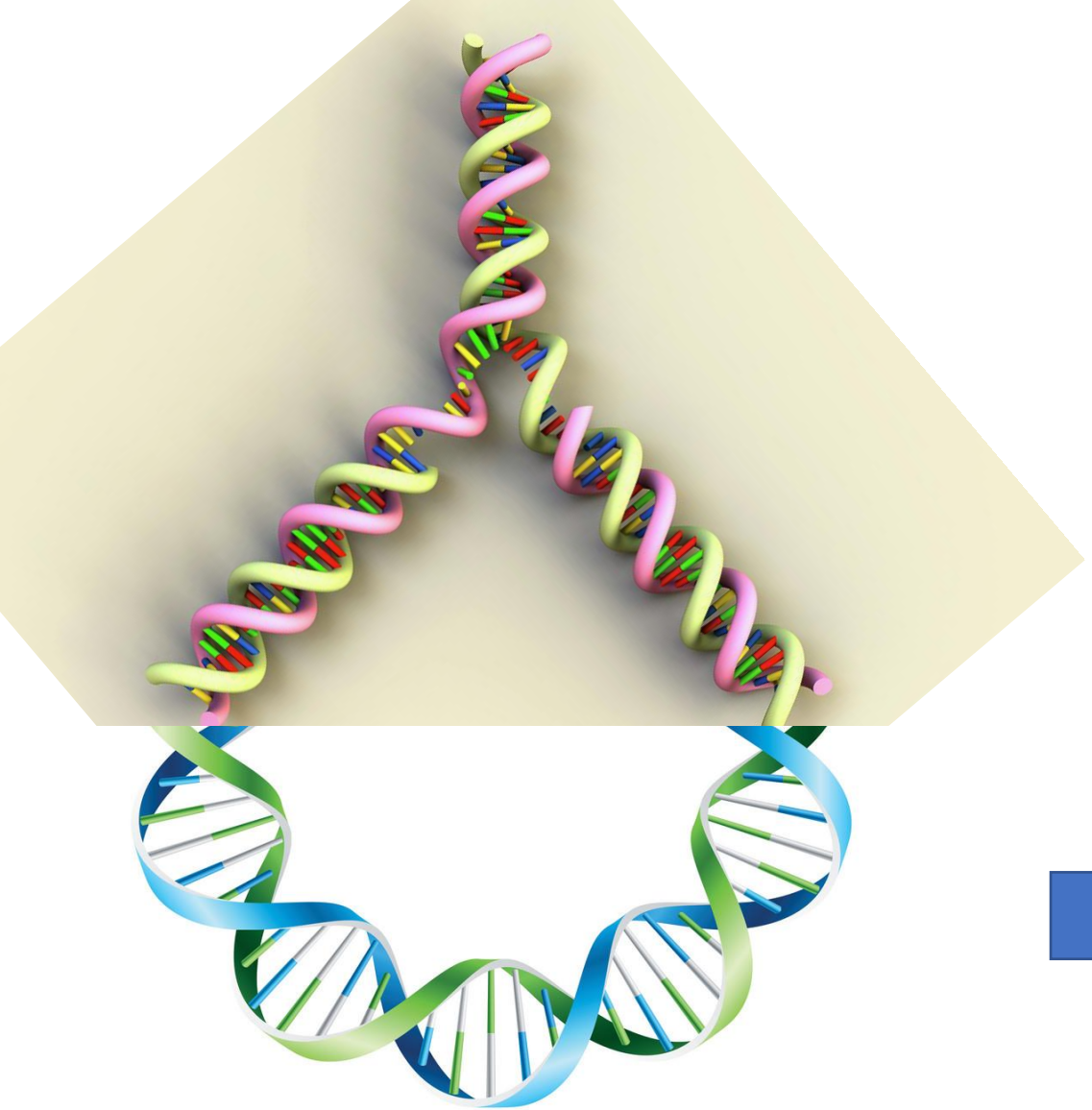
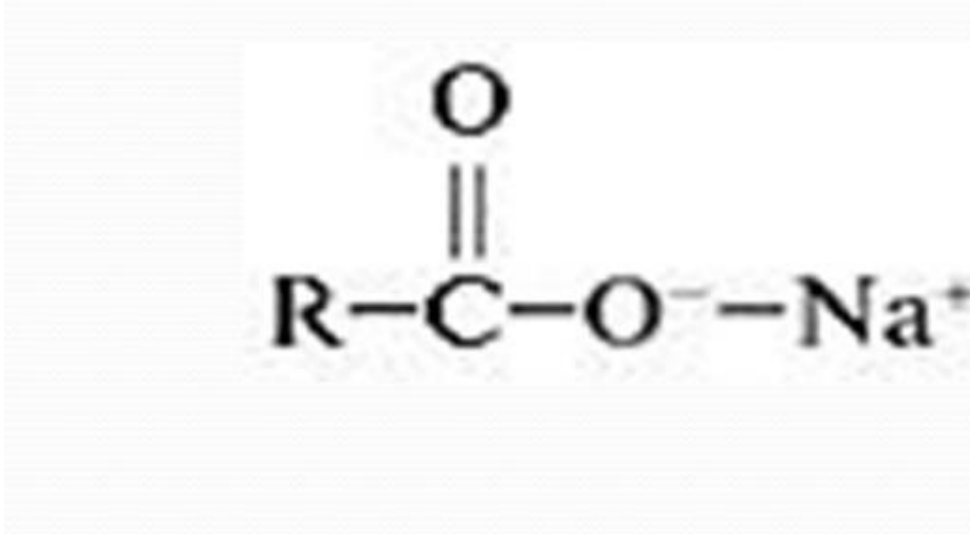
Ферментативная кинетика





- Уравнение Хендерсона –Хассельбаха
- Изоэлектричсекая точка
- Закон Бугера-Ламберта-Бэра
- Классификация ферментов
- Кофакторы
- Уравнение Михаэлиса – Ментен
- Ингибирование

Уравнение Хендерсона -Хассельбаха

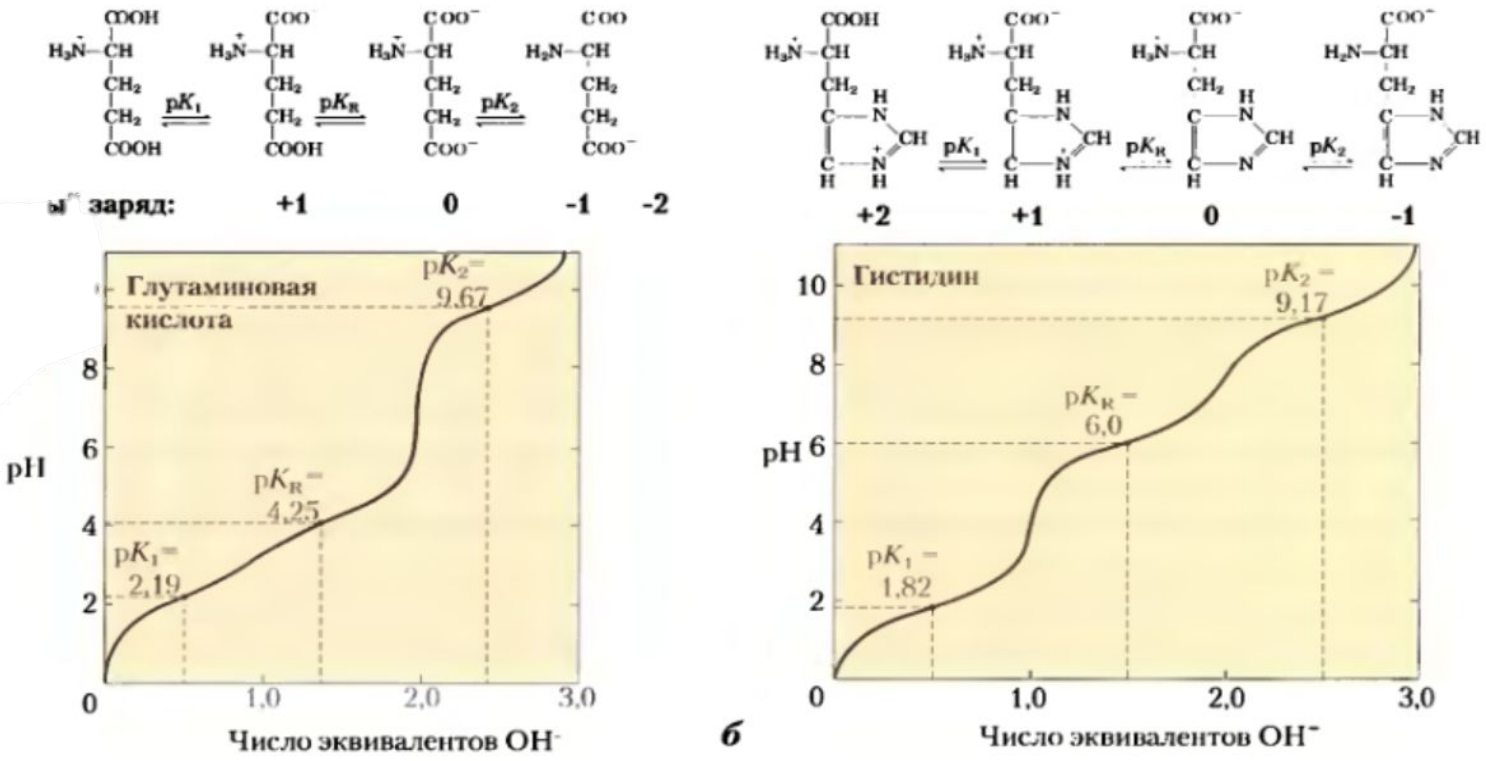
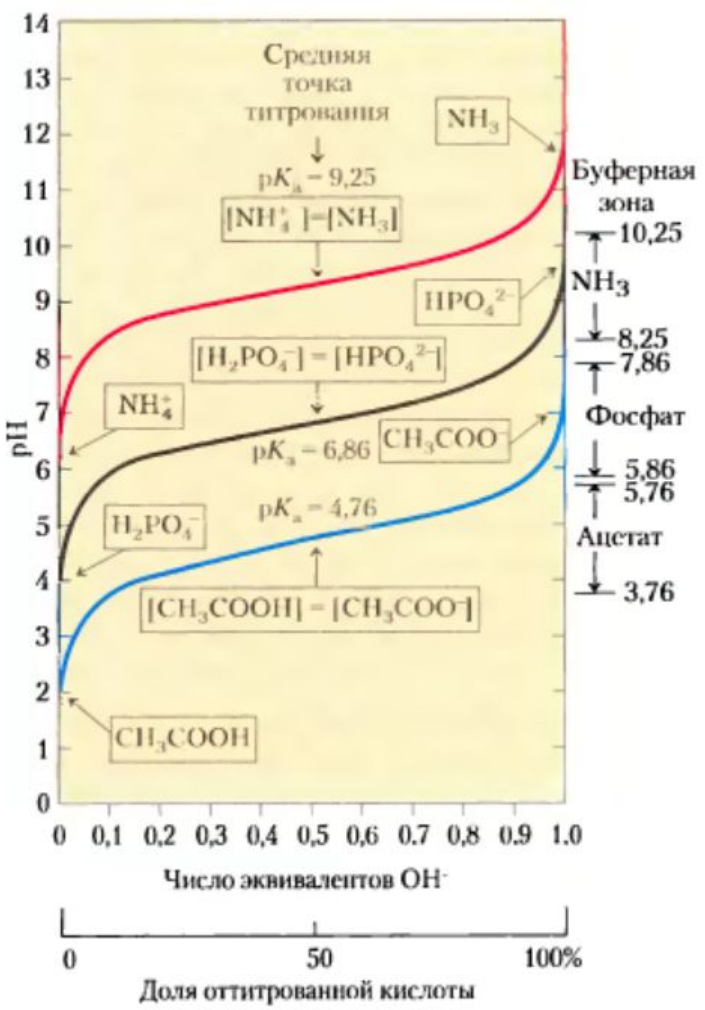


