляции активности ферментов.

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Изучает закономерности влияния химической природы реагирующих веществ (фермента, субстрата) и условий их взаимодействия (концентрация, рН, температура, присутствие активаторов или ингибиторов и др.) на скорость ферментативных реакций.

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- В 1913 г. **Леонор Михаэлис** и **Мауд Ментен** предложили модель расчета кинетических характеристик ферментативных реакций.



Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

- Ввели понятие фермент-субстратного комплекса (ES).
- Вывели уравнение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]}$$

$K_s$  – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Уравнение **Михаэлиса-Ментен** не учитывает влияние на скорость ферментативной реакции **продуктов реакции**.
- Было предложено уравнение **Бриггса-Холдейна**:

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

$K_m$  – константа **Михаэлиса**

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Для определения  $K_m$  находят ту концентрацию  $S$ , при которой скорость реакции  $V$  составляет  $\frac{1}{2}$  от  $V_{max}$ .

Подставляя значение  $V$  в уравнение Бриггса-Холдейна получаем:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Разделив обе части уравнения на  $V_{\max}$ , получим:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Или:  $K_m + [S] = 2 [S] \longrightarrow K_m = [S]$



# $K_m$ – КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА

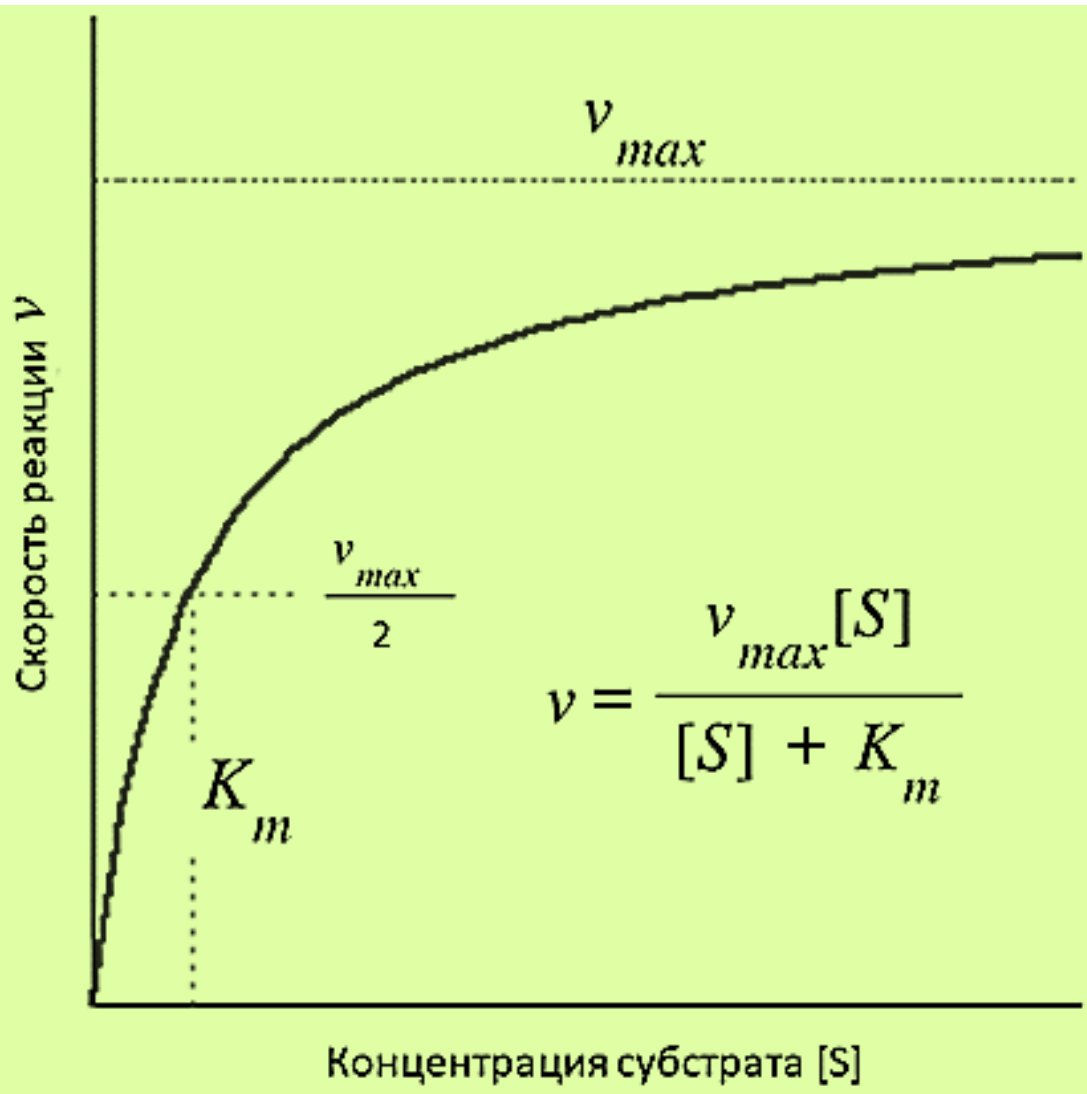
$K_m$  равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость ферментативной реакции равна половине от максимальной.

$K_m$  характеризует

сродство фермента к субстрату

(чем **выше**  $K_m$ , тем **ниже** сродство фермента к субстрату).

# ГРАФИК УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

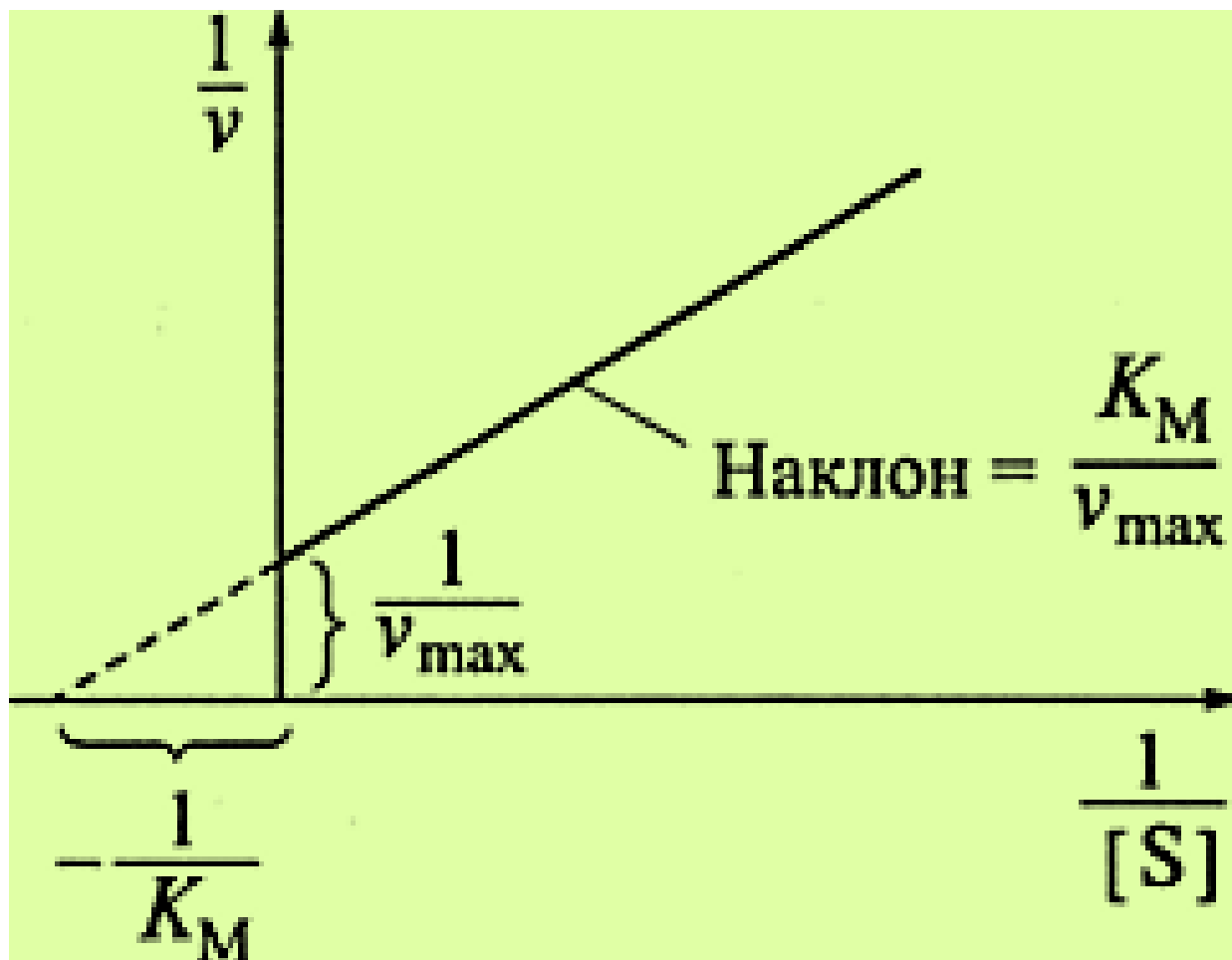


# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Использование графика, предложенного Михаэлисом и Ментен не позволяет точно определить величины  $V_{max}$  и  $K_m$ .
- Г. Лайнуивер и Д. Бэрк преобразовали уравнение Холдейна-Бриггса по методу двойных обратных величин:

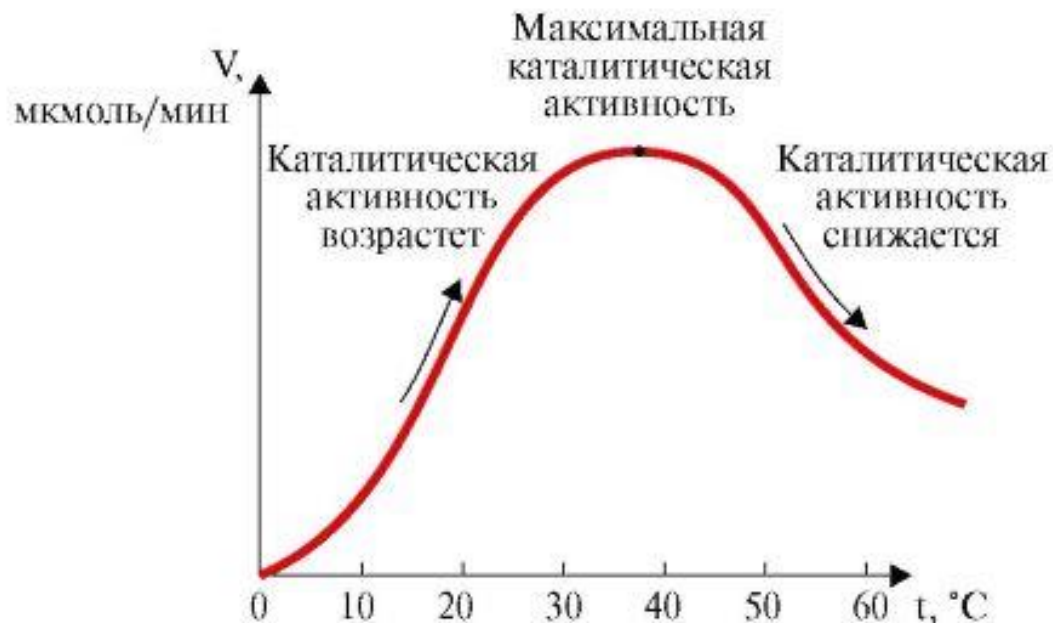
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

# ГРАФИК УРАВНЕНИЯ ЛАЙНУИВЕРА-БЭРКА

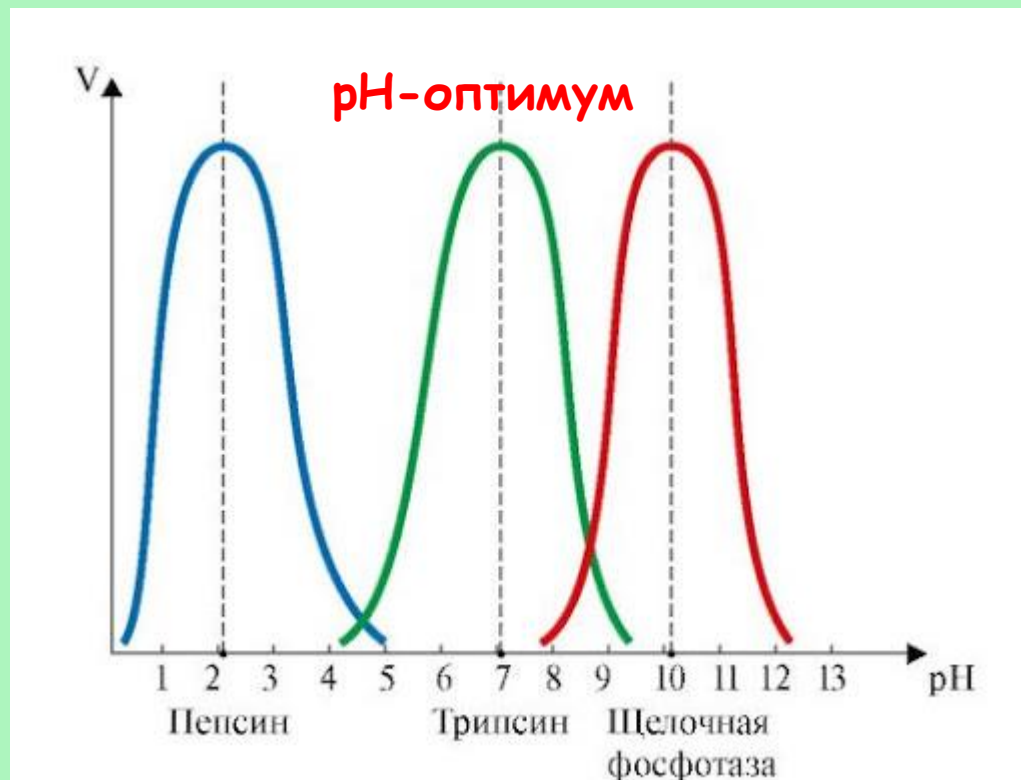


# ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH

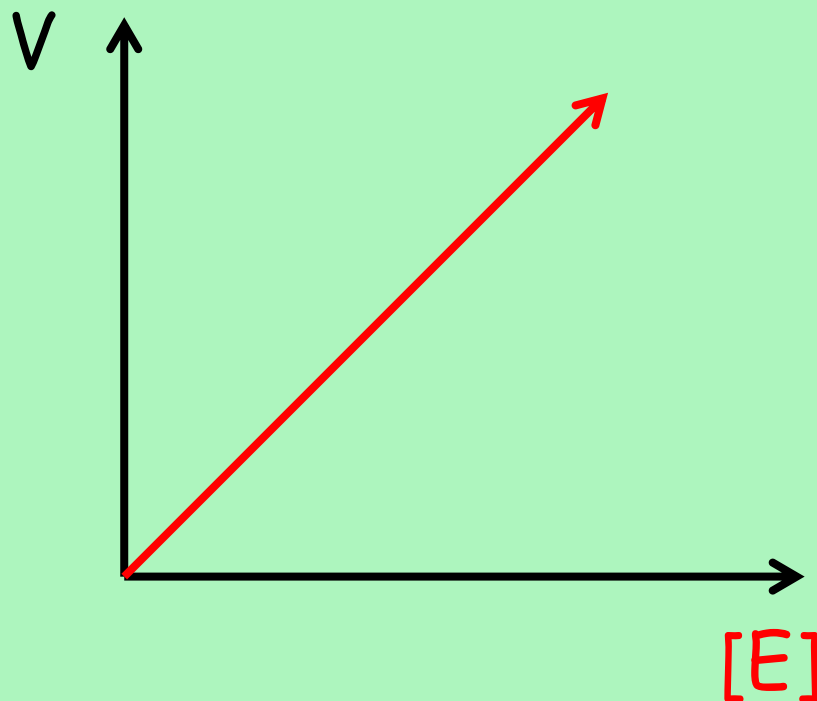
- См. предыдущую лекцию



# ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ pH



# ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА



Скорость реакции **прямо пропорциональна** концентрации **фермента** (в начальный период ферментативной реакции, когда концентрация **продукта** реакции незначительна).

# МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ: ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ

- **Активаторы** – вещества, повышающие скорость ферментативной реакции:
- 1) формируют **активный центр** фермента ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ );
- облегчают образование **E-S комплекса** ( $\text{Mg}^{2+}$ );
- восстанавливают **SH-группы** (глутатион);
- стабилизируют **нативную структуру** белка-фермента.



# ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ

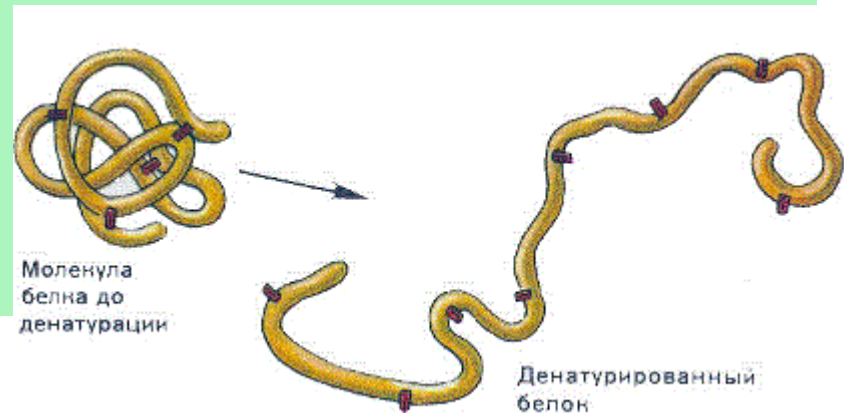
- Соляная кислота активирует **пепсин** желудочного сока;
- **желчные кислоты** повышают активность панкреатической **липазы**;
- **глутатион** активирует **оксидоредуктазы**;
- **апопротеин-І** активирует **ЛХАТ**.

# Типы ингибирования

- **Неспецифическое**
- **Специфическое:**
  - а) **необратимое**
  - б) **обратимое:**
    - **конкурентное**
    - **неконкурентное**
    - **бесконкурентное**

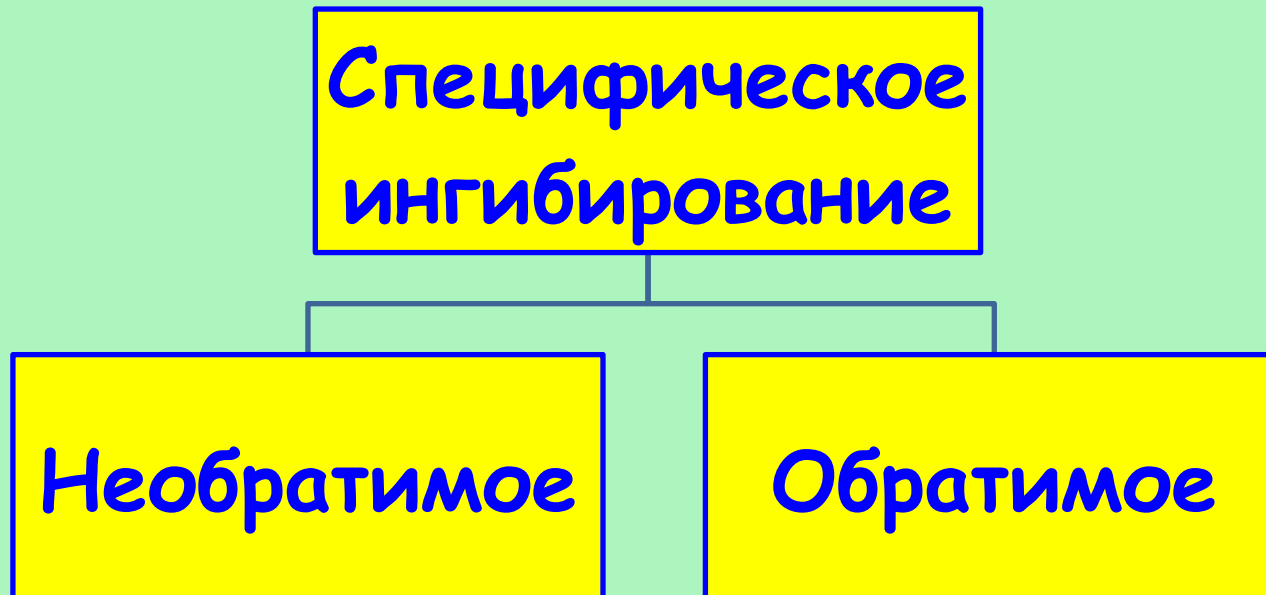
# Неспецифическое ингибирование

- Неспецифические ингибиторы **вызывают денатурацию фермента** (кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов и др.).
- Их действие не связано с **механизмом ферментативного катализа.**



# Специфическое ингибирование

- Специфические ингибиторы – их действие связано с механизмом ферментативного катализа.



