

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

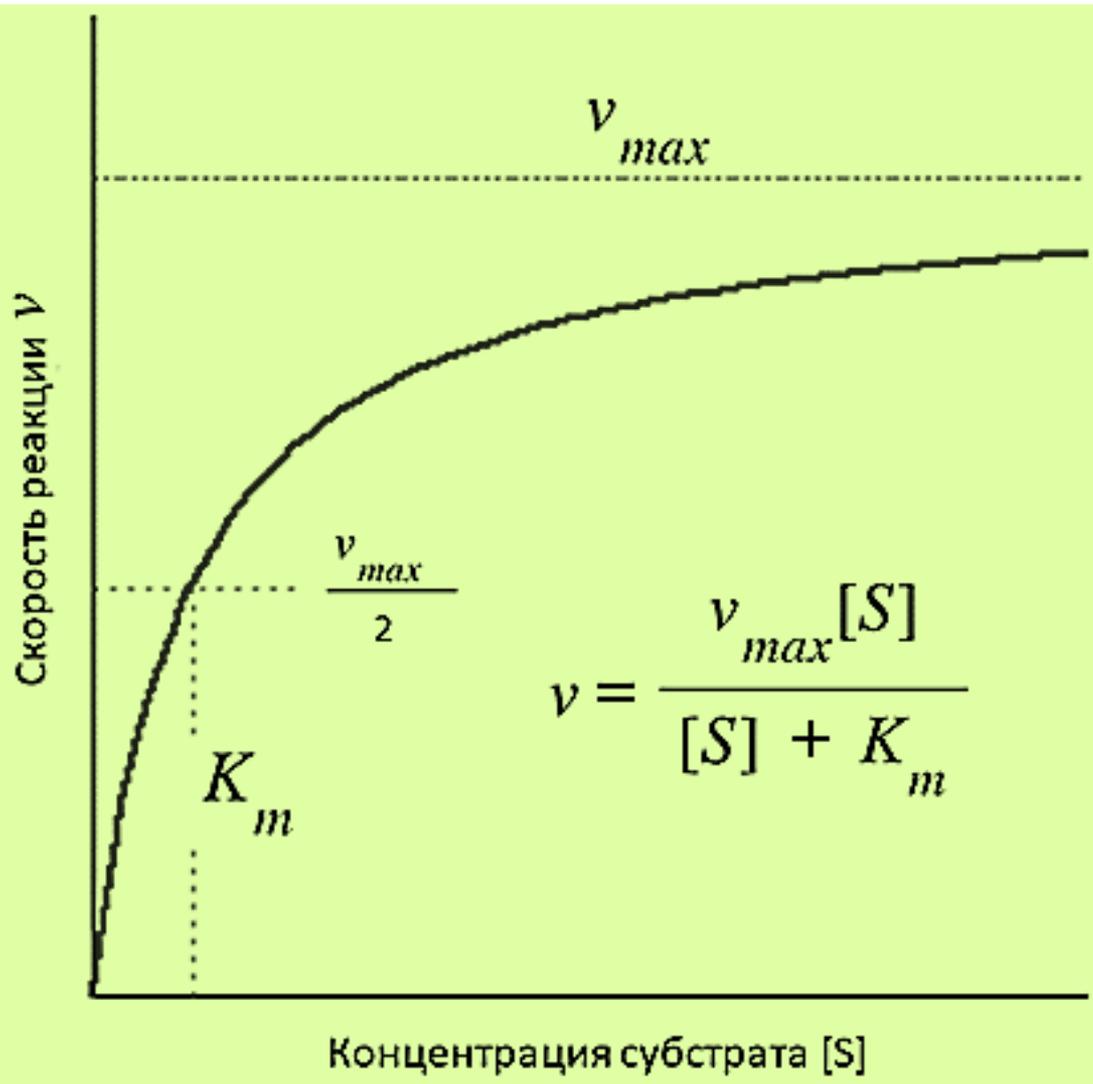
K_m равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость ферментативной реакции равна половине от максимальной.

K_m характеризует

сродство фермента к субстрату

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

ГРАФИК УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

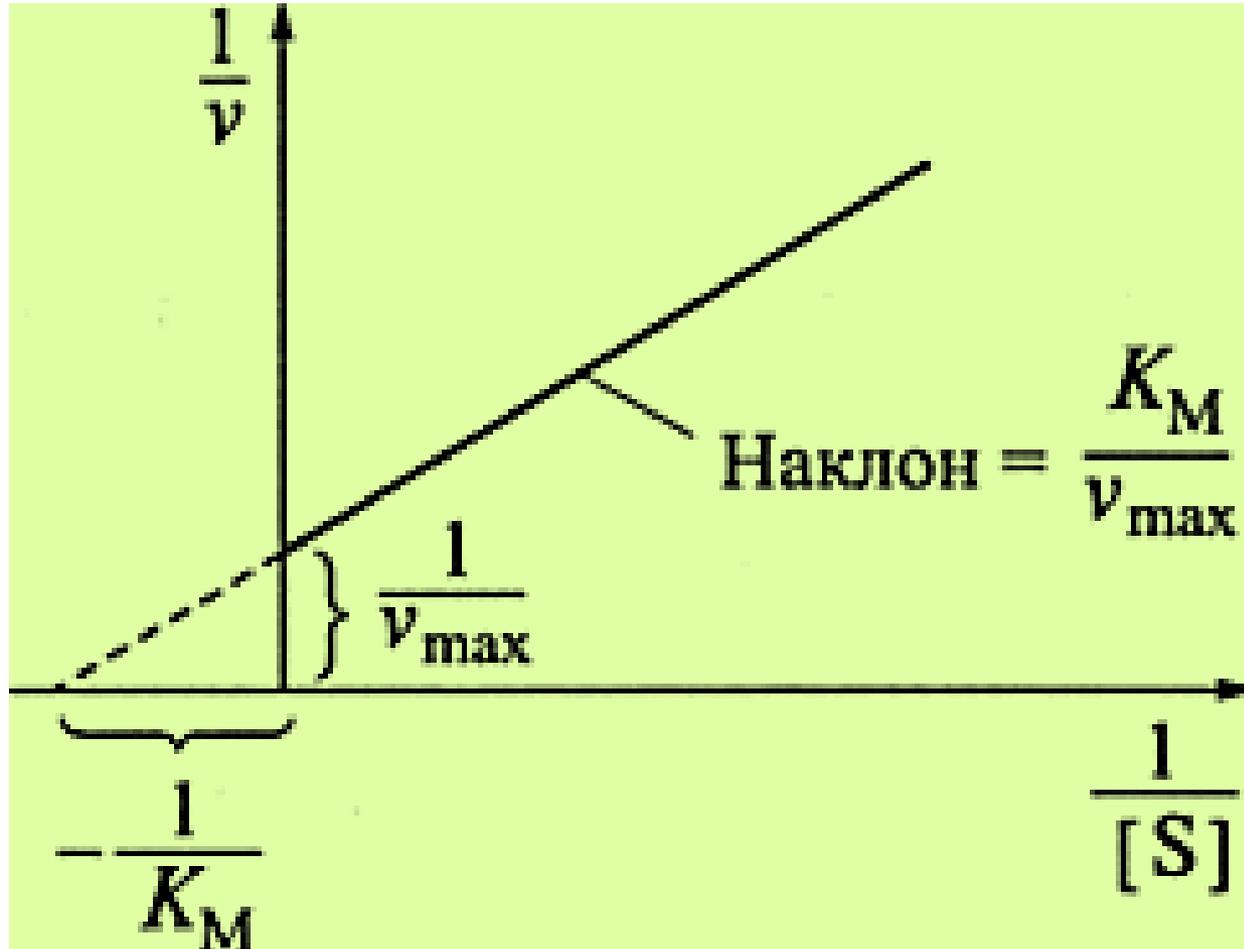


КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- 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:

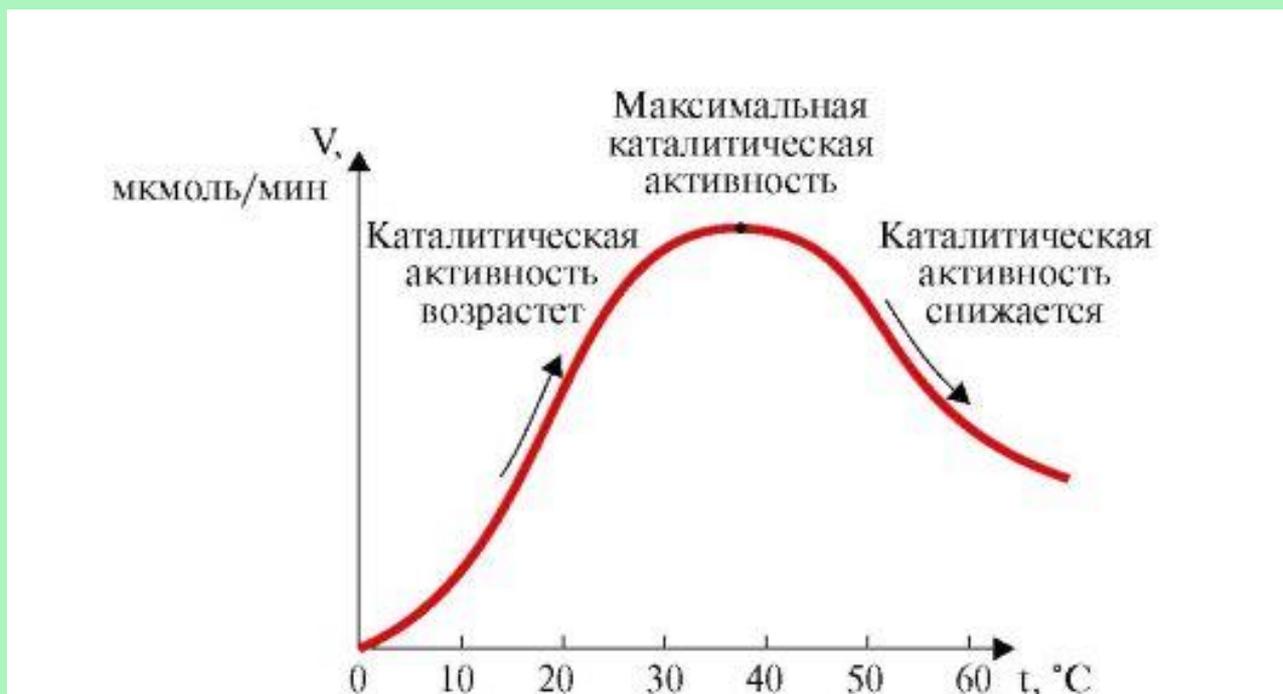
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ГРАФИК УРАВНЕНИЯ ЛАЙНУИВЕРА-БЭРКА

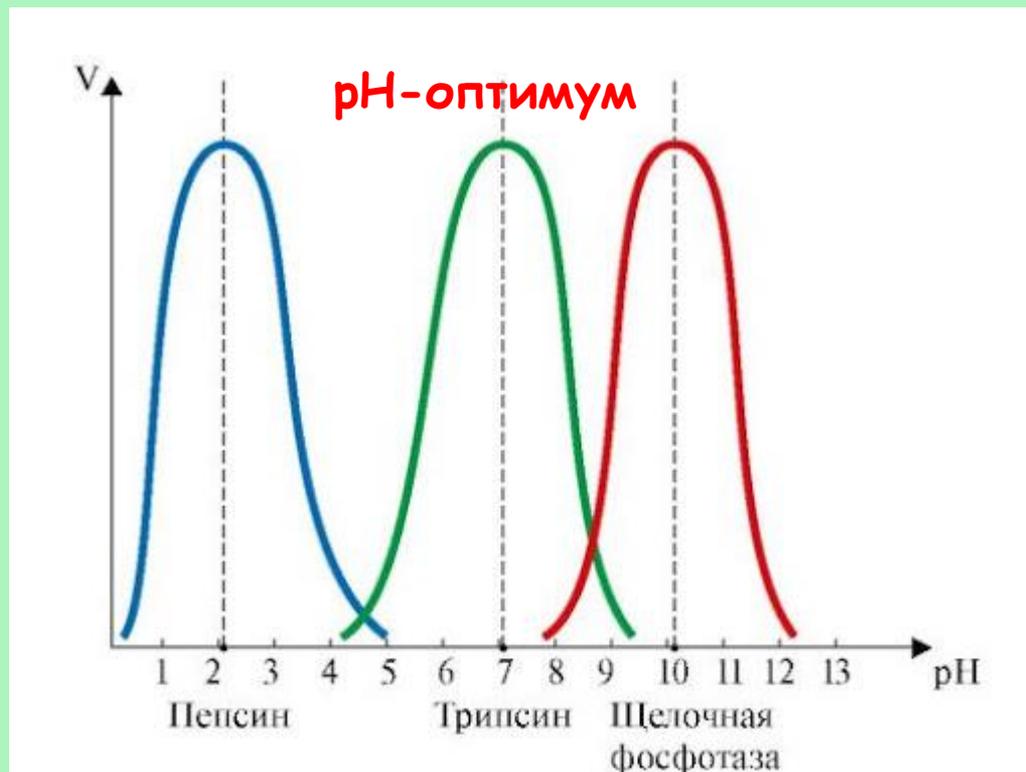


ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH

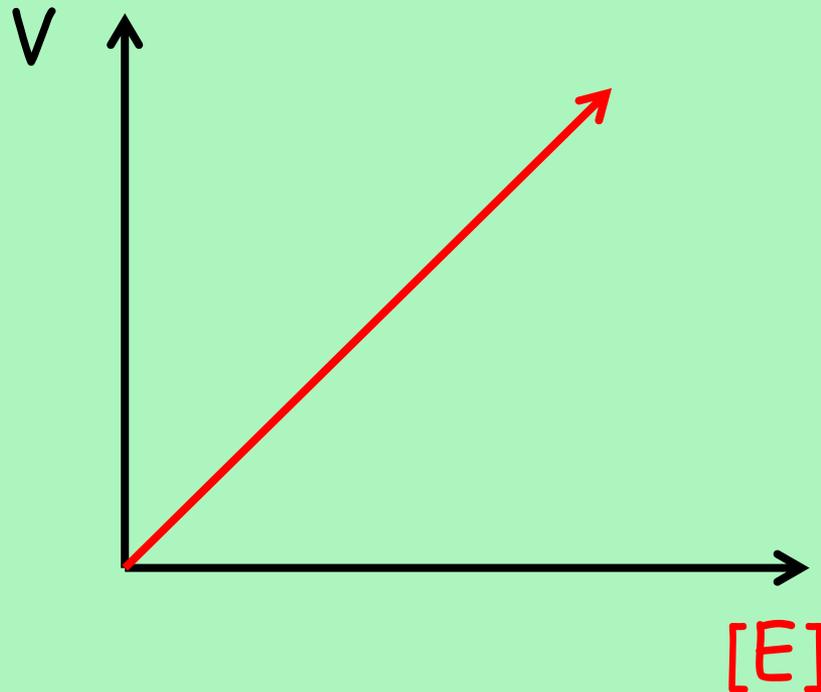
- См. предыдущую лекцию



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 (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+});
- облегчают образование **E-S комплекса** (Mg^{2+});
- восстанавливают **SH-группы** (глутатион);
- стабилизируют **нативную структуру** белка-фермента.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ

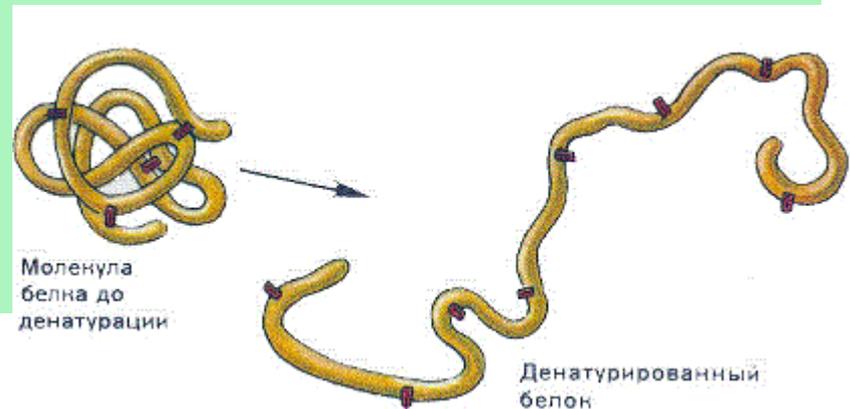
- **Соляная кислота** активирует **пепсин** желудочного сока;
- **желчные кислоты** повышают активность панкреатической **липазы**;
- **глутатион** активирует **оксидоредуктазы**;
- **апопротеин-І** активирует **ЛХАТ**.

Типы ингибирования

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

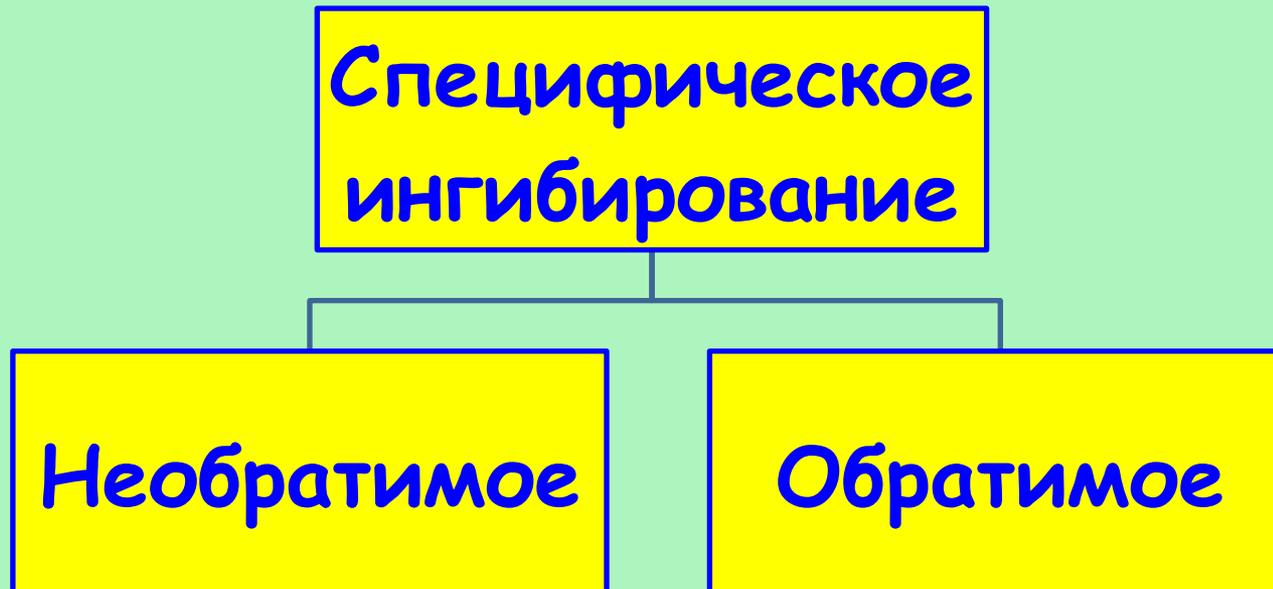
Неспецифическое ингибирование

- 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.