Рис. 3-12. Кривые титрования *а*) глутаминовой кислоты и *б*) гистидина. Значения pK_a R-групп обозначены как pK_R.

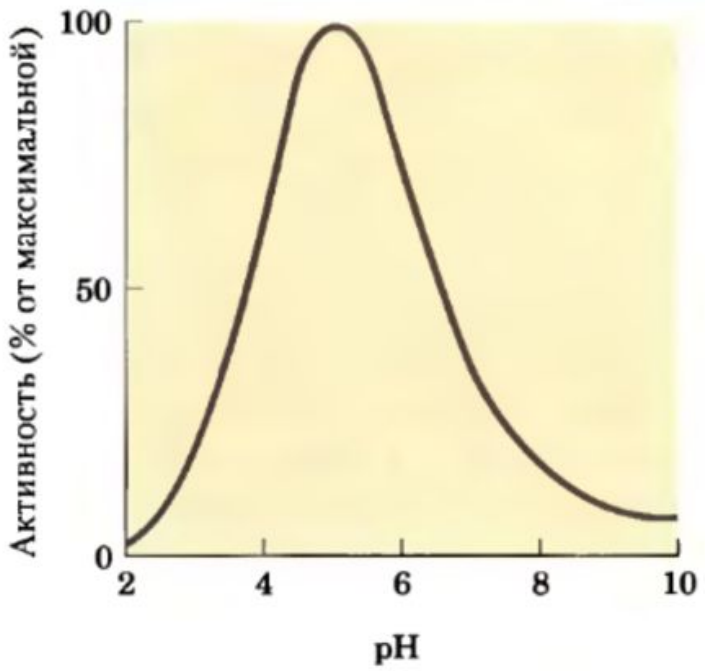


$$pH = pK_a + \lg\frac{[A^-]}{[HA]}$$

Изоэлектрическая точка

- Значение pH, в котором молекула не имеет заряда, называется изоэлектрической точкой и равно среднему арифметическому констант равновесия заряженных групп
- Аминокислоты в изоэлектрической точке являются цвиттер - ионами

21. Оптимум pH для действия лизоцима. В активном центре лизоцима расположены два аминокислотных остатка, играющих основную роль в катализе: Glu^{35} и Asp^{52}. Значения pK_a карбоксильных групп боковых цепей этих остатков равны соответственно 5,9 и 4,5. В каком состоянии ионизации (протонированном или депротонированном) находится каждый из этих остатков



при оптимальном значении pH для лизоцима (5,2)? Как состояние ионизации этих остатков может объяснить приведенная на рисунке pH-зависимость активности лизоцима?

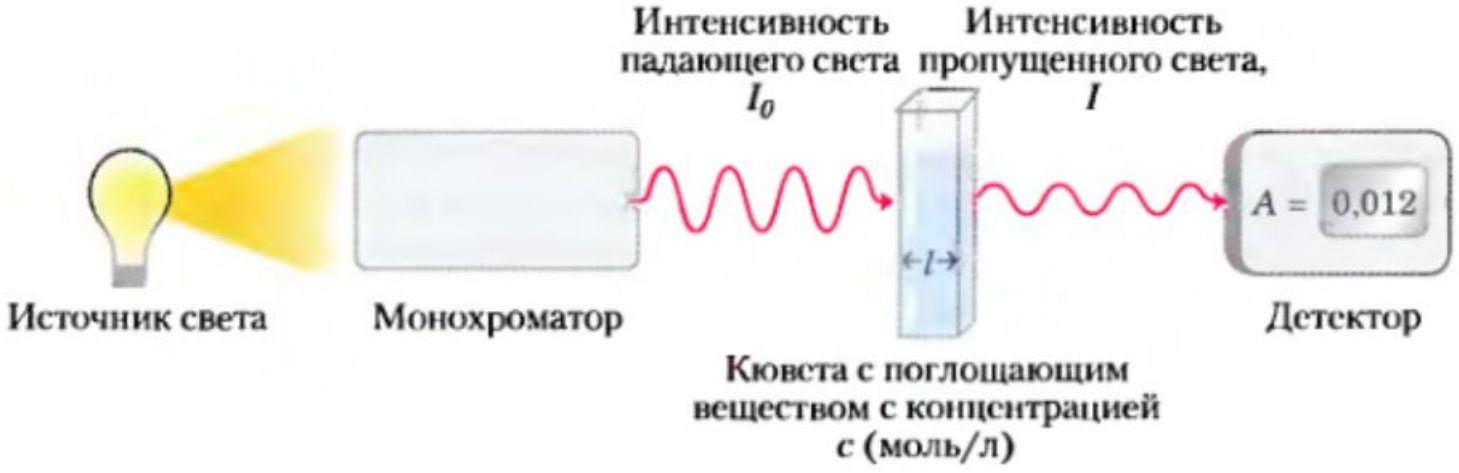
Определите значение изоэлектрической точки пептида: Гли-Глу-Лиз

Аминокислота	pKa (αCOOH)	pKa (αNH$_3^+$)	pKa (радикал)
Глицин	2,34	9,58	-
Глутаминовая кислота	2,19	9,67	4,25
Лизин	2,18	8,95	10,53

13. Изоэлектрическая точка гистонов. Гистоны – это белки, содержащиеся в ядре эукариотической клетки и прочно связанные с молекулами ДНК, которые богаты фосфатными группами. Значение p*I* гистонов очень высокое – около 10,8. Какие аминокислотные остатки должны в большом количестве содержаться в молекулах гистонов? Каким образом эти остатки обеспечивают прочное связывание гистонов с ДНК?