# Необратимое ингибирование

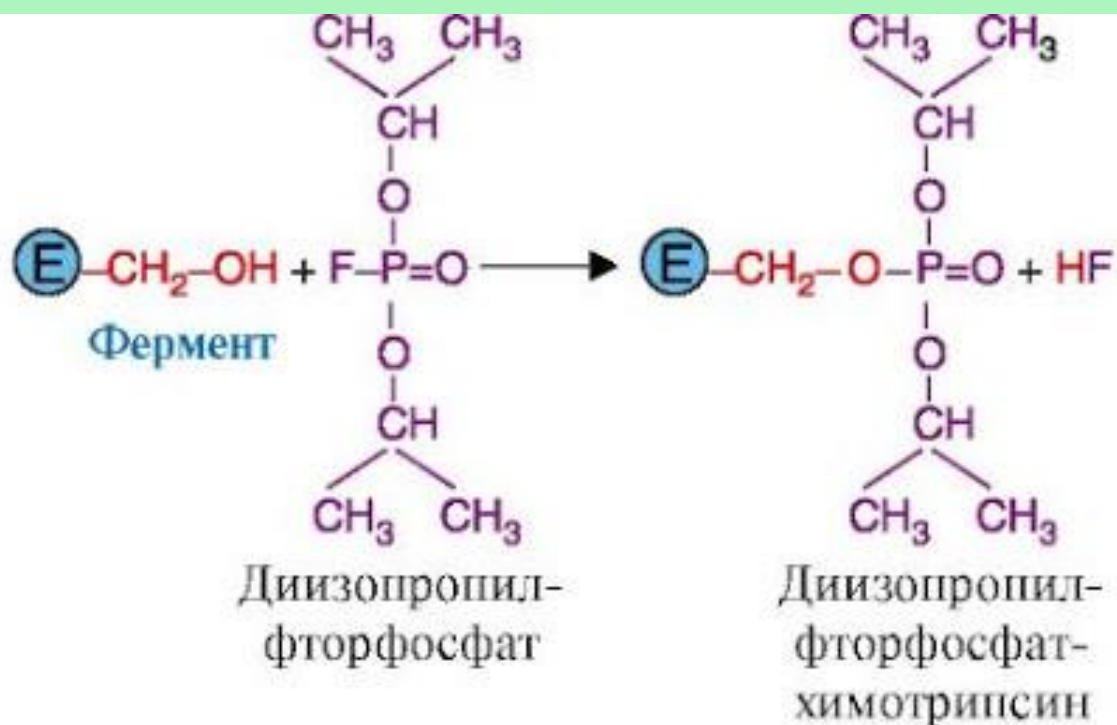
- Наблюдается при образовании **ковалентных стабильных связей** между молекулой ингибитора и фермента.
- Модификации чаще всего подвергается **активный центр** фермента.
- Фермент не может выполнять **каталитическую функцию**.

# Необратимые ингибиторы

- Ингибиторы металлосодержащих ферментов – **дыхательные яды** (HCN, KCN, CO);
- Вещества, связывающие **SH-группы АЦ** (монойодацетат, соединения ртути и мышьяка);
- Вещества, связывающие **ОН-группы серина в АЦ** – **фосфоорганические соединения** – боевые отравляющие вещества (**ДФФ**).



# Необратимые ингибиторы



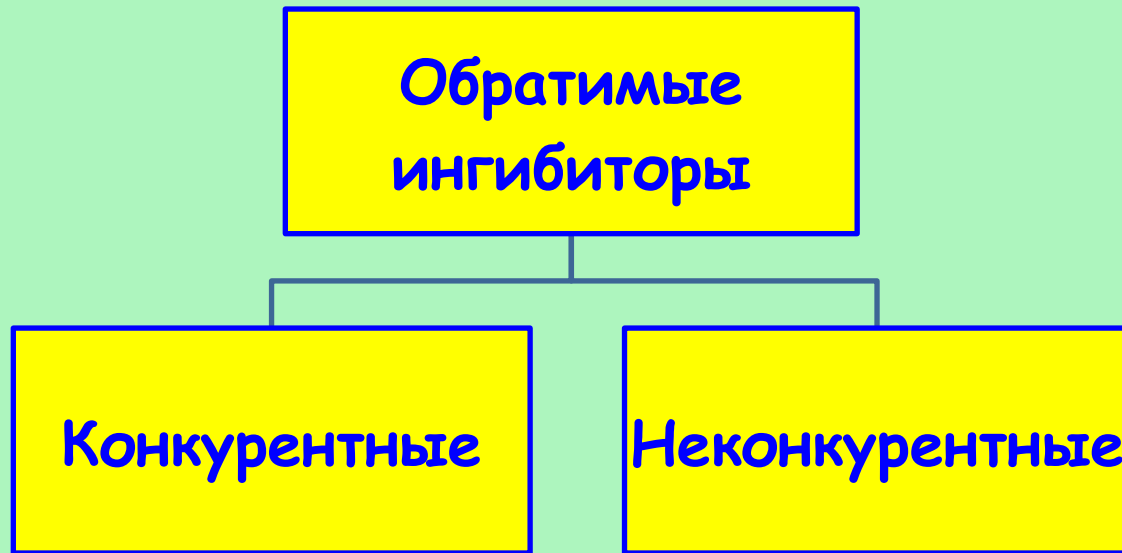
Ингибирует фермент **ацетилхолинэстеразу**.

Блокирует передачу нервных импульсов.

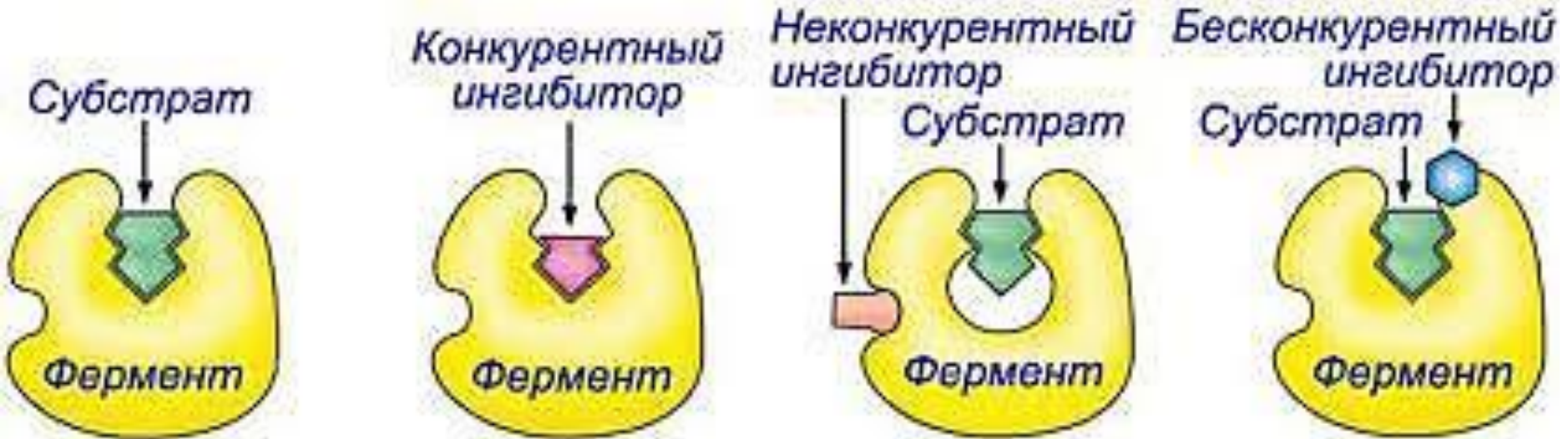


# Обратимые ингибиторы

- Связываются с ферментом **слабыми нековалентными связями** и легко отделяются от фермента.