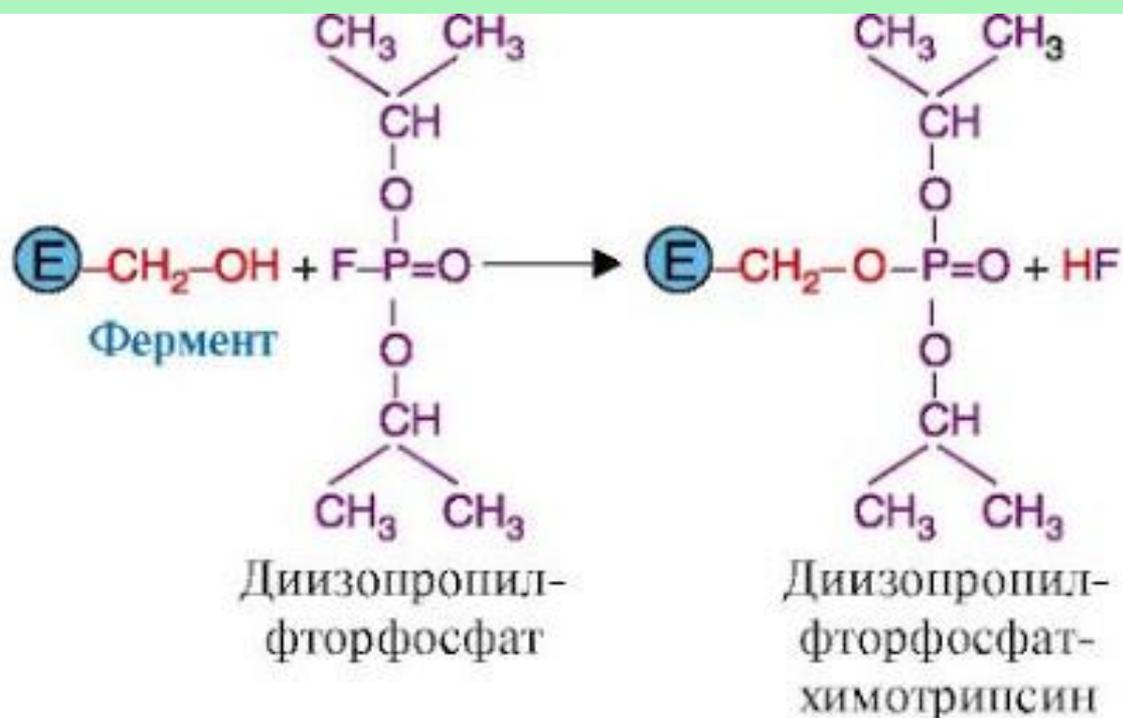
Необратимое ингибирование

- 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

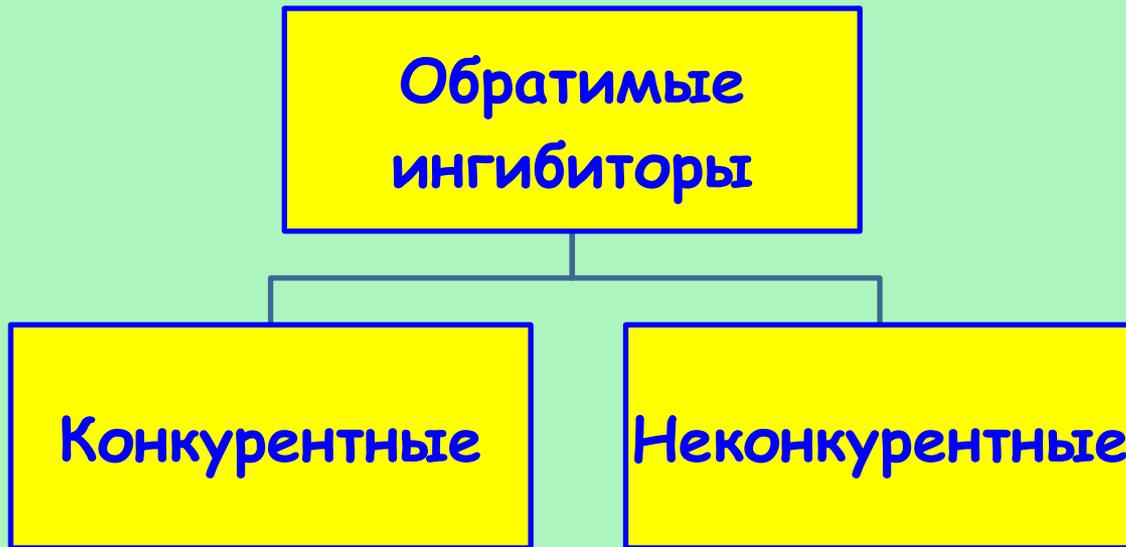


Ингибирует фермент **ацетилхолинэстеразу**.

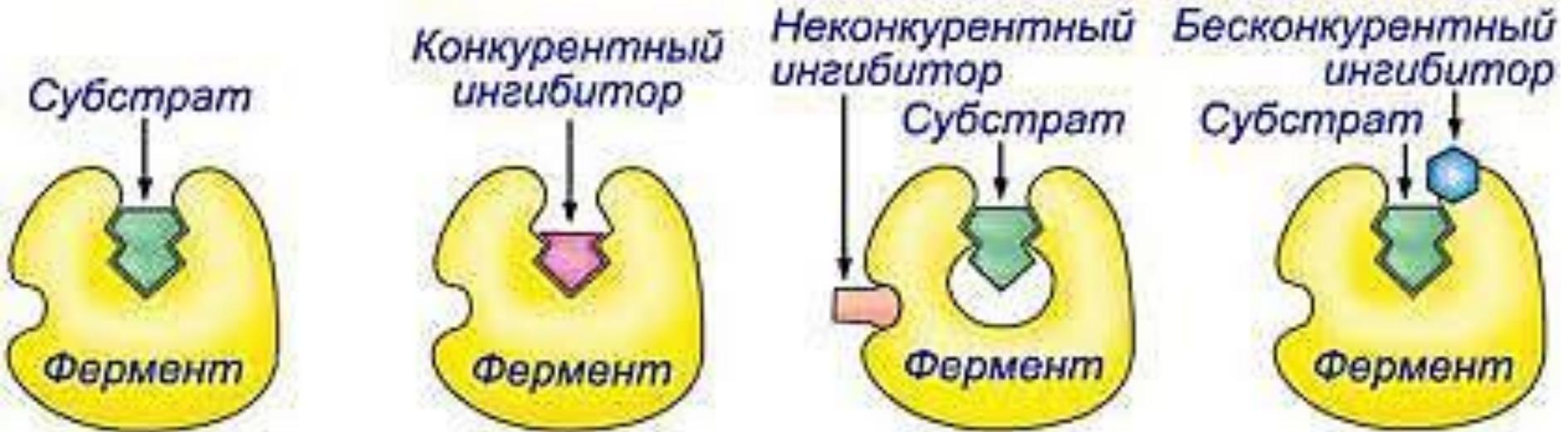
Блокирует передачу нервных импульсов.