Закон Бугера-Ламберта-Бэра

$$\lg(I/I_0) = \varepsilon c l,$$



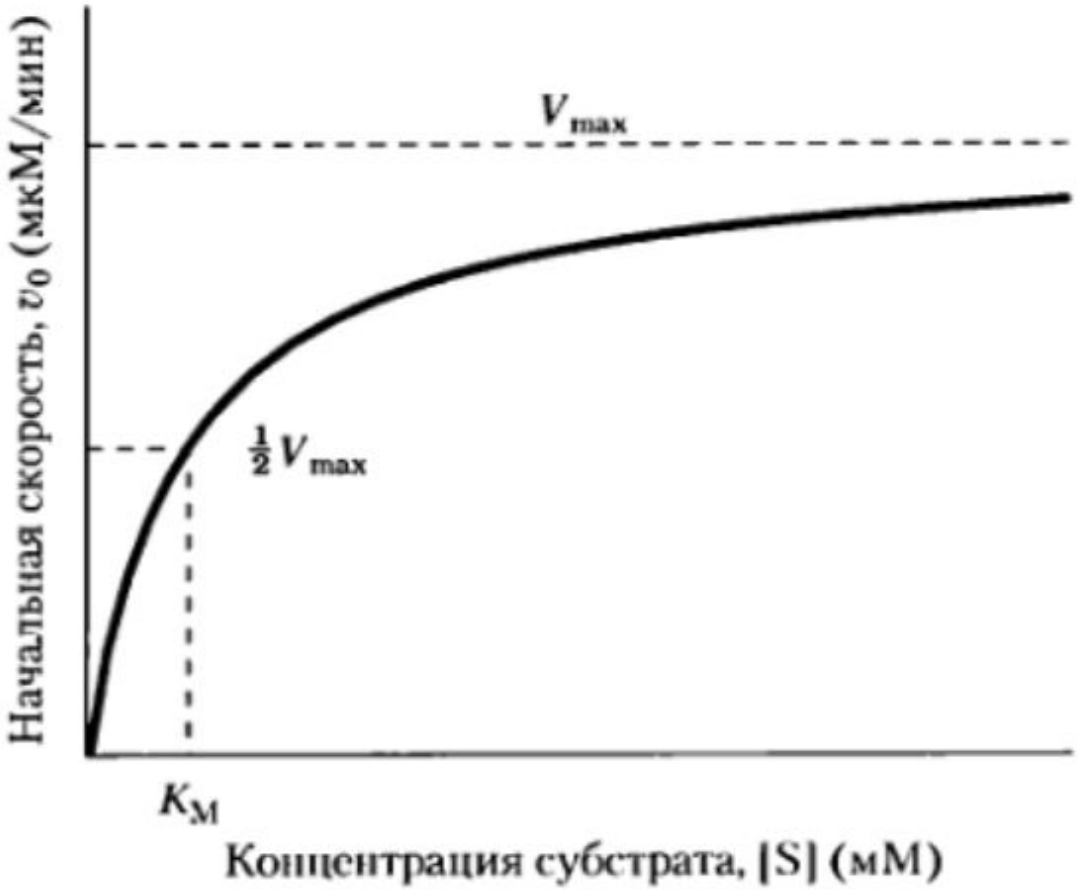
Классификация ферментов

Таблица 6-3 Международная система классификации ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов (гидрид-ионов или атомов H)
2	Трансферазы	Перенос групп
3	Гидролазы	Реакции гидролиза (перенос функциональных групп на молекулу воды)
4	Лиазы	Присоединение групп к двойной связи или образование двойной связи путем удаления группы
5	Изомеразы	Перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм
6	Лигазы	Образование связей C–C, C–S, C–O и C–N в реакциях конденсации, сопряженных с расщеплением ATP

Переходное состояние (≠)
Свободная энергия, G
$\Delta G^{\neq}_{S \to P}$
$\Delta G^{\neq}_{P \to S}$
$\Delta G^{\circ\circ}$
S
Основное состояние
P
Основное состояние
Координата реакции

Переходное состояние (≠)
Свободная энергия, G
$\Delta G^{\neq}_{некат}$
≠
$\Delta G^{\neq}_{кат}$
ES
EP
S
P
Координата реакции



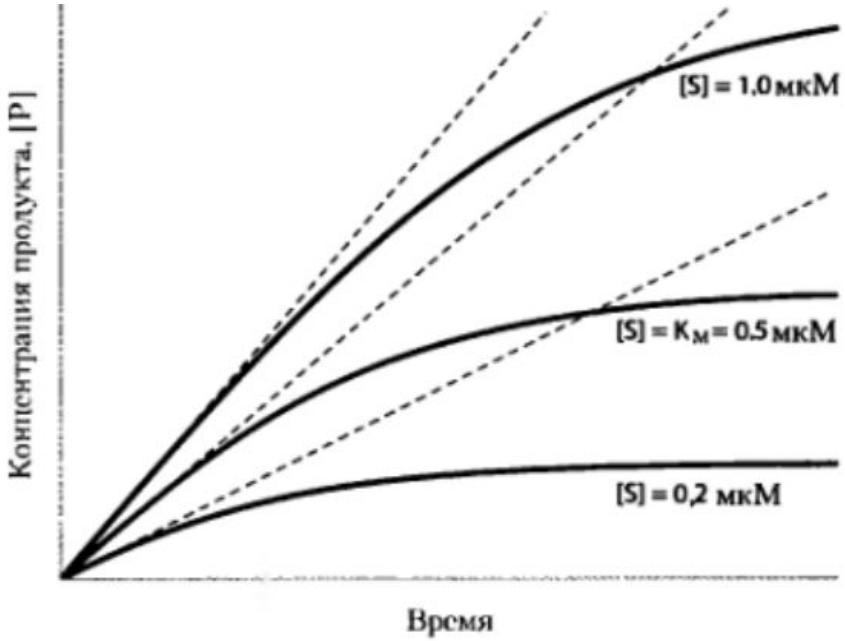


Рис. 6-10. Начальная скорость ферментативных реакций. Гипотетический фермент катализирует реакцию S ⇌ P, присутствуя в концентрации, достаточной для достижения максимальной скорости V_{max} = 1 М/мин. Константа Михаэлиса K_M (ее определение см. в тексте) составляет 0,5 мкМ. На графике представлены кривые, соответствующие ходу реакции при концентрации субстрата, которая ниже значения K_M, равна или выше него. Скорость ферментативной реакции снижается по мере превращения субстрата в продукт. Угол наклона касательной, проведенной к каждой кривой в момент времени $t = 0$, соответствует начальной скорости v_0.

Уравнение Михаэлиса – Ментен и Лайнувера - Берка

$$v_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}\,[S]} + \frac{[S]}{V_{max}\,[S]}$$

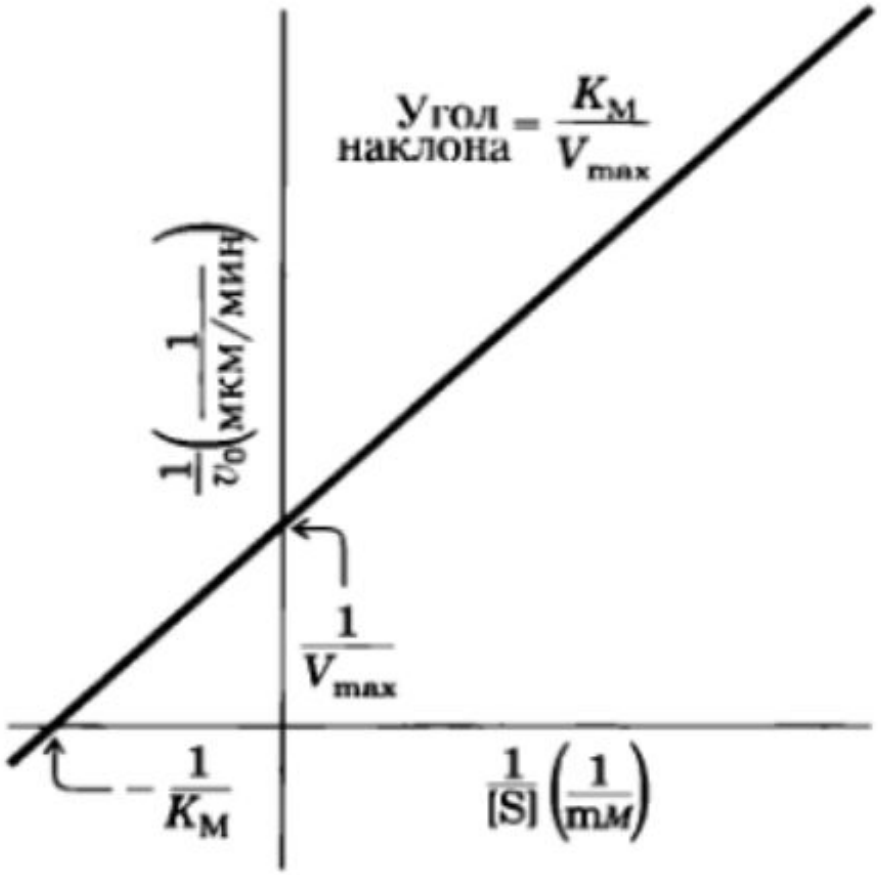


Рис. 1. График в двойных обратных координатах (график Лайнуивера–Берка).