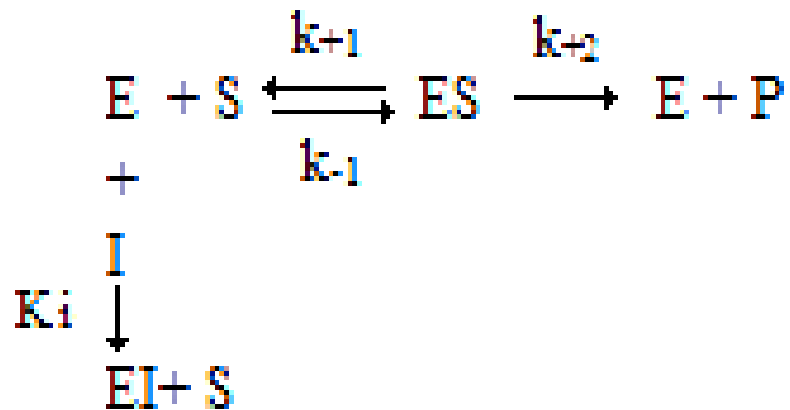


# Обратимые ингибиторы

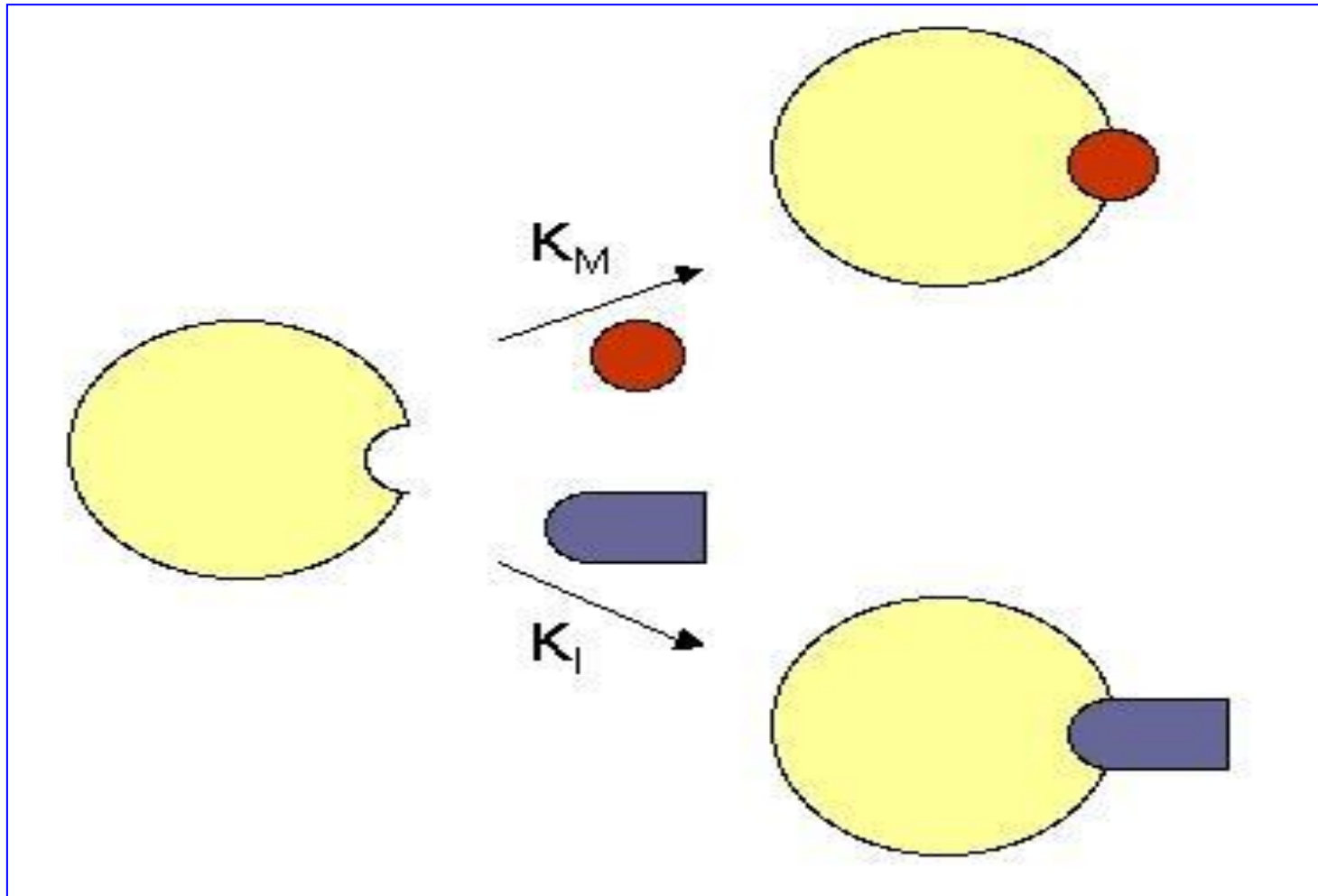


# Конкурентное ингибирование

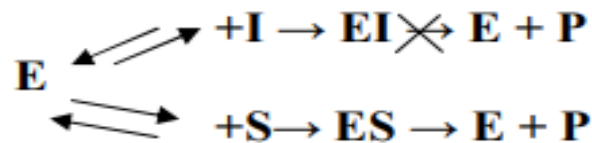
- Конкурентный ингибитор – это соединение, обладающее **структурным сходством с субстратом**.
- ингибитор способен взаимодействовать с **активным центром** фермента, конкурируя с **ИСТИННЫМ субстратом**



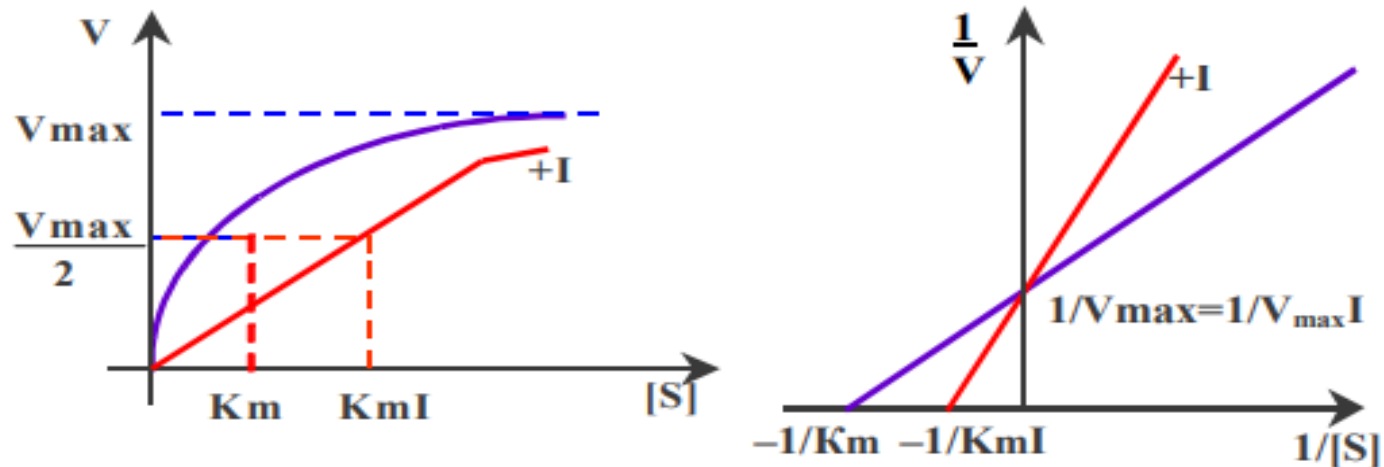
# Конкурентное ингибирование



## Действие конкурентных ингибиторов



## Кинетика ферментативных реакций при действии конкурентных ингибиторов

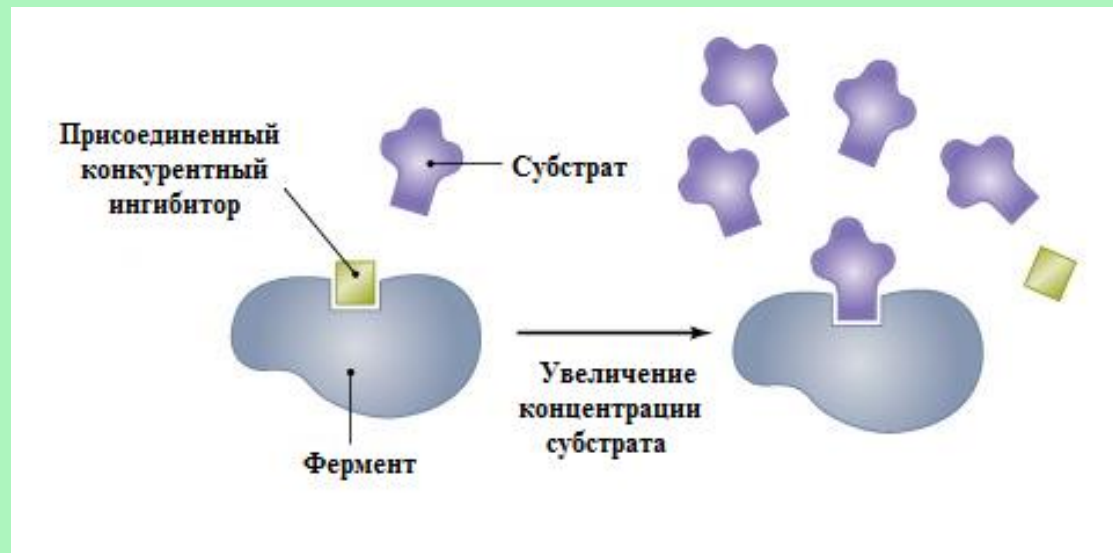


$$\frac{V_{\max} = V_{\max I}}{K_{mI} > K_m}$$

**Вывод:**  
конкурентные ингибиторы  
увеличивают  $K_m$  реакции,  
но не влияют на  $V_{\max}$

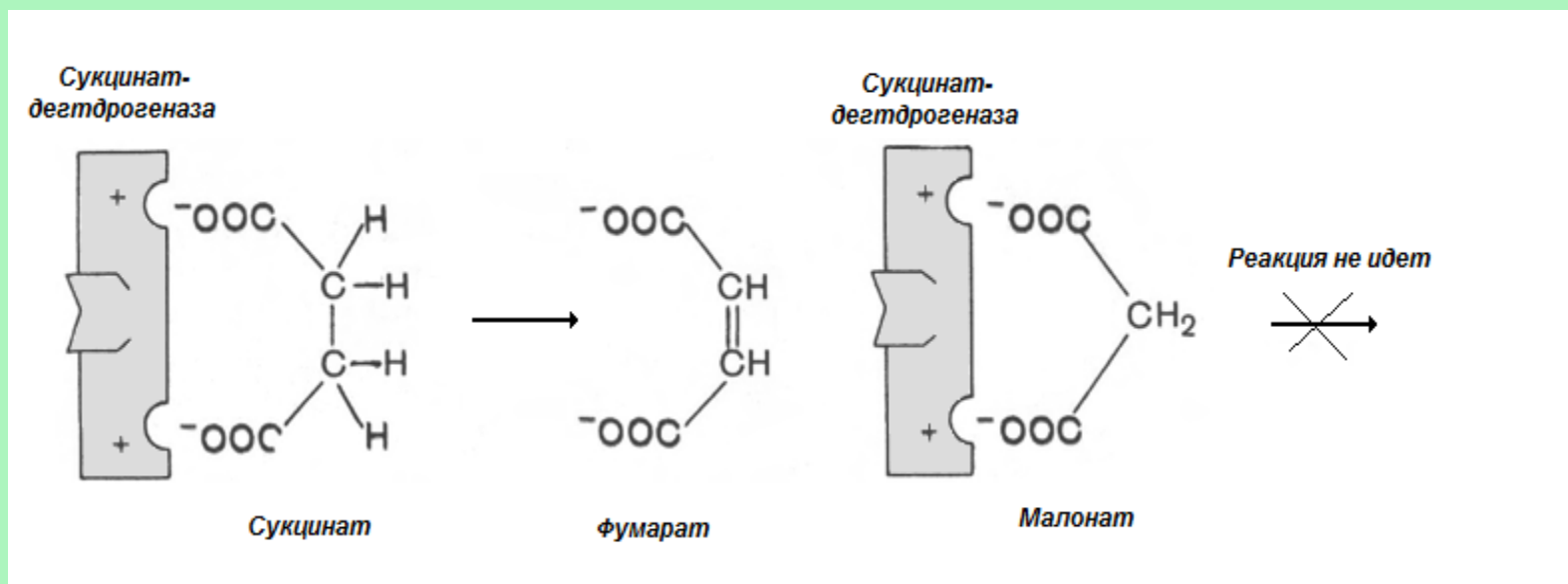
# Конкурентное ингибирование

- Степень ингибирования зависит от концентраций субстрата и ингибитора, и **при достаточно большой концентрации субстрата ингибирование может быть подавлено**