Обратимые ингибиторы

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

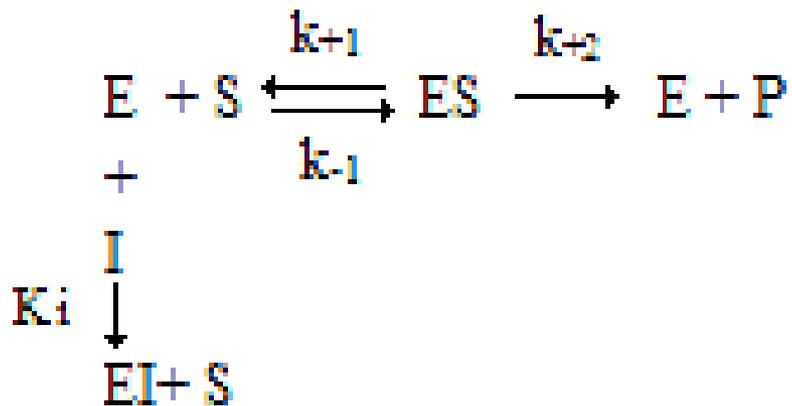


Обратимые ингибиторы

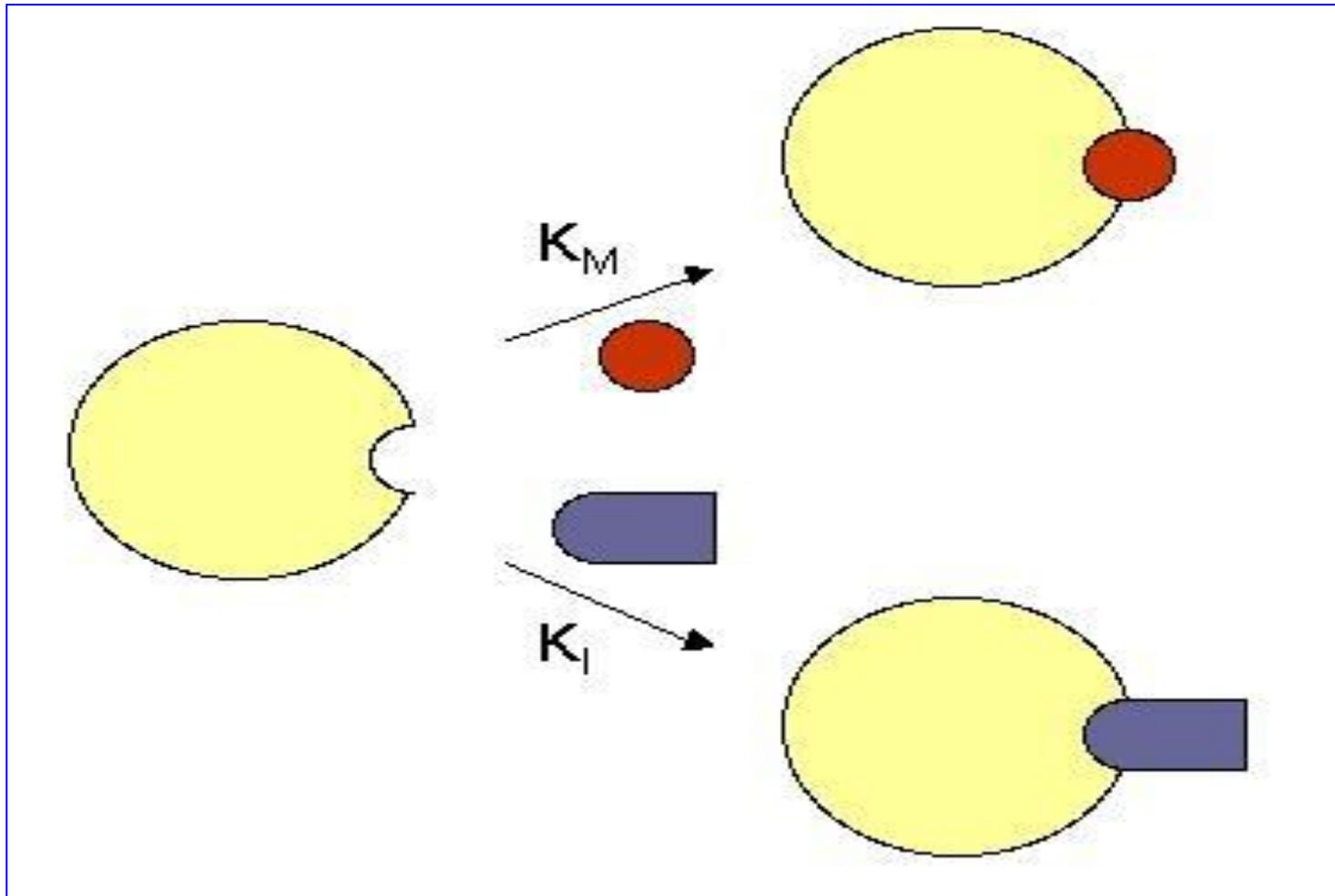


Конкурентное ингибирование

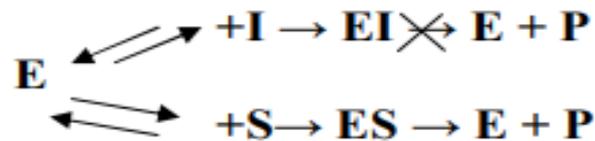
- Конкурентный ингибитор – это соединение, обладающее **структурным сходством с субстратом**.
- ингибитор способен взаимодействовать с **активным центром** фермента, конкурируя с **ИСТИННЫМ субстратом**



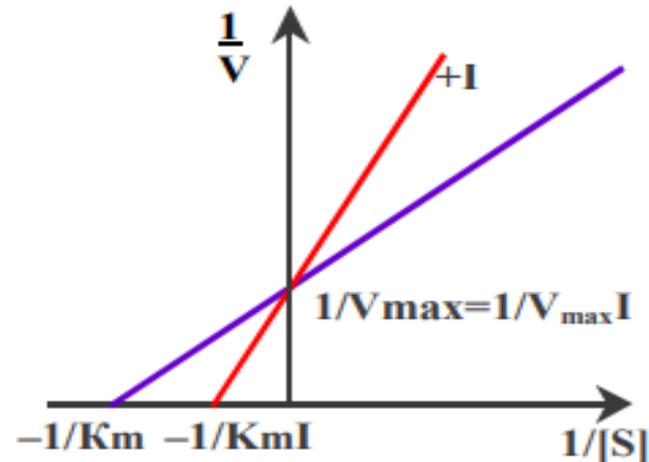
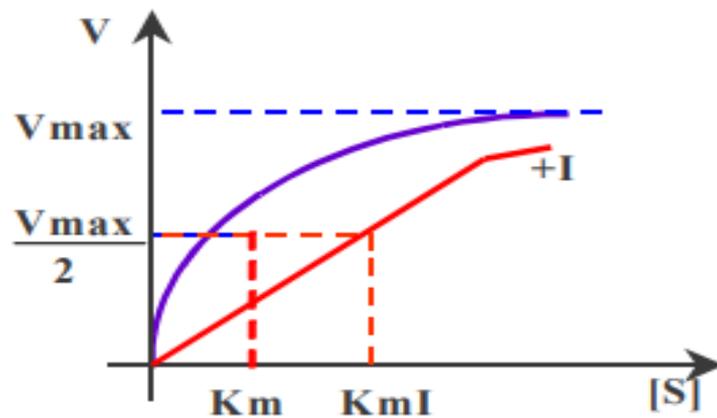
Конкурентное ингибирование