Был исследован фермент, катализирующий следующую химическую реакцию:

$$\text{ГРУСТЬ} \rightleftharpoons \text{ВЕСЕЛЬЕ}$$

Исследователи назвали фермент веселазой. Они обнаружили, что k_{cat} для этого фермента составляет 600 $с^{-1}$. Было решено поставить несколько экспериментов.

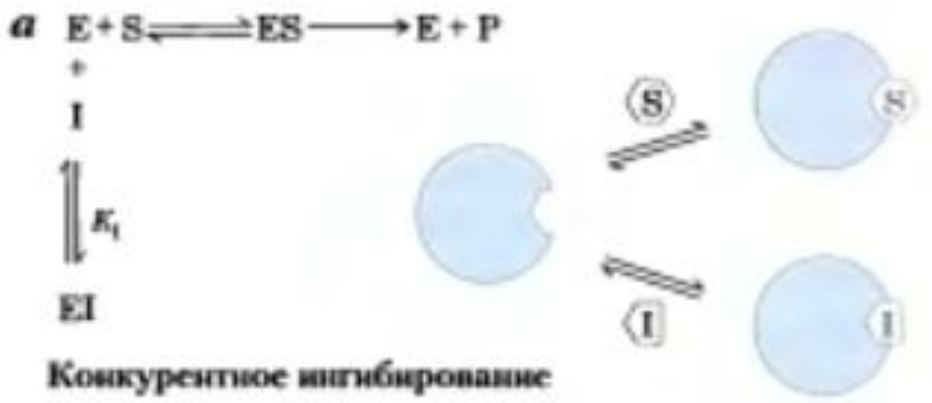
При $[E_t]$ = 20 нМ и [ГРУСТЬ] = 40 мкМ начальная скорость реакции v_0 равна 9,6 мкМ · $с^{-1}$. Найдите значение K_M для субстрата ГРУСТЬ.

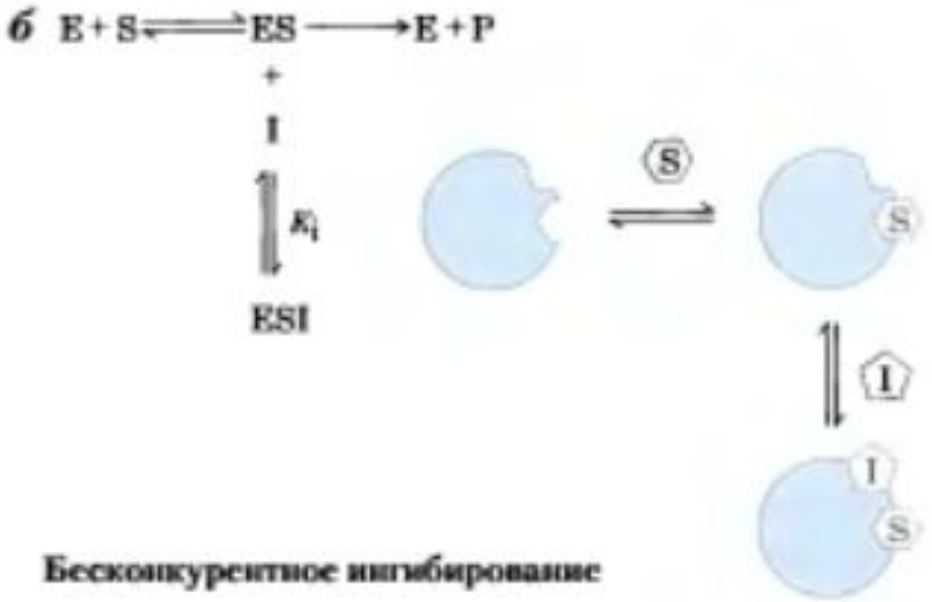
Ингибирование

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{и} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Типы обратимого ингибирования





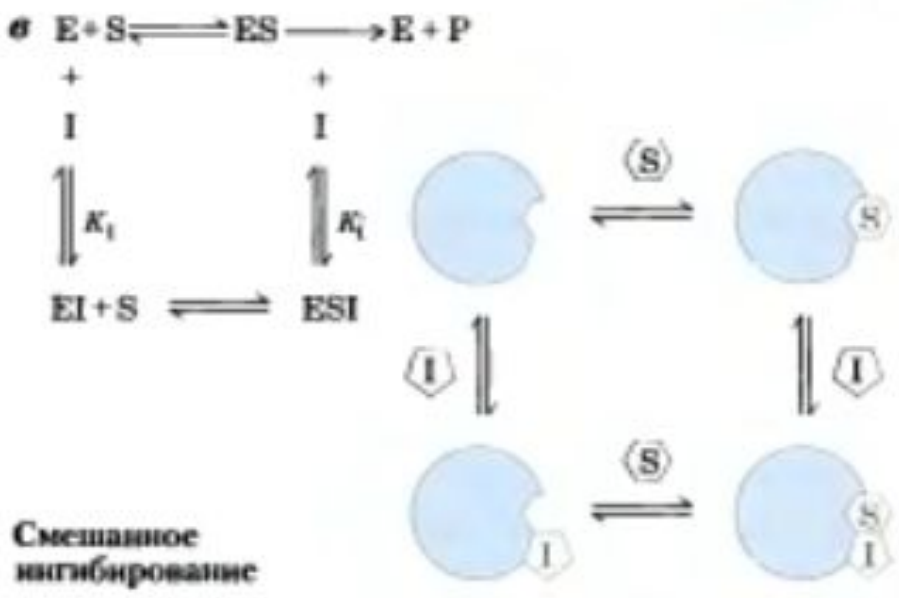
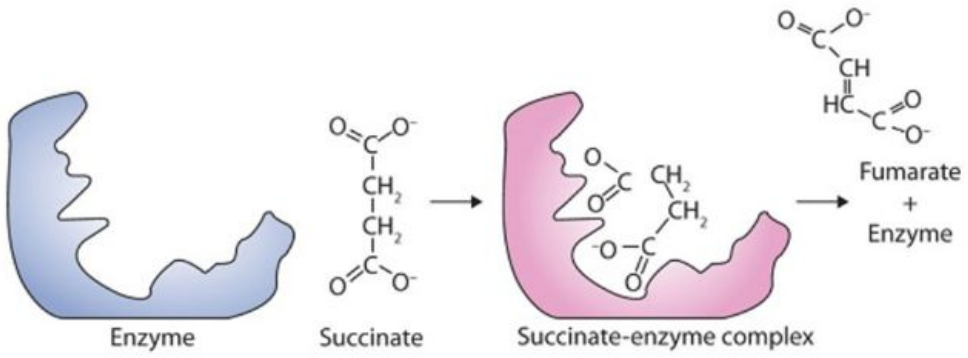
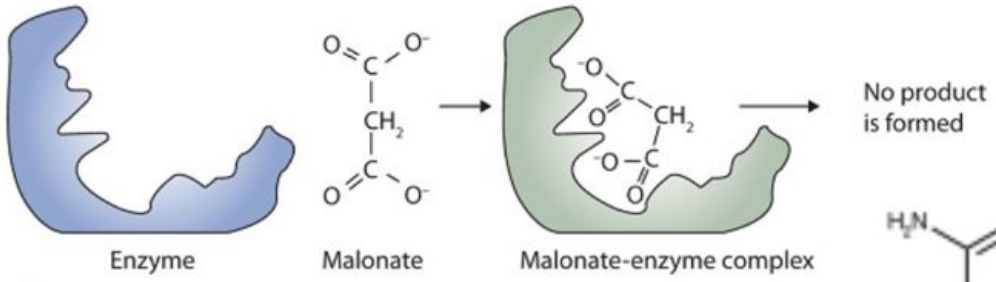


Рис. 6-15. Три типа обратимого ингибирования. *а*) Конкурентный ингибитор связывается в активном центре фермента; связывание ингибитора с ферментом характеризуется константой равновесия (K_i). *б*) Бесконкурентный ингибитор связывается вне активного центра фермента, причем связывание происходит только с уже оформировавшимся комплексом ES. Связывание ингибитора с комплексом ES характеризуется константой (K_i'). *в*) При смешанном типе ингибирования ингибитор связывается вне активного центра, причем может связываться как с E, так и с ES.