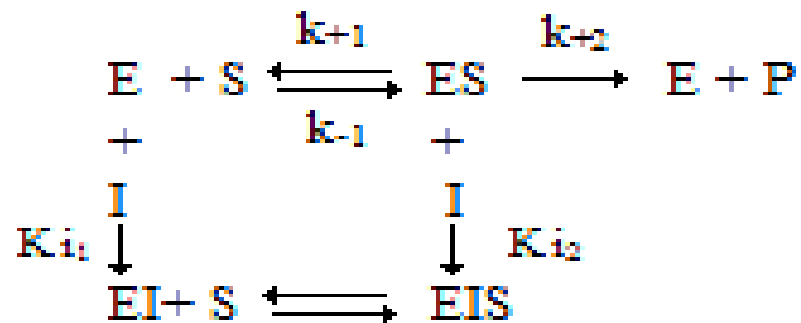
# Конкурентное ингибирование

- Пример конкурентного ингибирования – ингибирование **сукцинатдегидрогеназы** **малоновой кислотой**



# Неконкурентное ингибирование

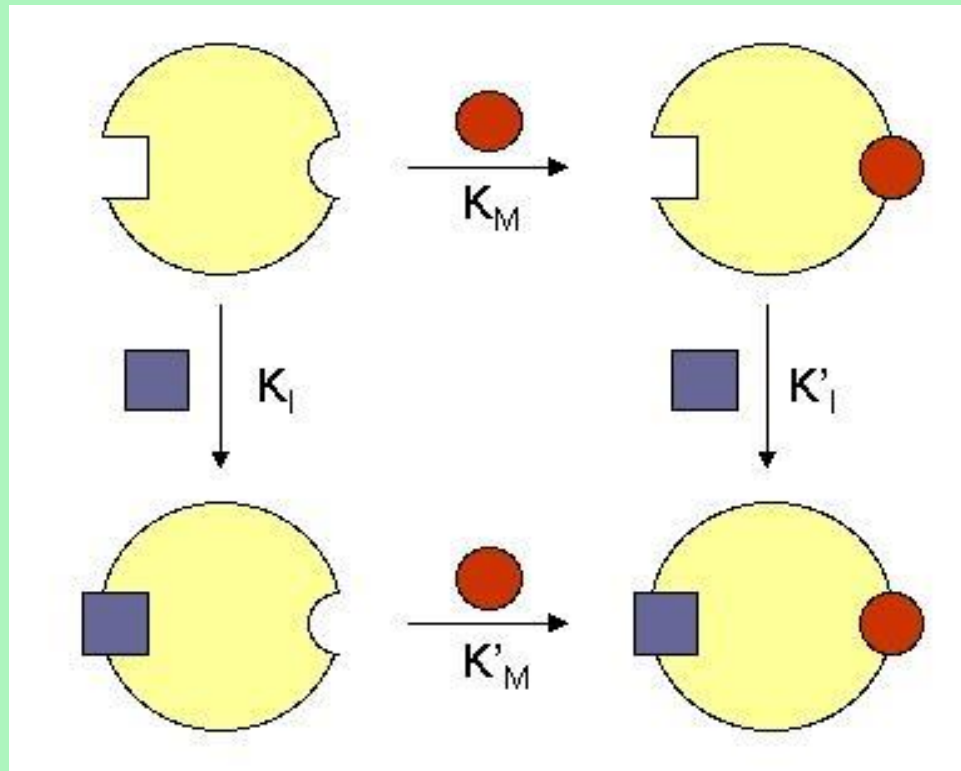
- Неконкурентный ингибитор **не является структурным аналогом субстрата**;
- Ингибитор **присоединяется не к активному центру**, а к другому участку молекулы фермента;





# Неконкурентное ингибирование

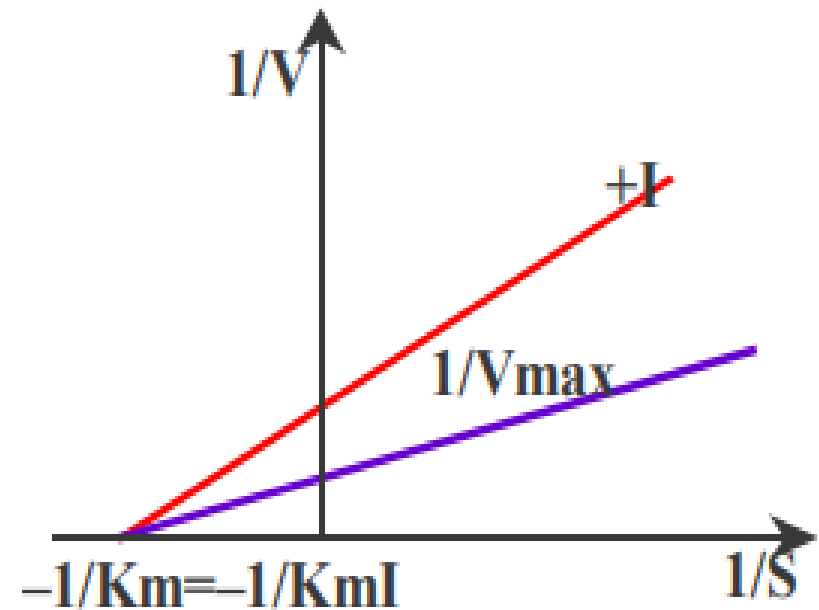
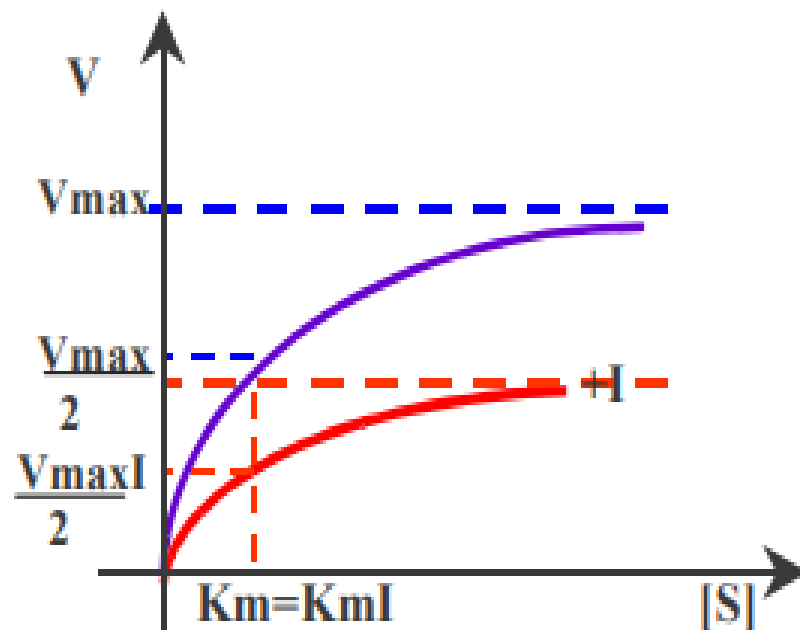
- Ингибитор может связываться **как с ферментом (EI)**, так и с фермент-субстратным комплексом (**ESI**);



# Неконкурентное ингибирование

- Ингибитор **не может быть вытеснен** путем увеличения концентрации субстрата;
- **Степень ингибирования** зависит от концентрации ингибитора и не зависит от концентрации субстрата.
- **Примером** неконкурентного ингибирования является ингибирование  $\alpha$ -амилазы мальтозой (продуктом реакции).

# Неконкурентное ингибирование



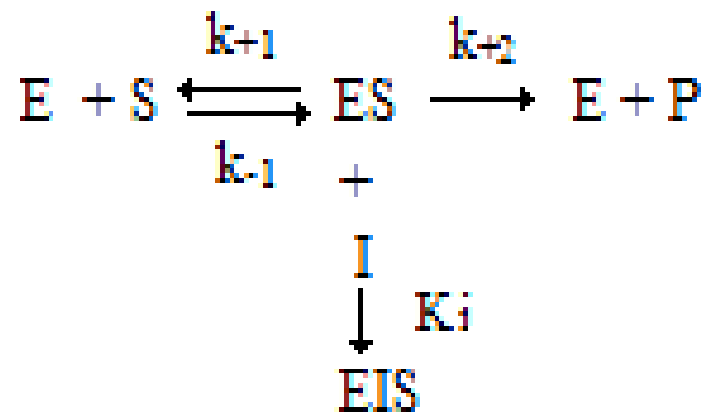
## Вывод:

неконкурентные ингибиторы понижают  $V_{max}$ , но не влияют на  $K_m$ .