Действие конкурентных ингибиторов



Кинетика ферментативных реакций при действии конкурентных ингибиторов

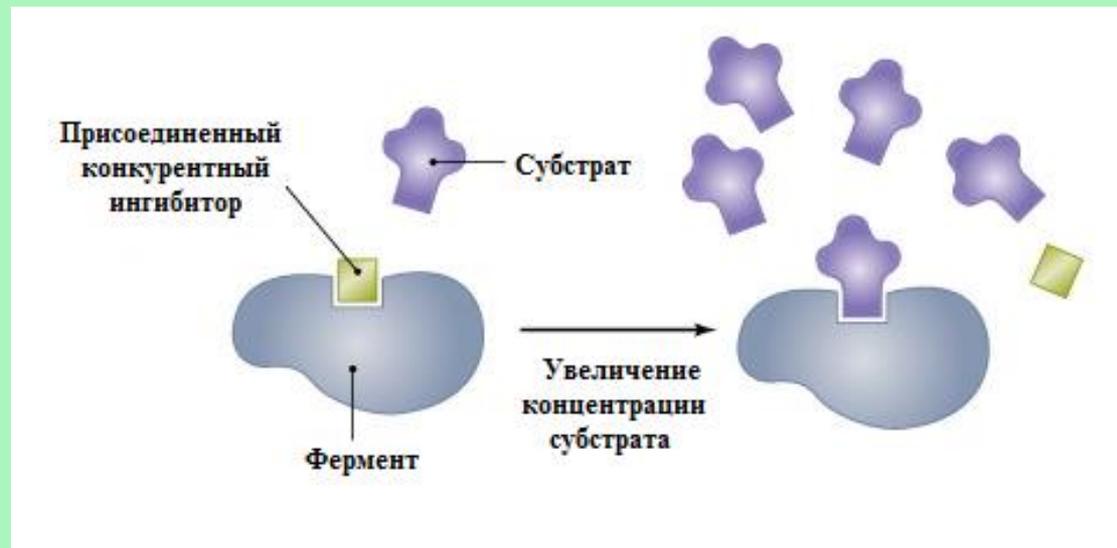


$$\frac{V_{\max} = V_{\max I}}{K_{mI} > K_m}$$

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

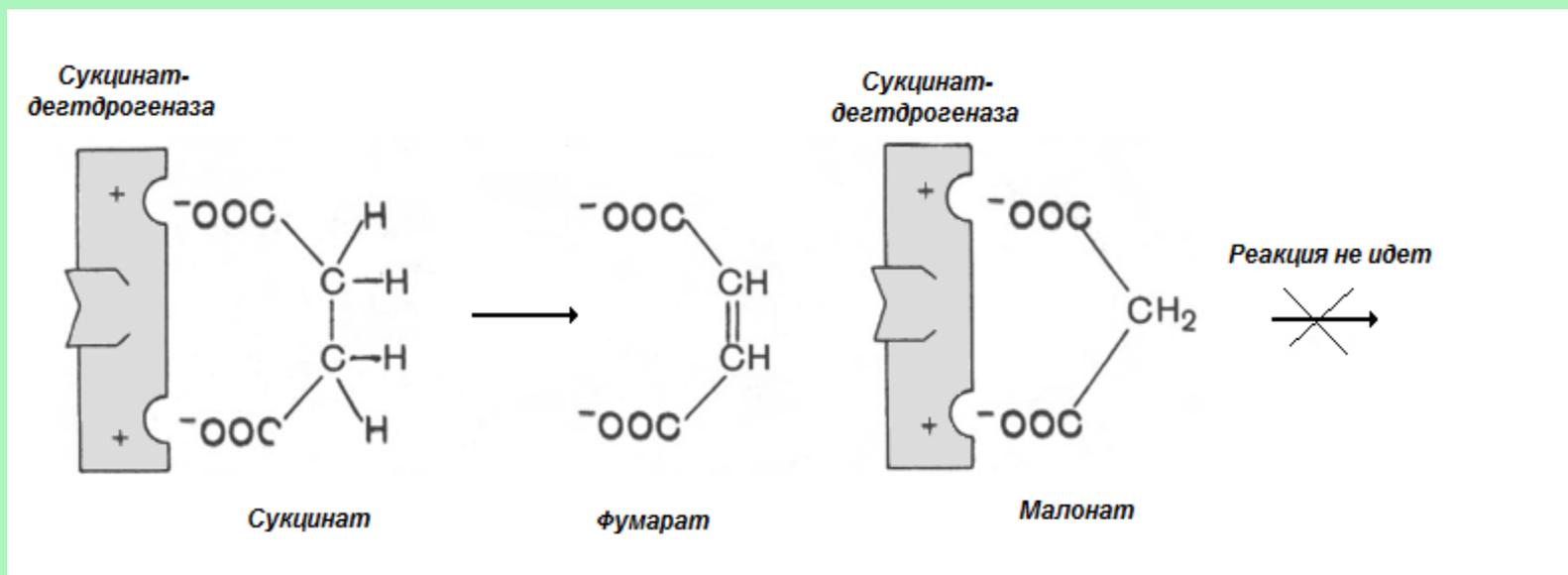
Конкурентное ингибирование

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



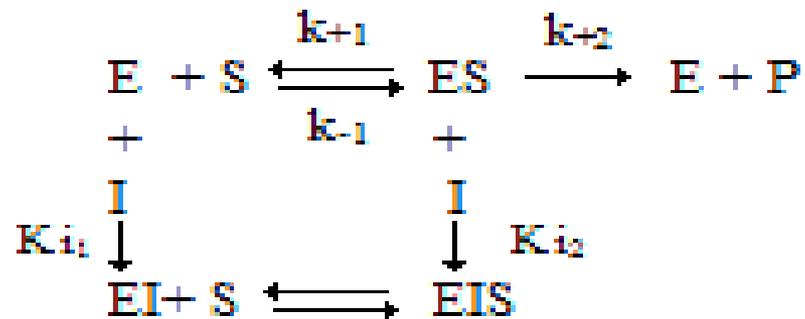
Конкурентное ингибирование

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



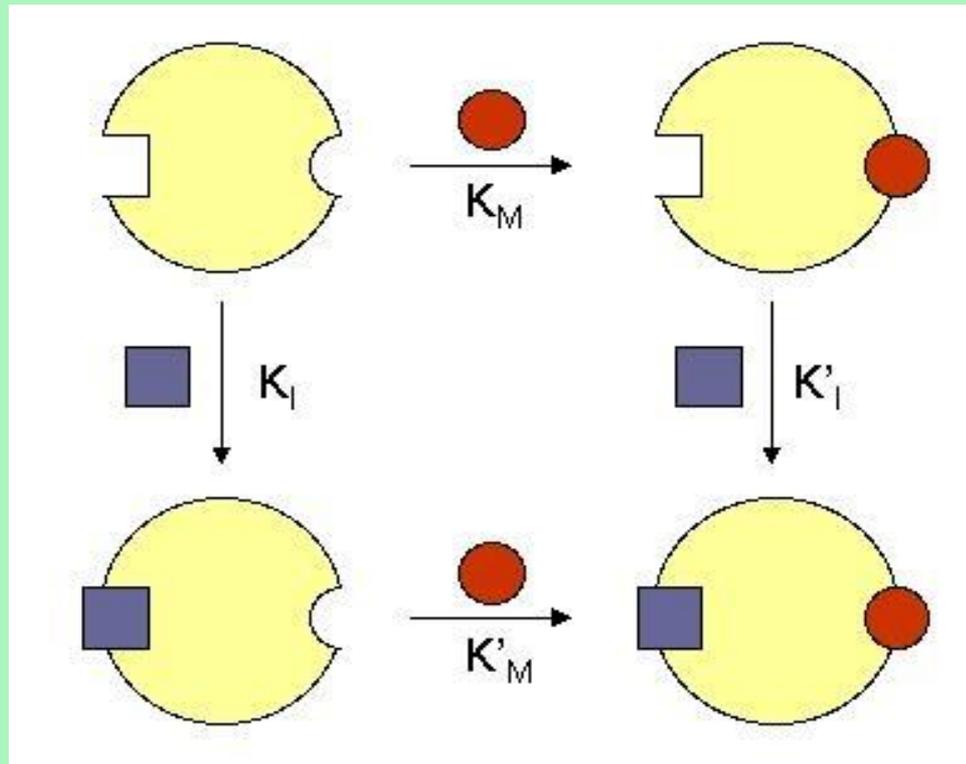
Неконкурентное ингибирование

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



Неконкурентное ингибирование

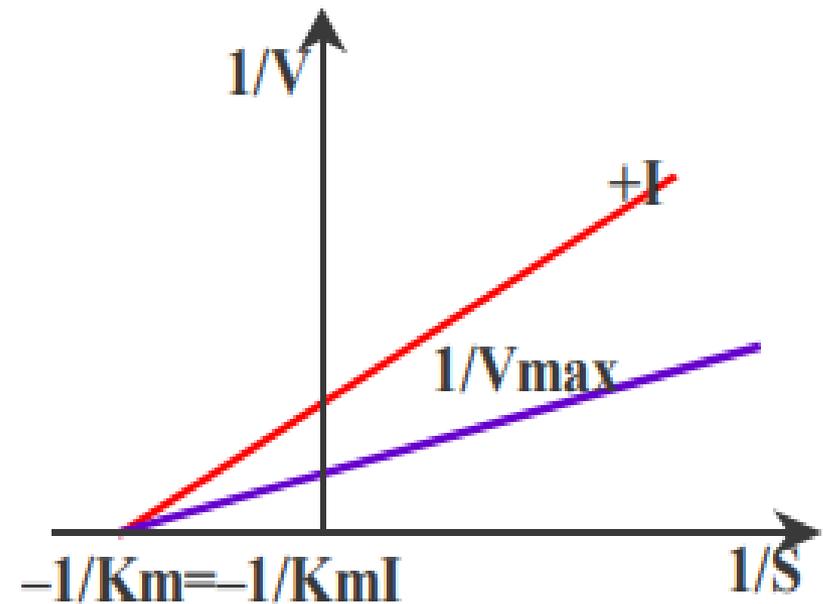
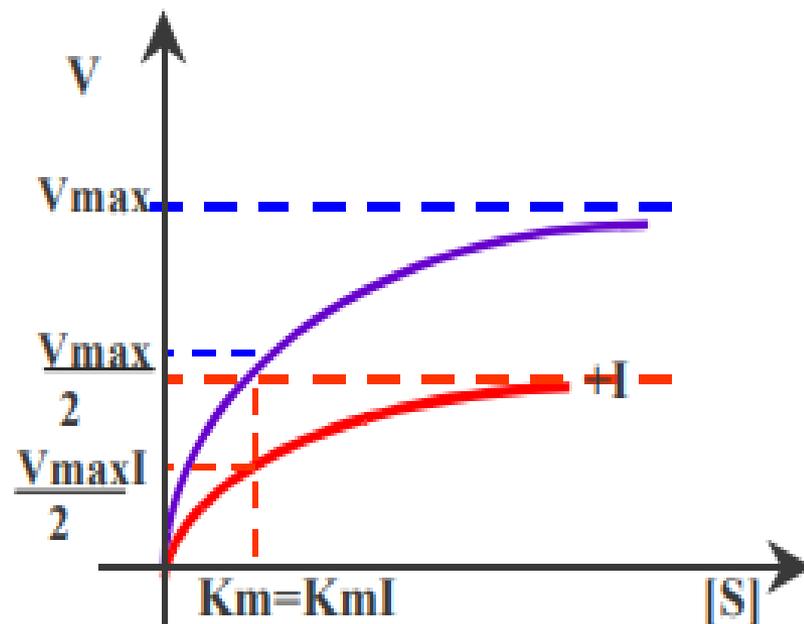
- Ингибитор может связываться **как с ферментом (EI)**, так и с фермент-субстратным комплексом (**ESI**);



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 α -амилазы мальтозой (продуктом реакции).