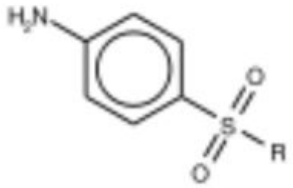
Обратимое ингибирование



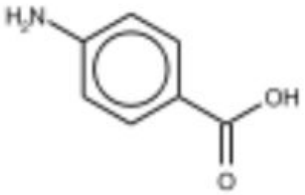
(a)



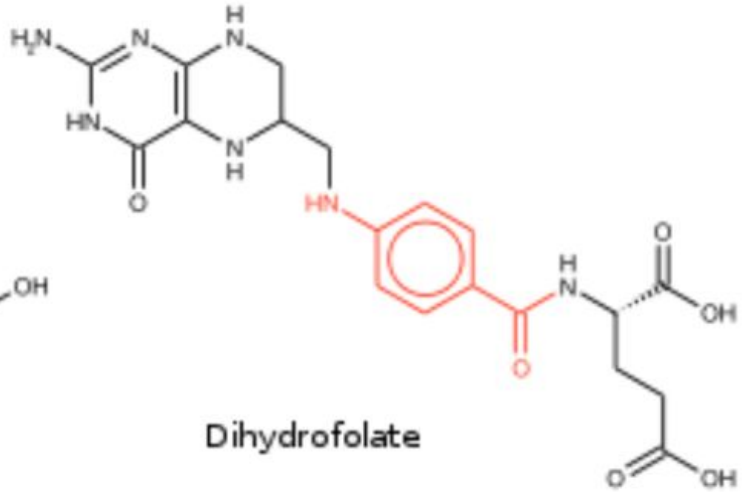
(b)



Sulfanilamide

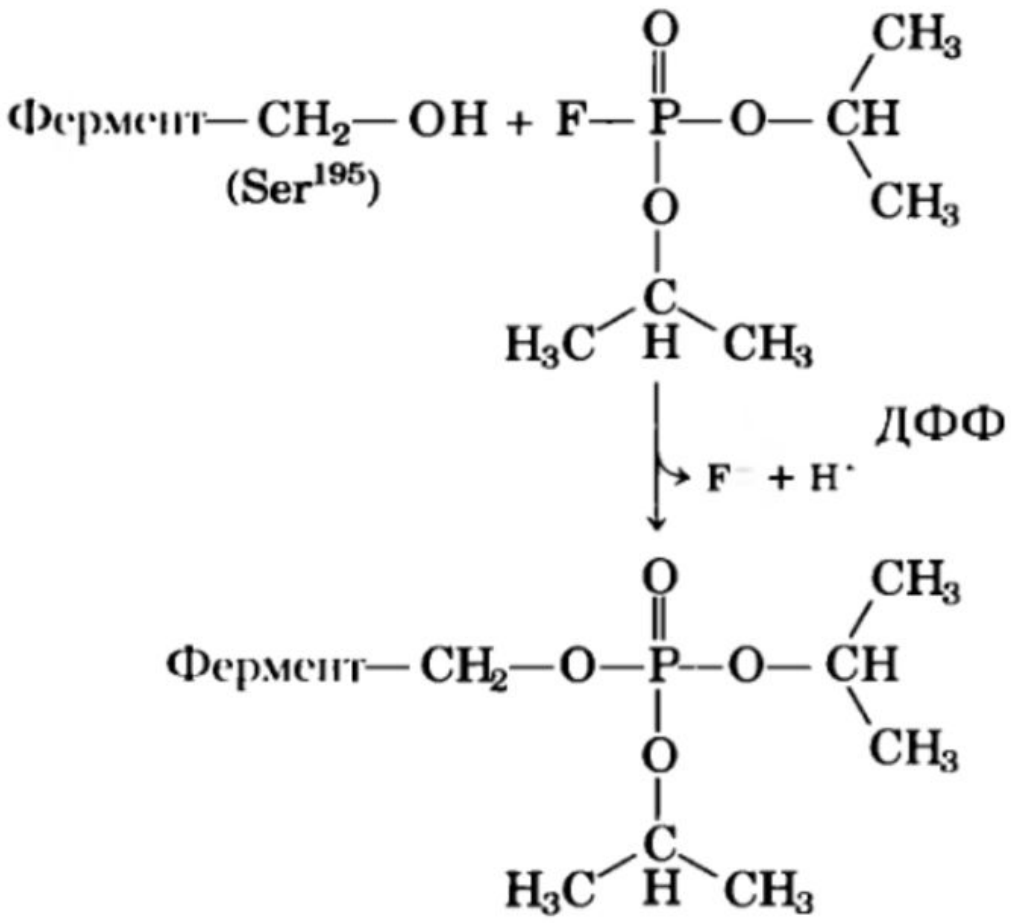


PABA



Dihydrofolate

Необратимое ингибирование



$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

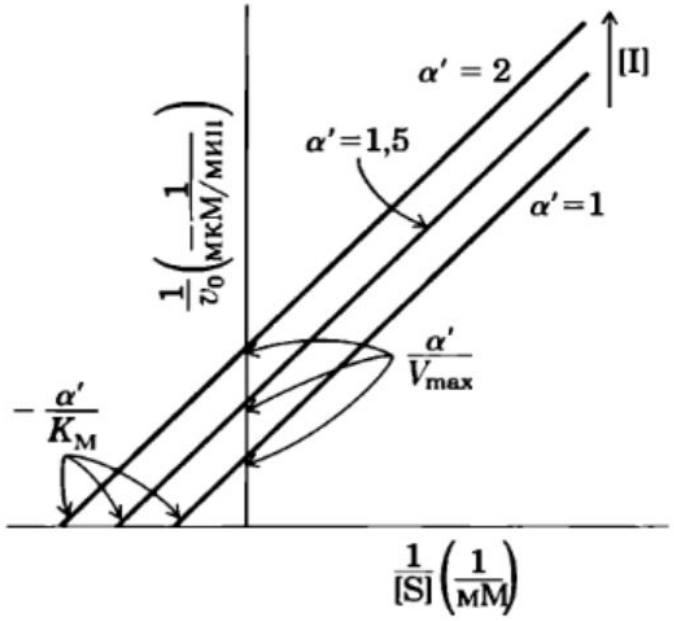


Рис. 2. Бесконкурентное ингибирование.

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

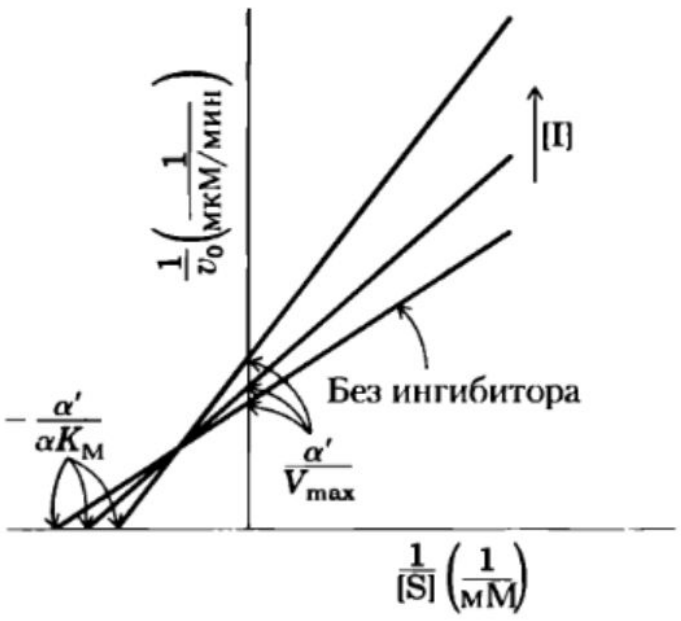


Рис. 3. Смешанное ингибирование.

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

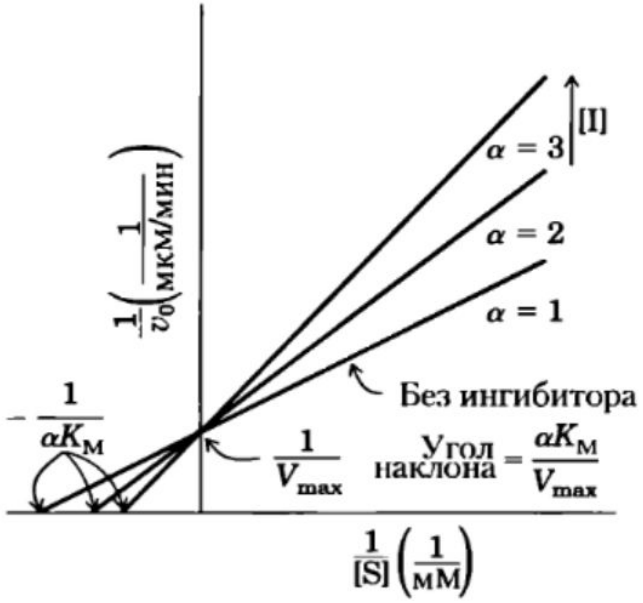


Рис. 1. Конкурентное ингибирование.

Исследователи, изучавшие веселазу (см. примеры 6-1 и 6-2), выяснили, что ее мощным конкурентным ингибитором является вещество СТРЕСС. Добавление 1 нМ СТРЕСС повышает измеряемое значение K_M для субстрата ГРУСТЬ в два раза. Определите значения α и α' в этих условиях.