$$V_{maxI} < V_{max}$$
$$K_{mI} = K_m$$

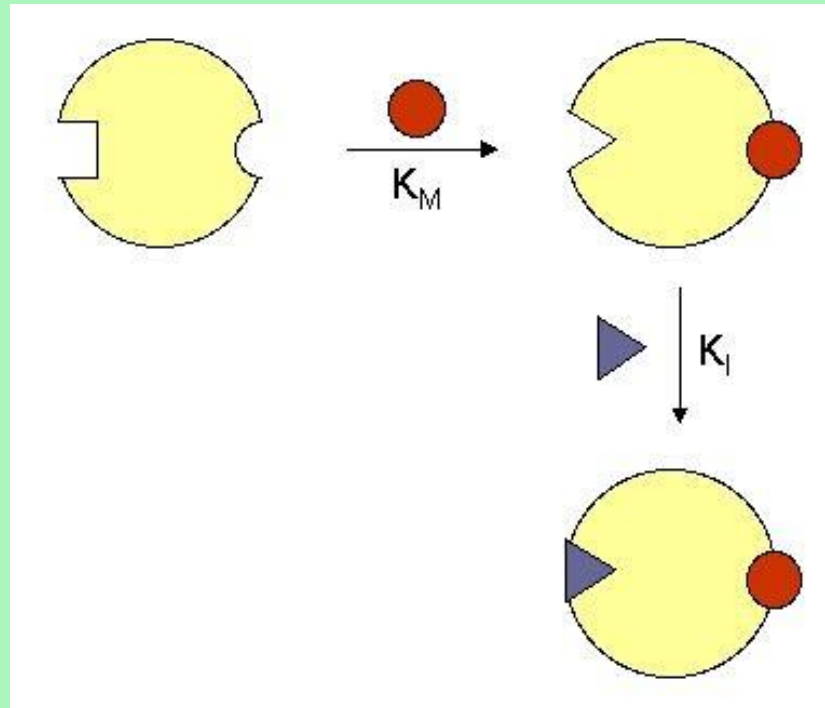
# Бесконкурентное ингибирование

- Этот тип ингибирования наблюдается в случае, когда **ингибитор способен связываться** исключительно с **фермент-субстратным комплексом**



# Бесконкурентное ингибирование

- При данном типе ингибирования в равной степени **изменяется как константа Михаэлиса**, так и **максимальная скорость реакции**:



## Регуляция скорости ферм. р-ций

Быстрая (секунды, минуты)

Медленная (часы, дни)

### Ковалентная модификация

- Фосфорилирование / дефосфорилирование (гликогенфосфорилаза, гликогенсинтетаза)
- Протеолиз (пепсиноген → пепсин)

Синтез новых молекул фермента – регуляция через геном

# Регуляция каталитической активности ферментов

- Аллостерическая регуляция;
- регуляция путем фосфорилирования-дефосфорилирования молекулы фермента;
- регуляция путем частичного протеолиза;
- регуляция путем ассоциации-диссоциации протомеров молекулы фермента.

# Алlostерическая регуляция

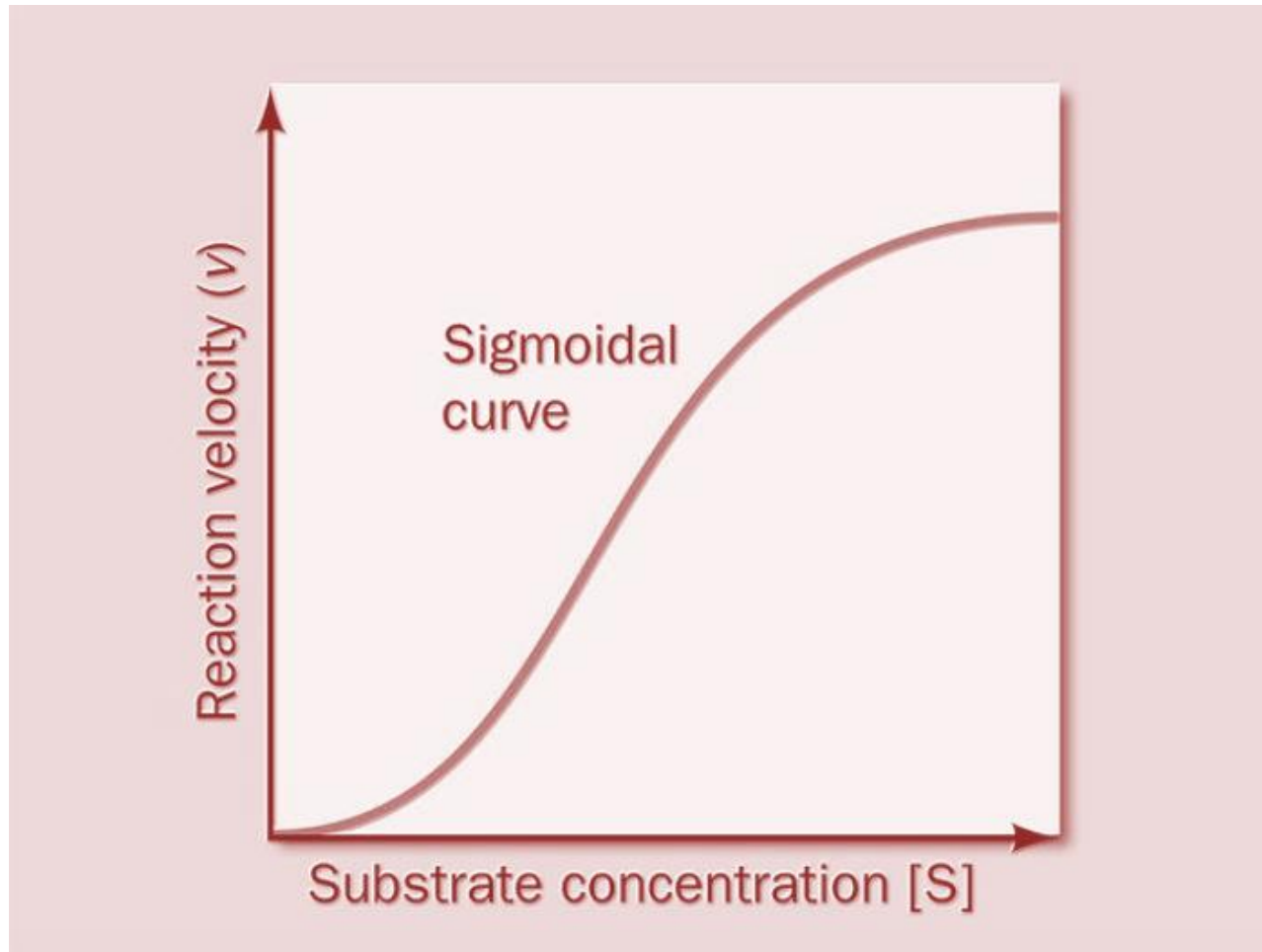
- Регуляция путем взаимодействия **эфффекторов** с **алlostерическим центром** фермента.
- Характерна для **олигомерных ферментов**, имеющих четвертичную структуру.
- Ферменты имеют:
  - **каталитические протомеры** с активным центром
  - **регуляторные протомеры** с алlostерическим центром.



# Аллостерическая регуляция

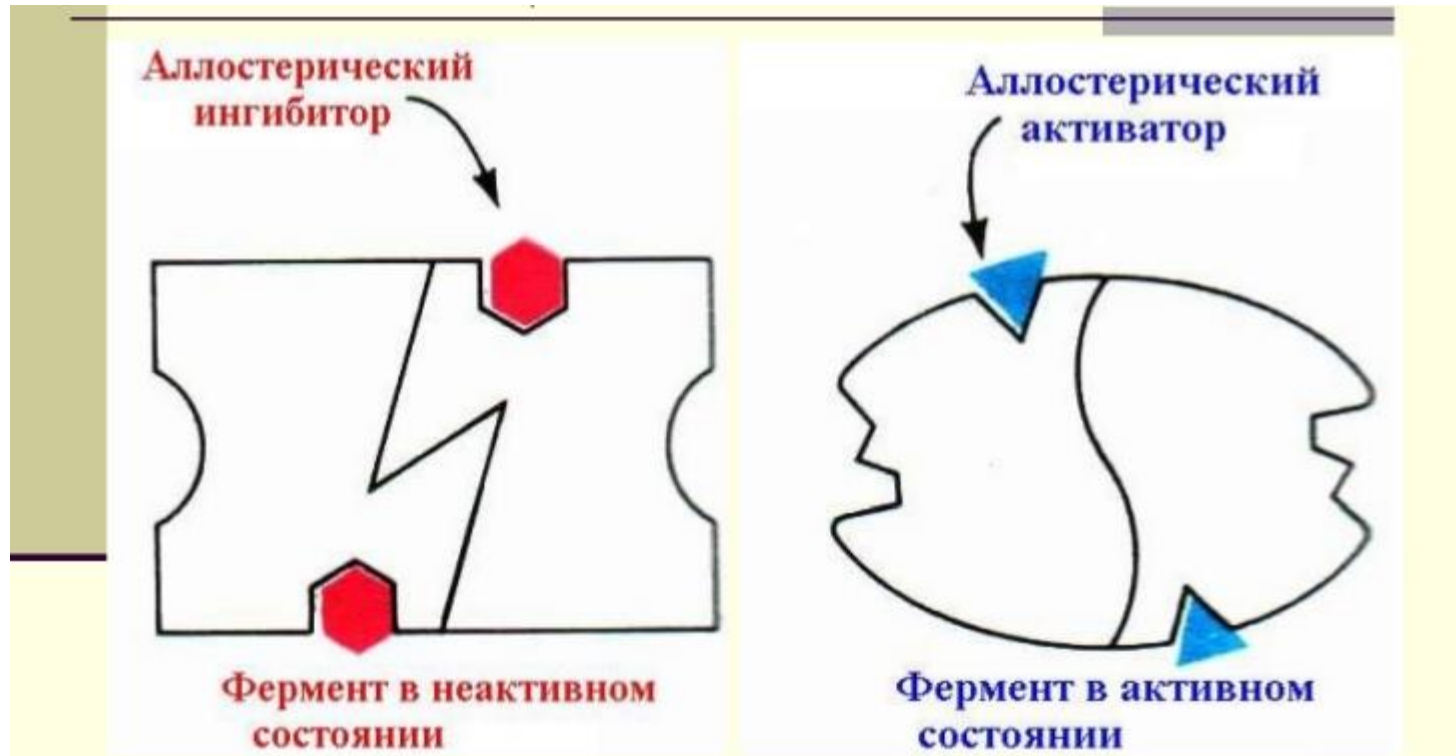
- Аллостерические ферменты катализируют **ключевую реакцию** (как правило необратимую и самую медленную) **метаболического пути**.
- Аллостерические ферменты обладают свойством **кооперативности**.
- Аллостерическая регуляция может приводить **к активации** или **ингибированию фермента**.
- Регуляция активности аллостерических ферментов **обратима**.