Неконкурентное ингибирование



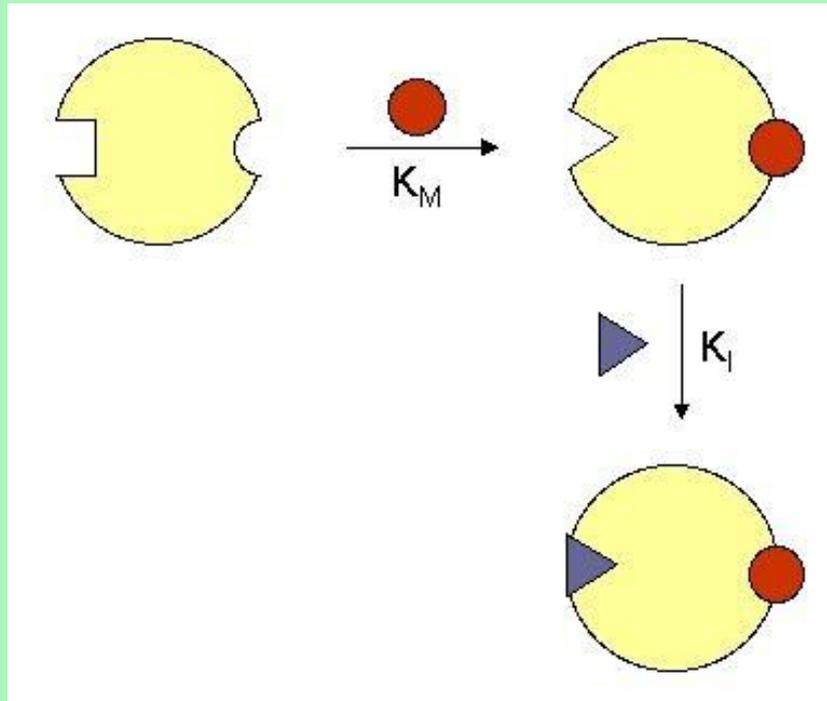
Вывод:

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

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

Бесконкурентное ингибирование

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



Регуляция скорости ферм. р-ций

Быстрая (секунды, минуты)

Ковалентная модификация

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

Медленная (часы, дни)

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.

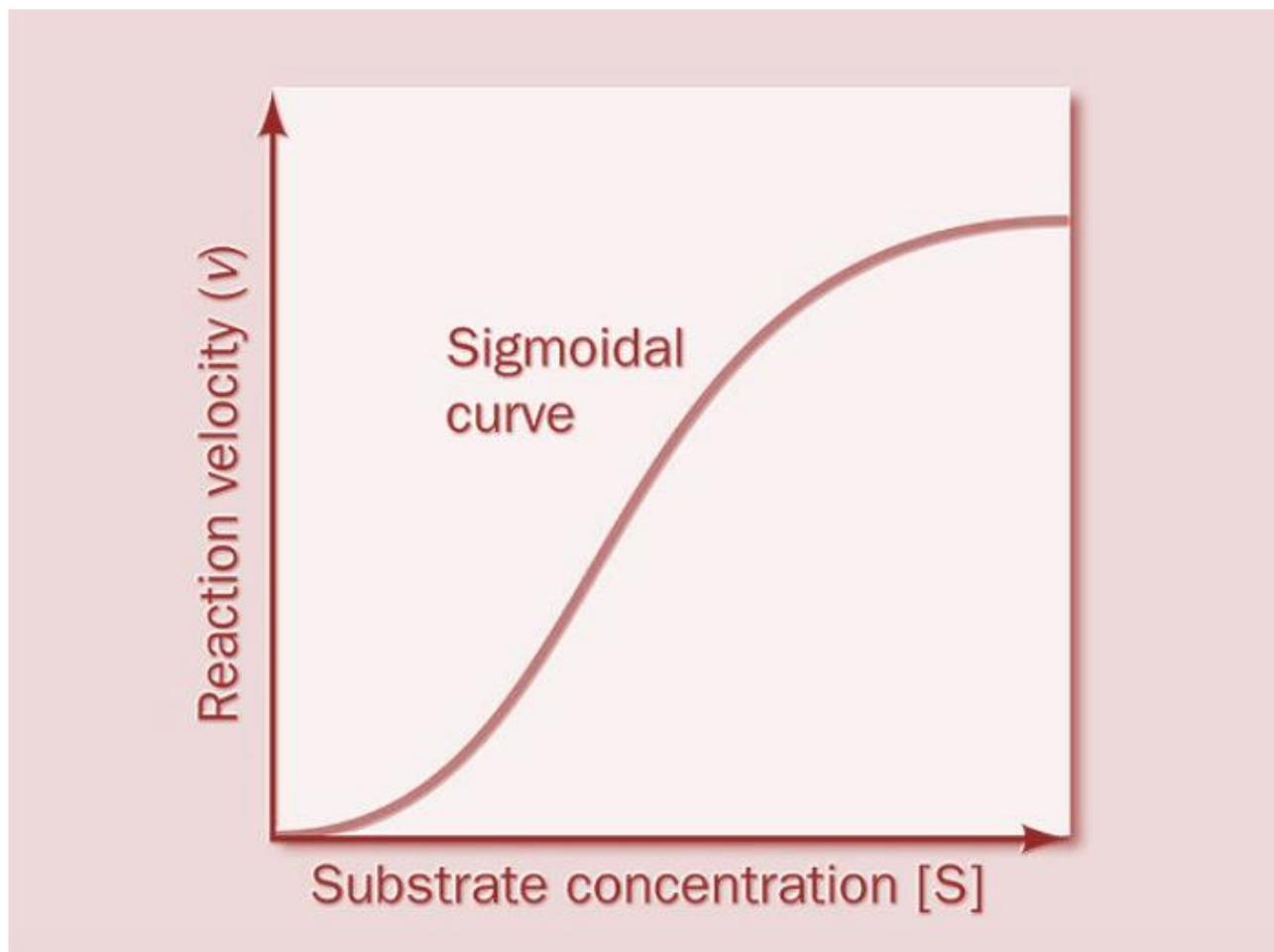
Алlostерическая регуляция

- 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

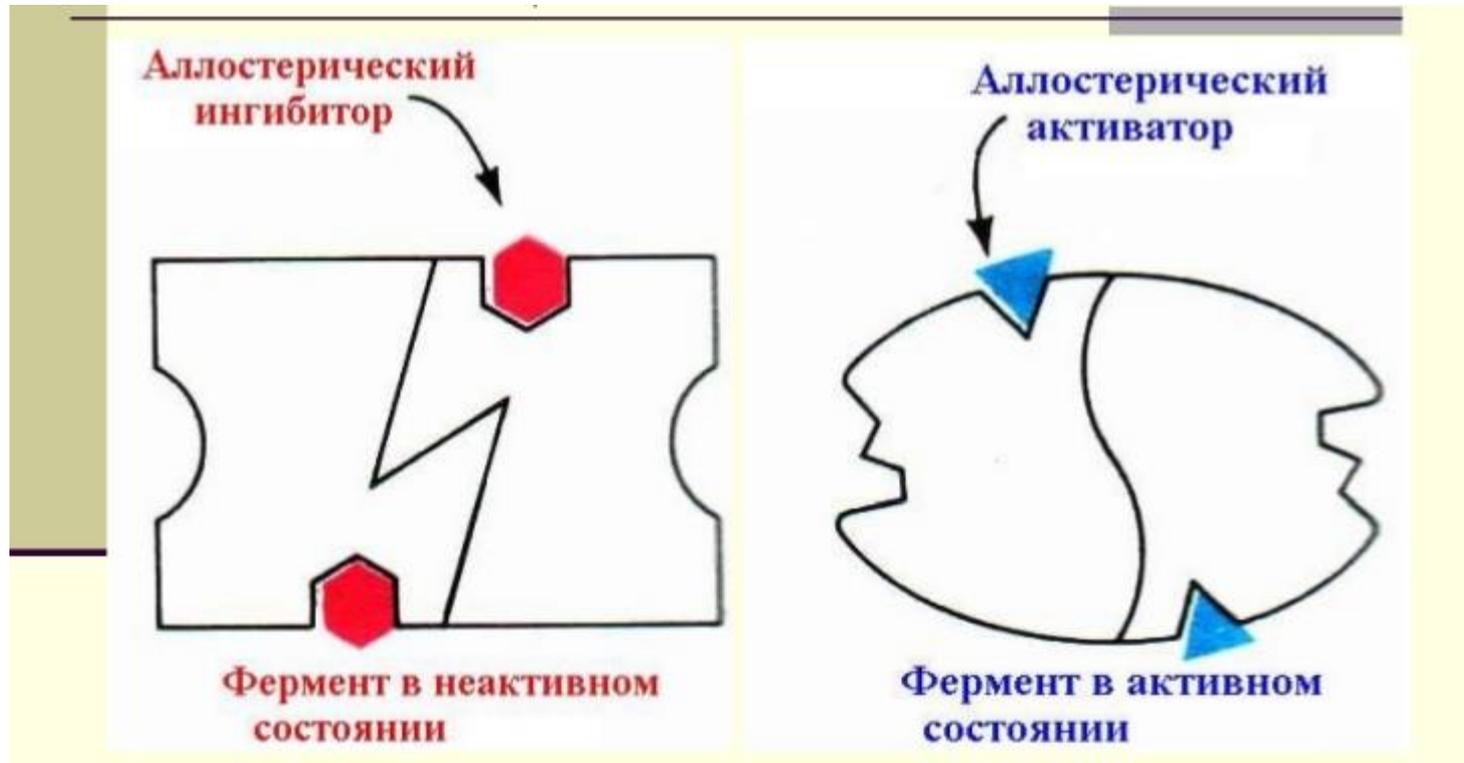
- Аллостерические ферменты катализируют **ключевую реакцию** (как правило необратимую и самую медленную) **метаболического пути**.
- Аллостерические ферменты обладают свойством **кооперативности**.
- Аллостерическая регуляция может приводить **к активации** или **ингибированию фермента**.
- Регуляция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