Кофакторы(простетические группы)

Фермент с кофактором называетсся холоферментс
Белковая часть - апоферме

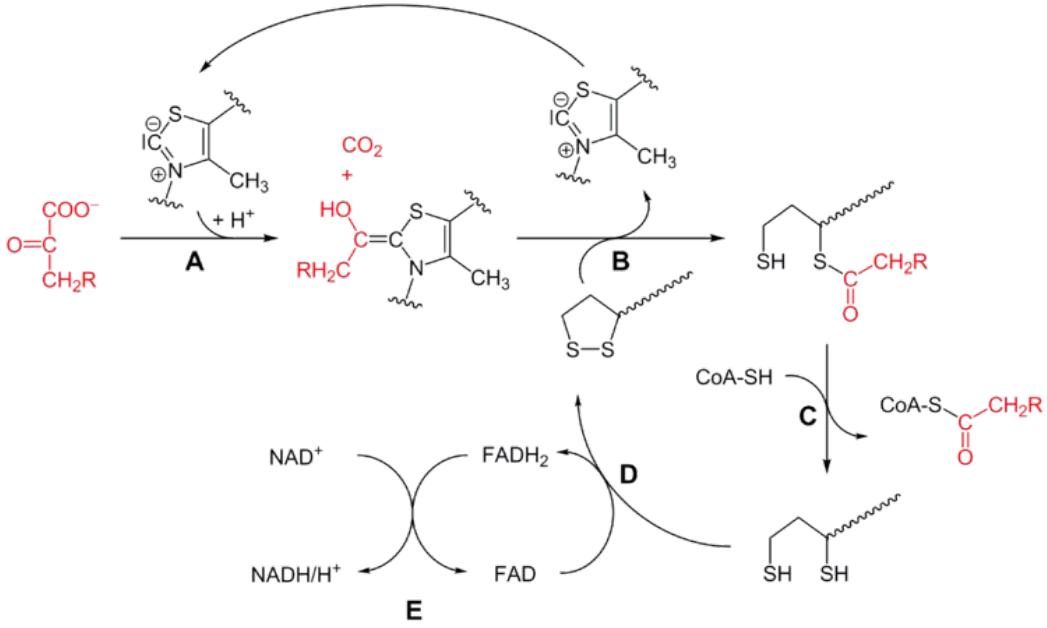
- неорганические

Таблица 6-1 Некоторые ионы и атомы, являющиеся кофакторами ферментов

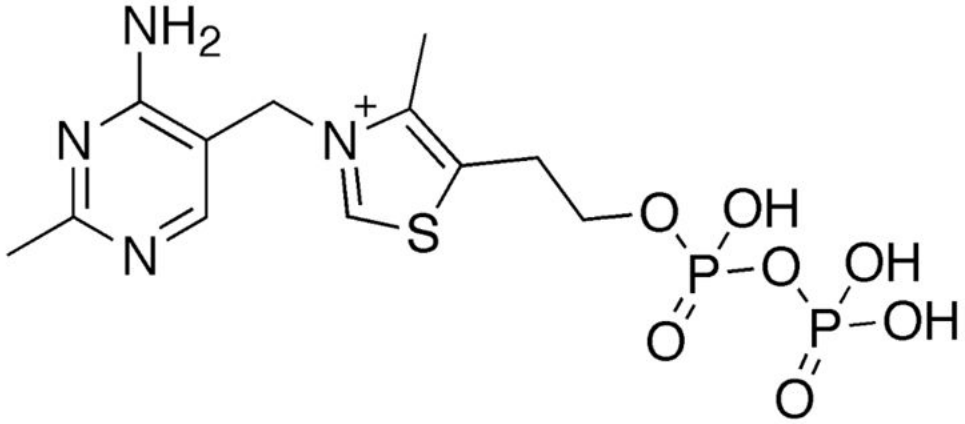
Ионы	Ферменты
Cu^{2+}	Цитохромоксидаза
Fe^{2+} или Fe^{3+}	Цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза
K^{+}	Пируваткиназа
Mg^{2+}	Гексокиназа, глюкозо-6-фосфатаза, пируваткиназа
Mn^{2+}	Аргиназа, рибонуклеотидредуктаза
Mo	Нитрогеназа
Ni^{2+}	Уреаза
Se	Глутатионпероксидаза
Zn^{2+}	Карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа, карбоксипептидазы A и B

Коферменты

- органические

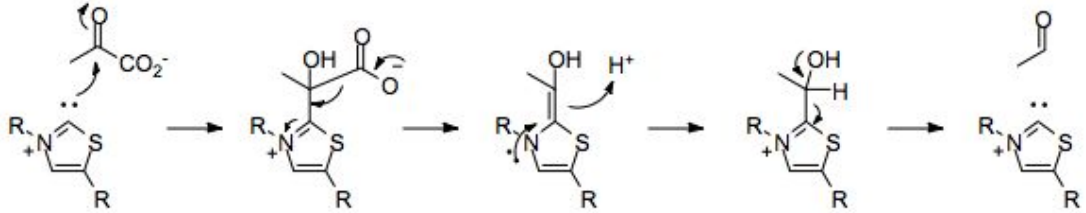


Тиаминпирофосфат (тиамин - Витамин B1)



Перенос альдегидных групп

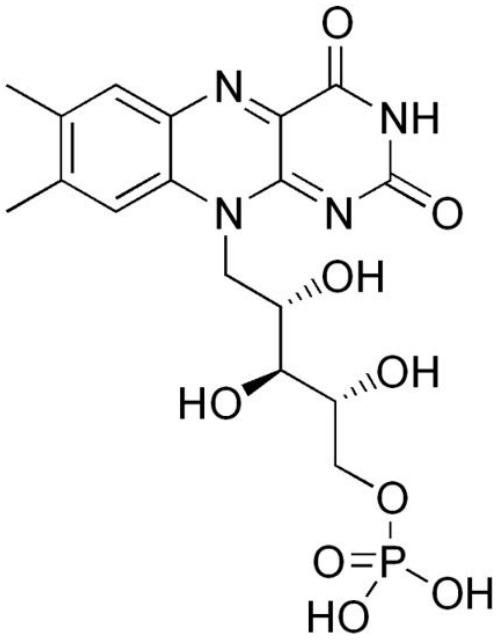
<u>Пример</u>: пируватдегидрогеназа, альфа-кетоглутаратдегидрогеназа, транскетолаза



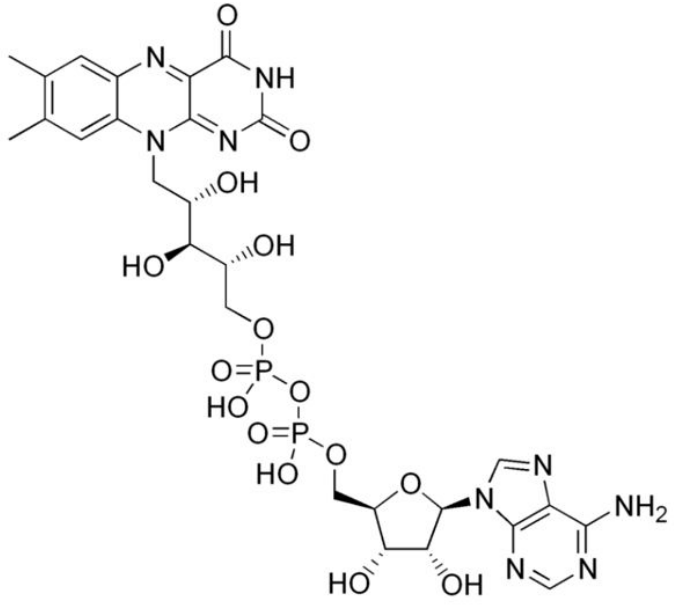
Флавинмононуклеотид и флавинадениндинуклеотид

(витамин В2 – рибофлавин)