# Кинетика аллостерических ферментов



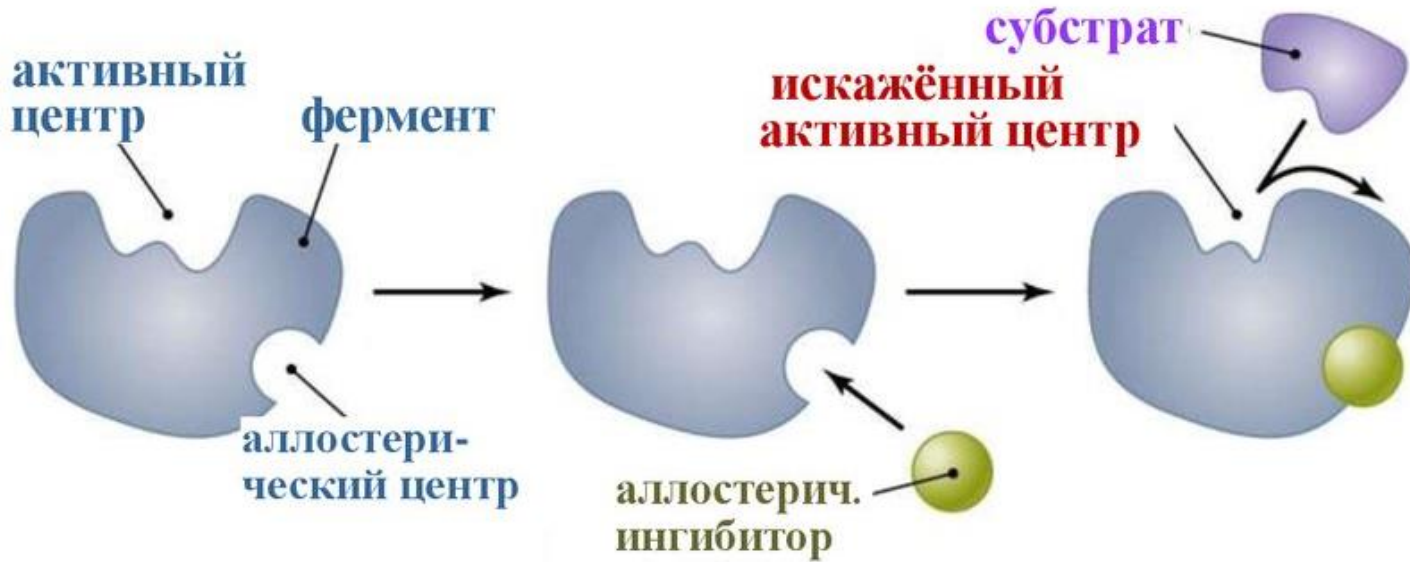
Не подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен (S-образная кривая).

# Алlostерические эффекторы делятся на два типа

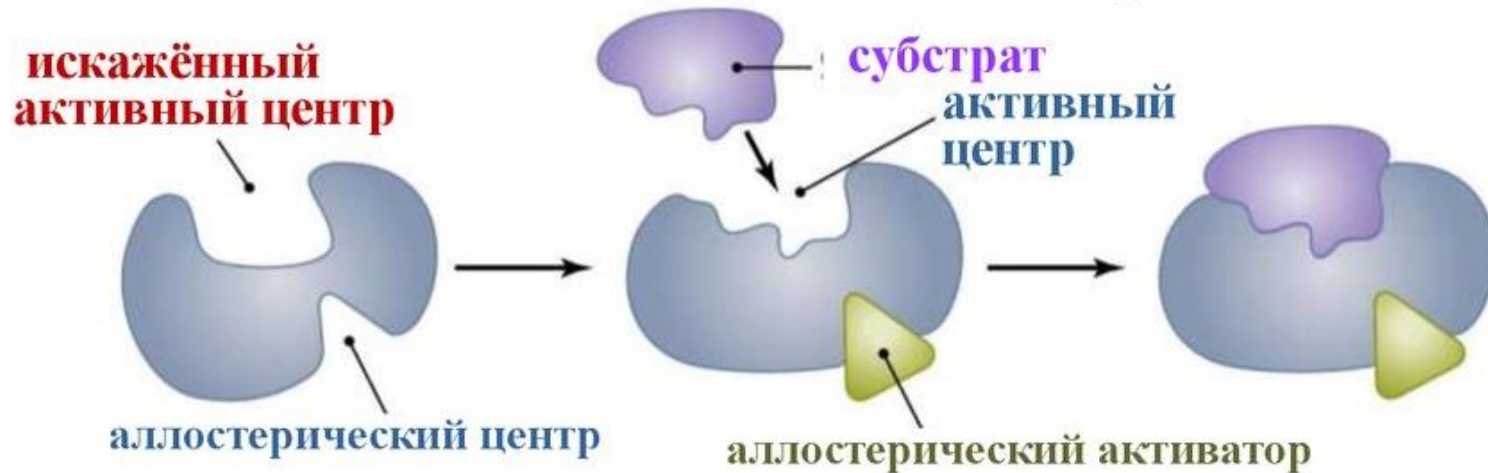


Регулируют активность фермента, изменяя его конформацию

## Аллостерическое ингибирование

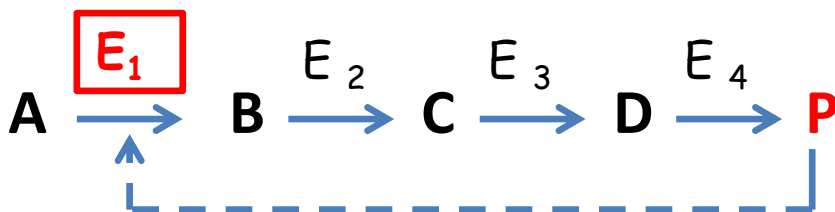


## Аллостерическое активирование



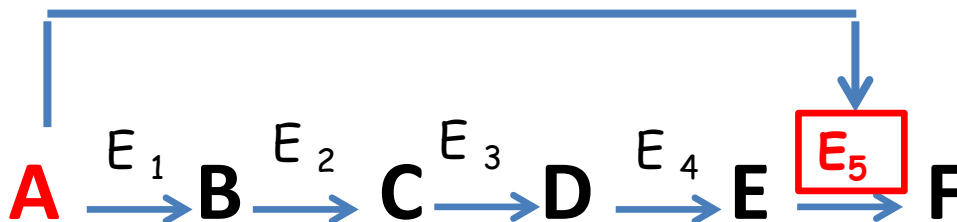
# Аллостерические эффекторы

- Отличаются по химической природе от субстрата.
- Аллостерические ингибиторы – **конечный продукт** метаболического пути.
- **Конечный продукт** ингибирует первый фермент  $E_1$  метаболического пути.
- Аллостерическое ингибирование – механизм отрицательной обратной связи (ретроингибирование).



# Аллостерические эффекторы

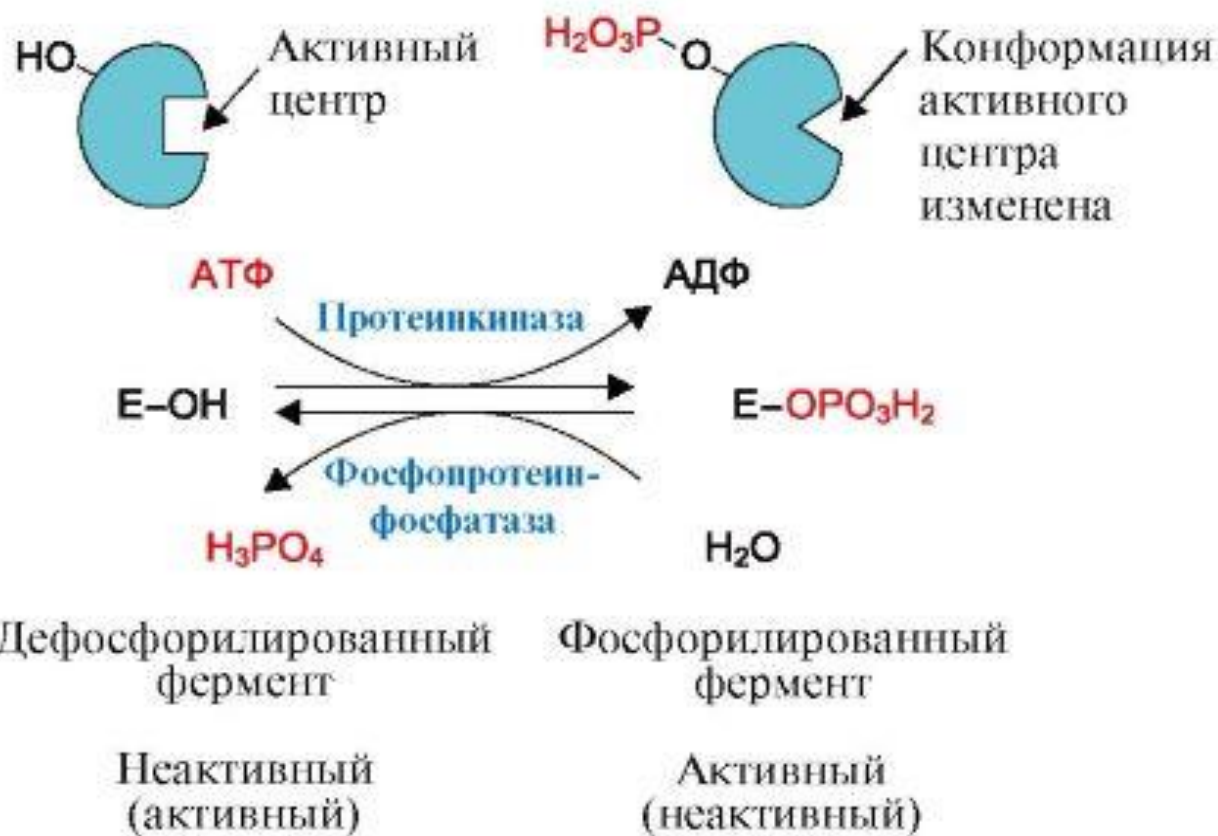
- Активация предшественником: субстрат или продукт первой реакции является аллостерическим активатором фермента, катализирующего ключевую реакцию заключительных этапов метаболического пути.