Кинетика аллостерических ферментов



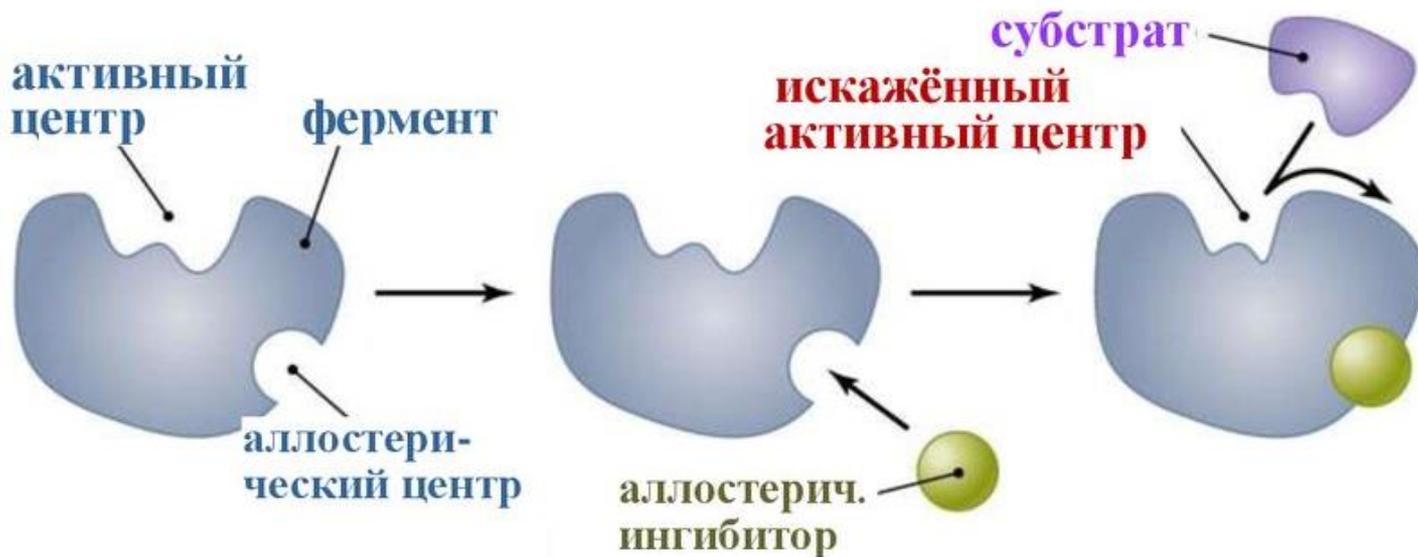
Не подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен (S-образная кривая).

Алlostерические эффекторы делятся на два типа

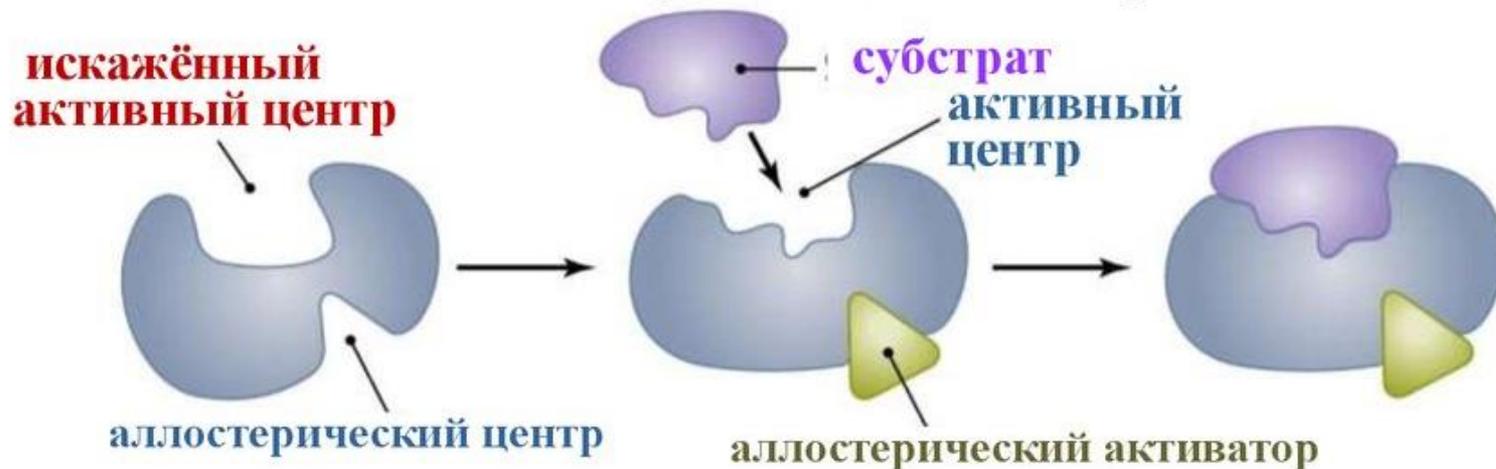


Регулируют активность фермента, изменяя его конформацию

Аллостерическое ингибирование

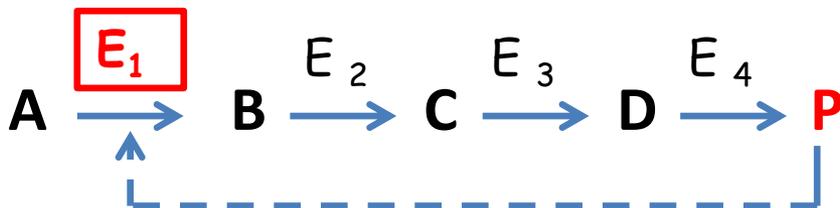


Аллостерическое активирование



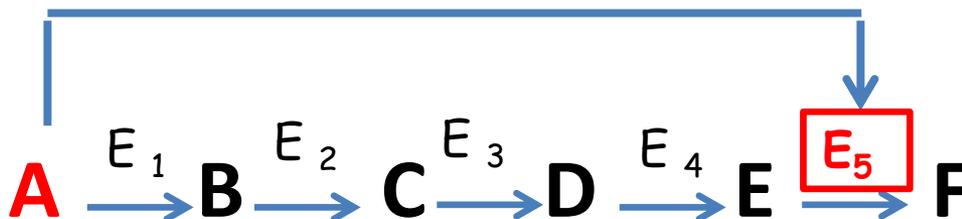
Аллостерические эффекторы

- 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

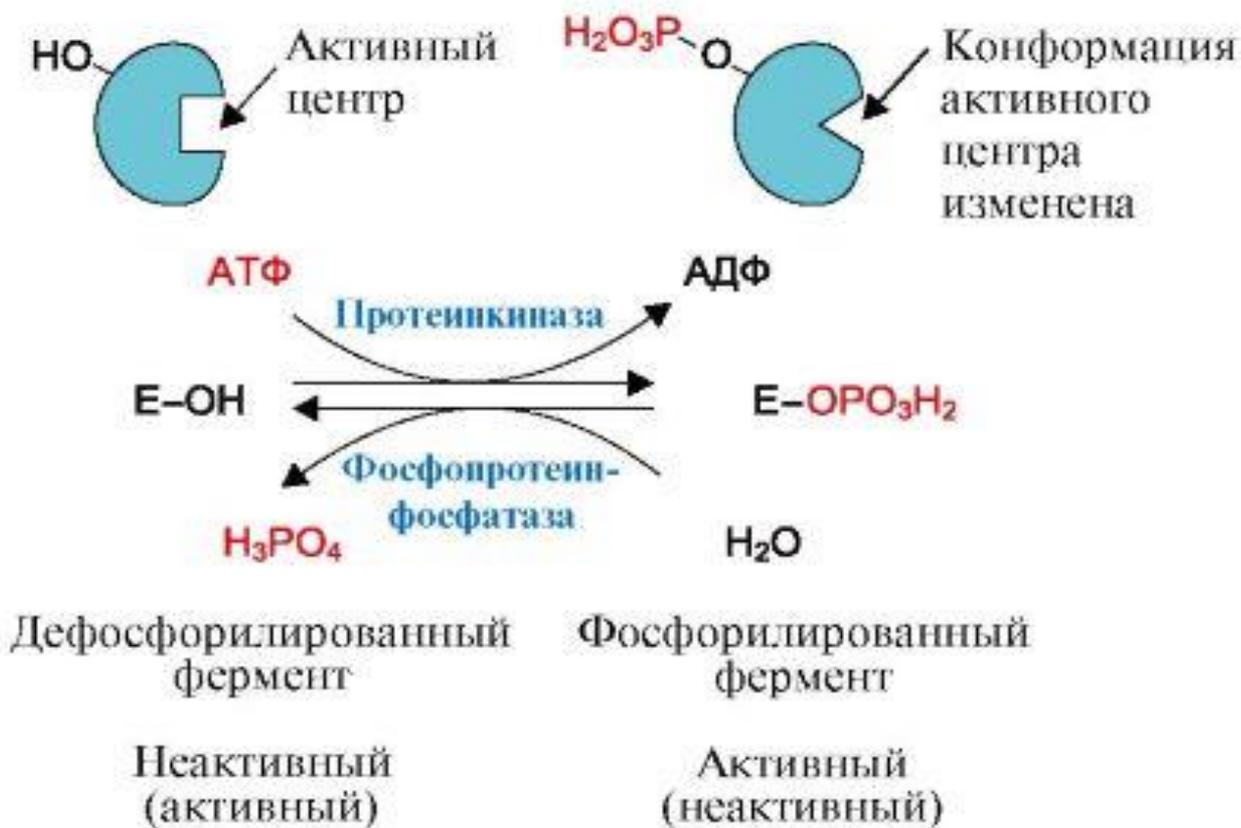
- Активация предшественником: субстрат или продукт первой реакции является аллостерическим активатором фермента, катализирующего ключевую реакцию заключительных этапов метаболического пути.