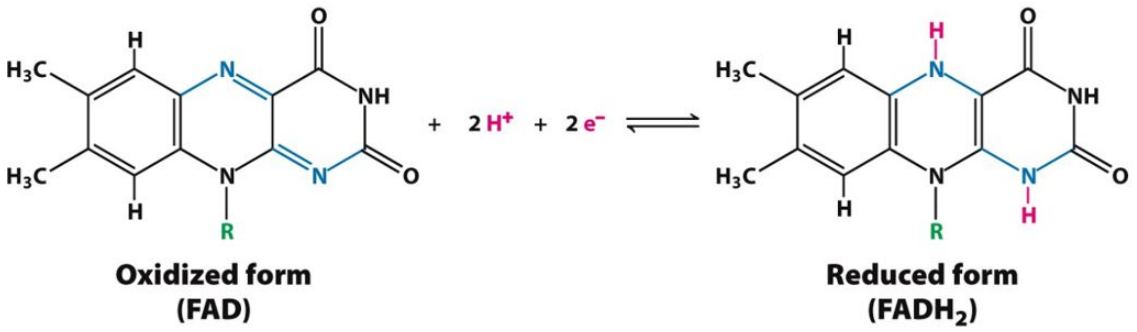
Участвует в ОВР



FMN

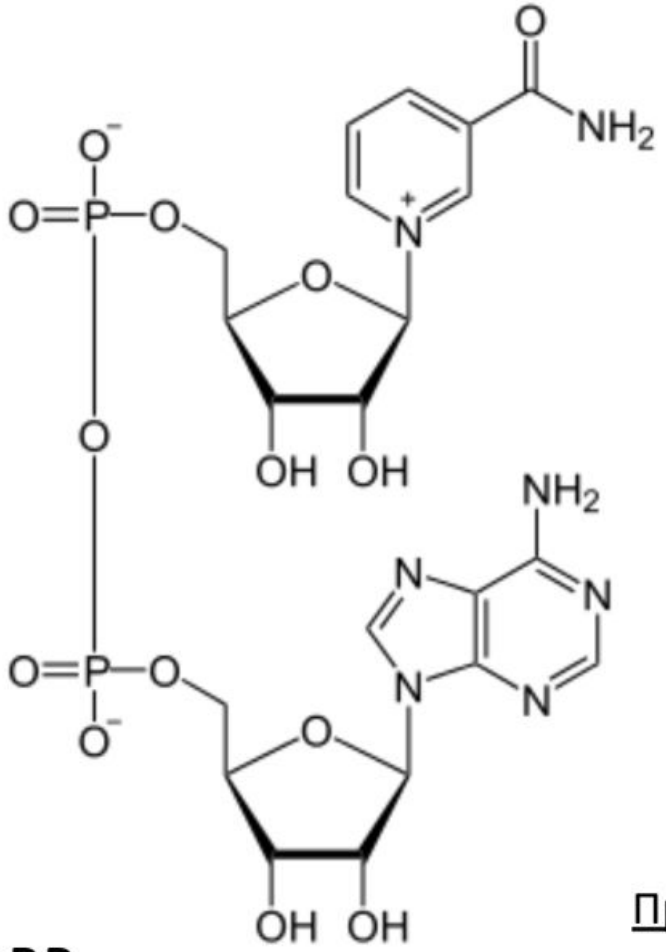


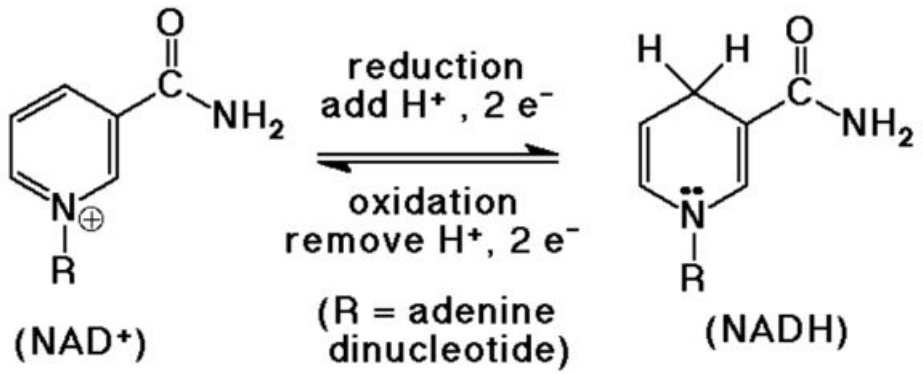
FAD



Пример: сукцинатдегидрогеназа (FAD), NADH – дегидрогеназа (FMN)

Никотинамидадениндинуклеотид (ниацин – витамин В3)





Пример: Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

OBP

NAD

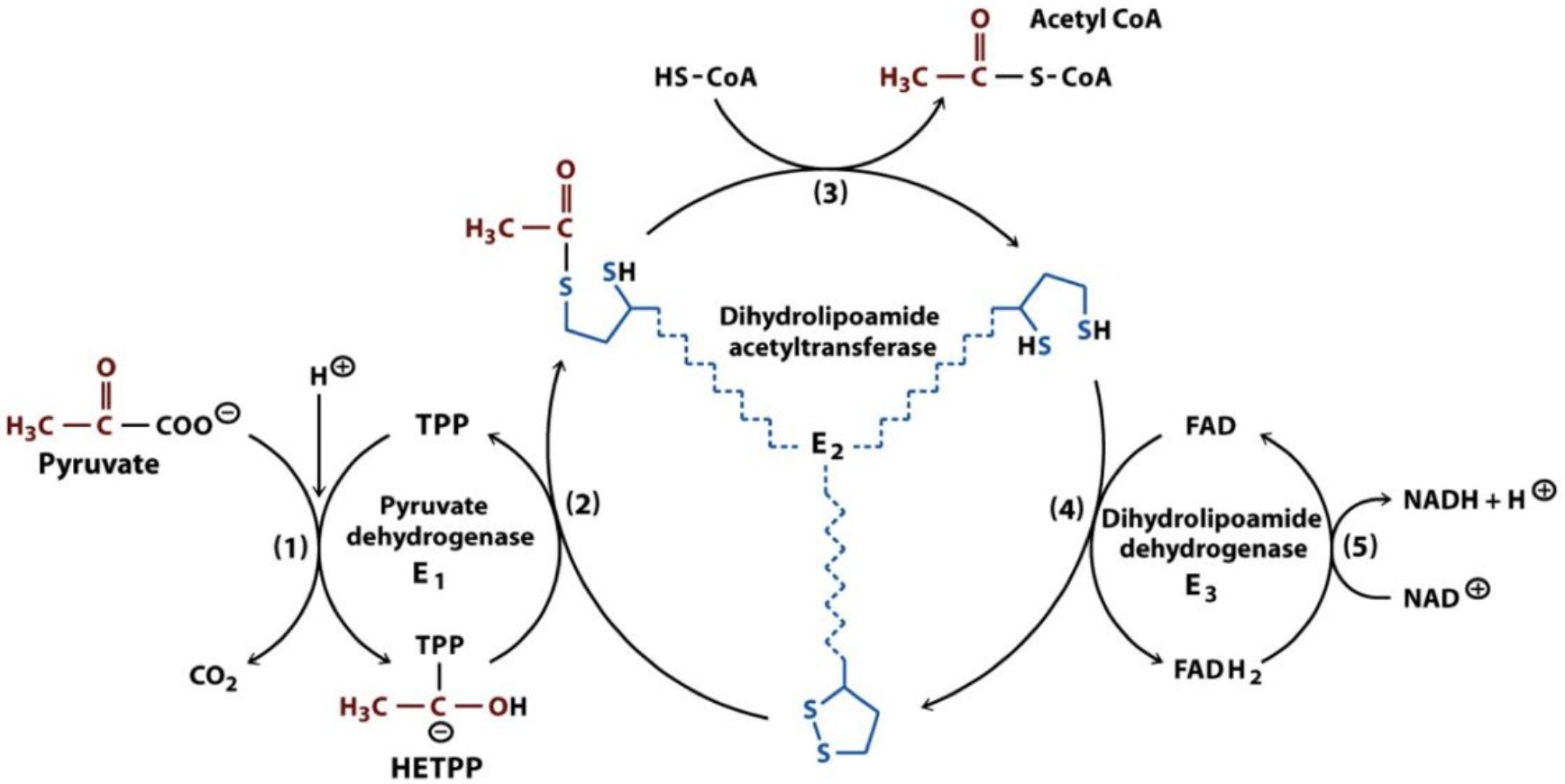
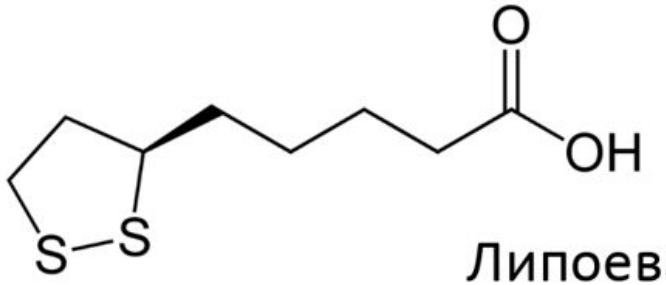
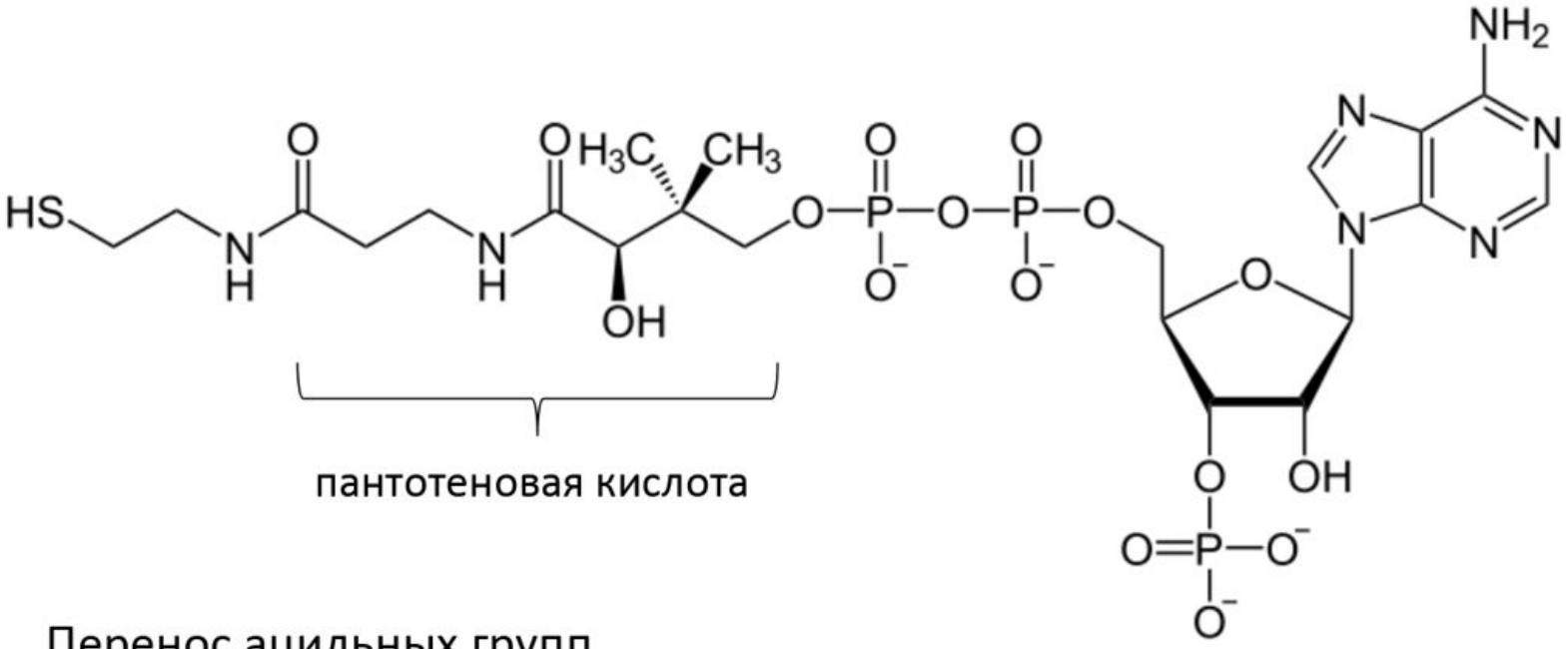