## Регуляция путем фосфорилирования-дефосфорилирования

- Ковалентная **химическая модификация** молекулы фермента (**обратимая**).
- Модификации подвергается **ОН-группа** АК остатка фермента (**присоединение или отщепление фосфата**).
- **Одни ферменты активны в фосфорилированной** форме, **другие - в дефосфорилированной**.

# Регуляция путем фосфорилирования-дефосфорилирования





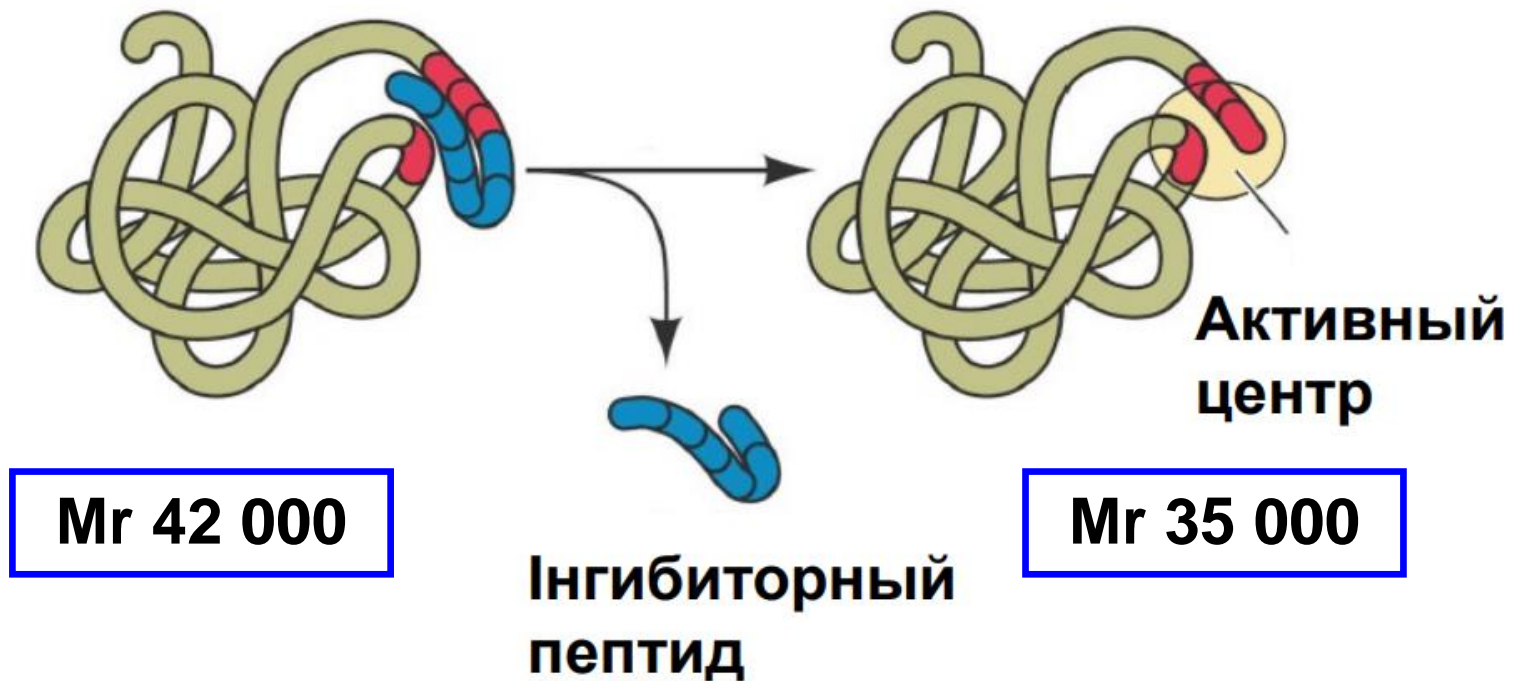
# Регуляция путем частичного протеолиза

- Синтез некоторых ферментов осуществляется в виде более **крупного предшественника** и при поступлении в нужное место этот фермент **активируется через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов**. Подобный механизм защищает внутриклеточные структуры от повреждений.
- примером служит активация протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (**трипсиноген, пепсиноген, прокарибоксипептидазы**), **факторов свертывания крови**, лизосомальных ферментов (**катепсины**).

# Регуляция путем частичного протеолиза

**Протеолиз:**  
**пепсиноген → пепсин**

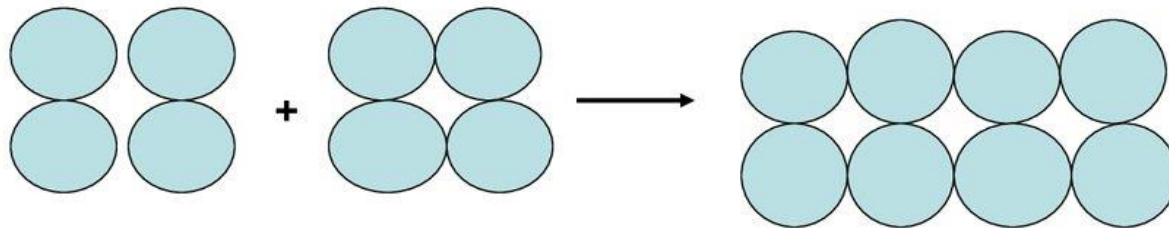
Необратимая  
регуляция



# Регуляция путем ассоциации-диссоциации протомеров

Регуляция активности путем ассоциации/диссоциации

- Ассоциация – ковалентная химическая модификация **обратимая**
- Ферменты - олигомерные белки.



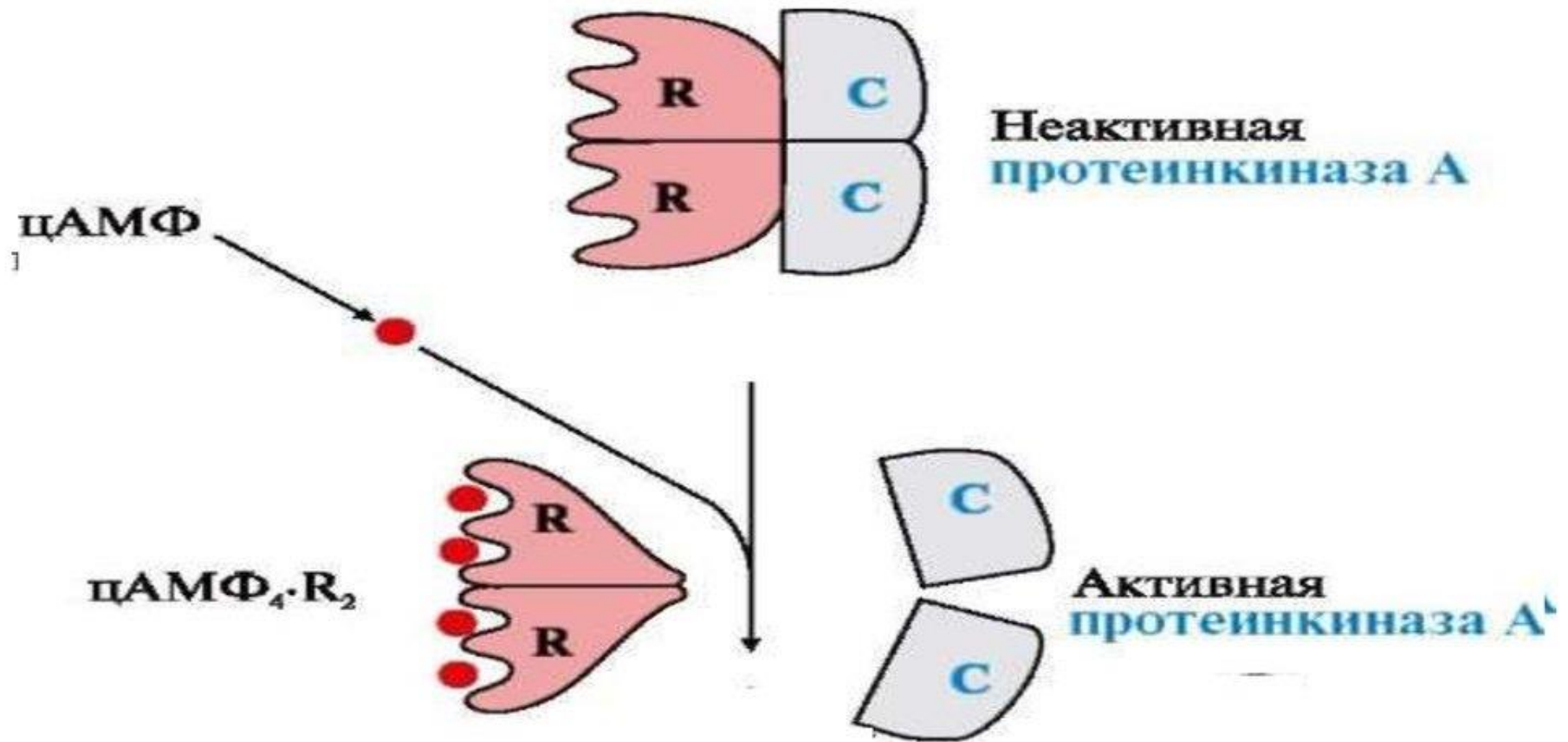
*E неактивный*

*E активный*

*Пример – ацетилКоА-карбоксилаза (Синтез ВЖК)*

# Регуляция путем ассоциации/диссоциации молекулы фермента

*Диссоциация: активация протеинкиназы; активатор цАМФ*



*Пример - Протеинкиназа активируется (класс трансфераз, подкласс киназы-фосфотрансферазы)*

**СПАСИБО**  
**за**  
**ВНИМАНИЕ!**