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



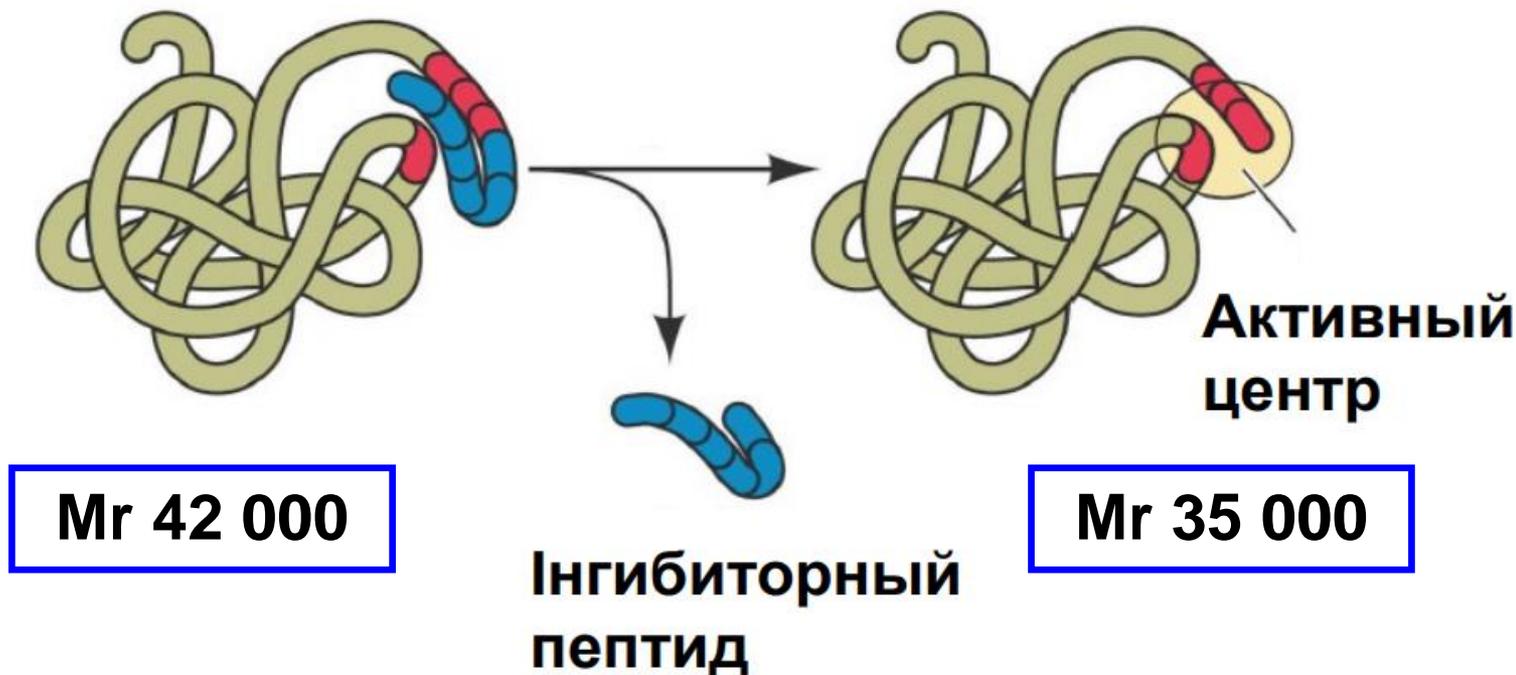
Регуляция путем частичного протеолиза

- 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

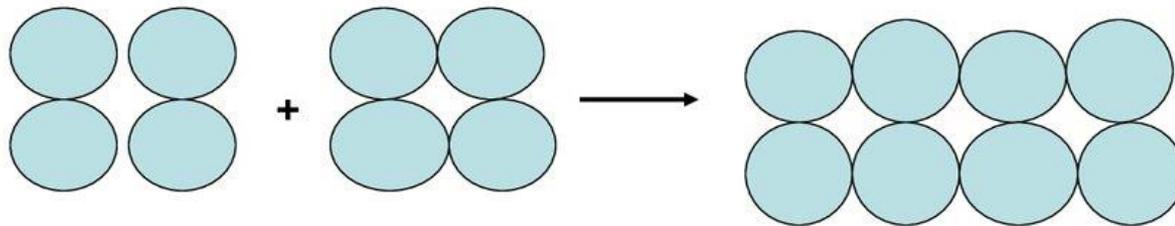
Необратимая
регуляция



Регуляция путем ассоциации-диссоциации протомеров

Регуляция активности путем ассоциации/диссоциации

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



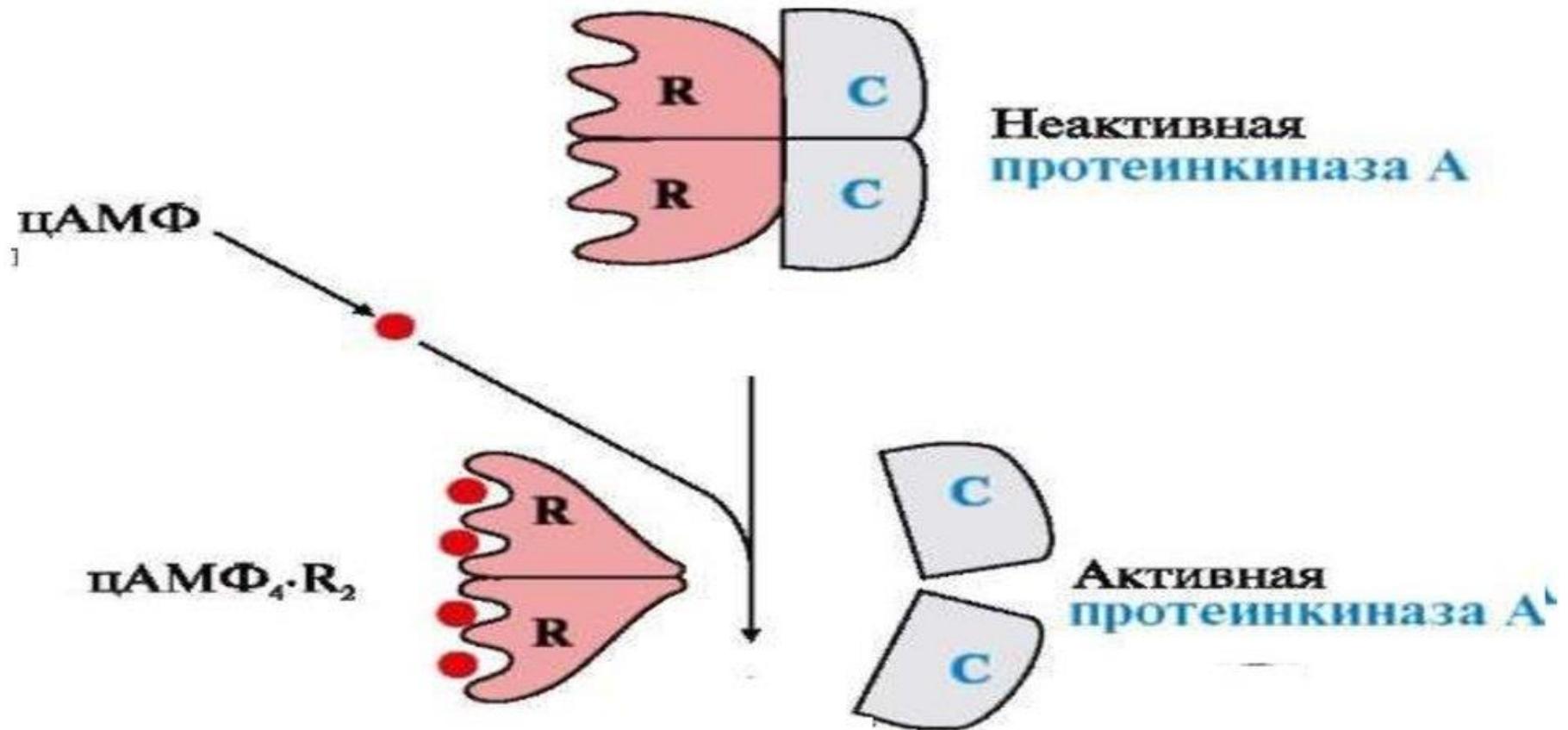
E неактивный

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!