Figure 13-1 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



Липоевая кислота

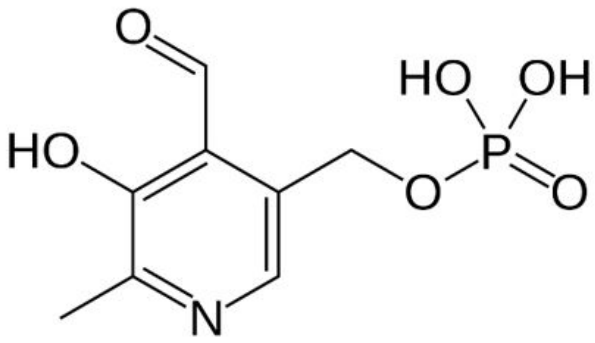
Кофермент А (витамин В5 - пантотеновая кислота)



Перенос ацильных групп

<u>Пример</u>: ацил-Коа-синтетаза

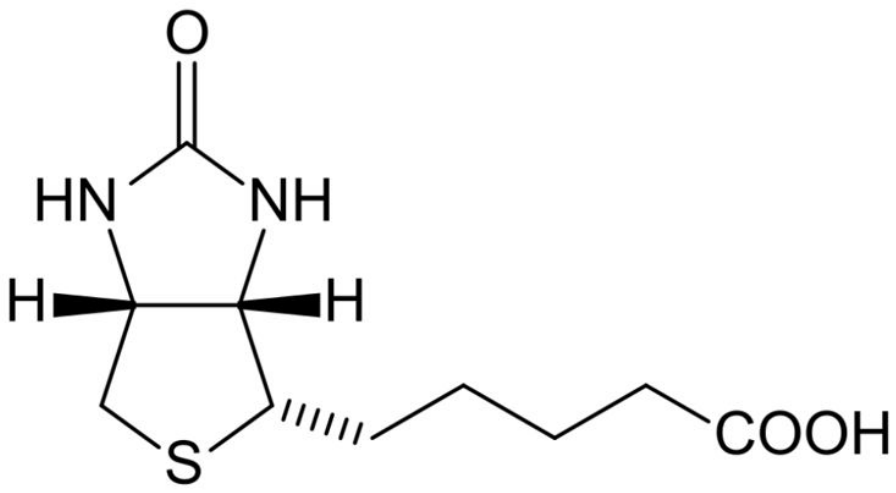
Пиридоксальфосфат (витамин В6 - пиридоксин)



Перенос аминогрупп, декарбоксилирование аминокислот

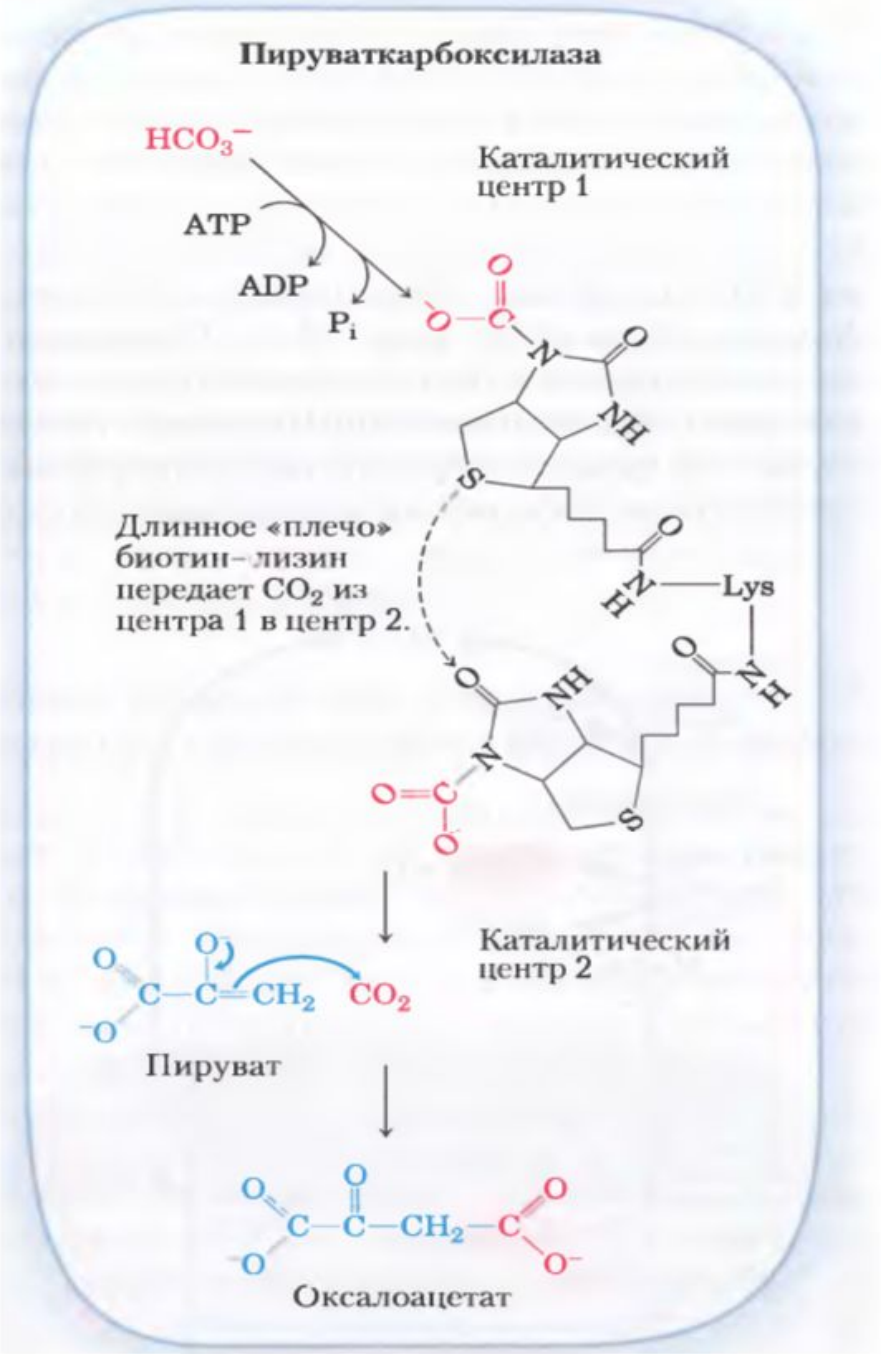
<u>Пример</u>: трансаминазы

Биотин (витамин Н, В7)

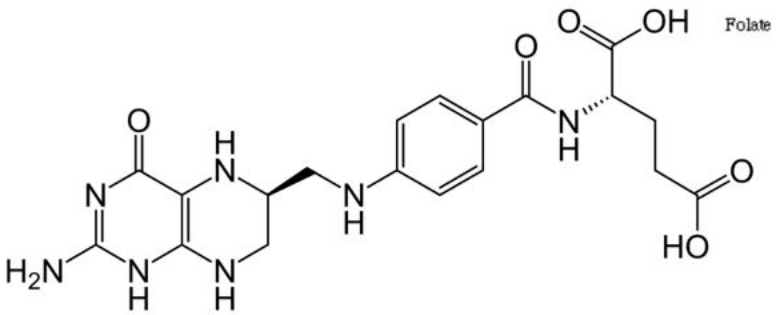


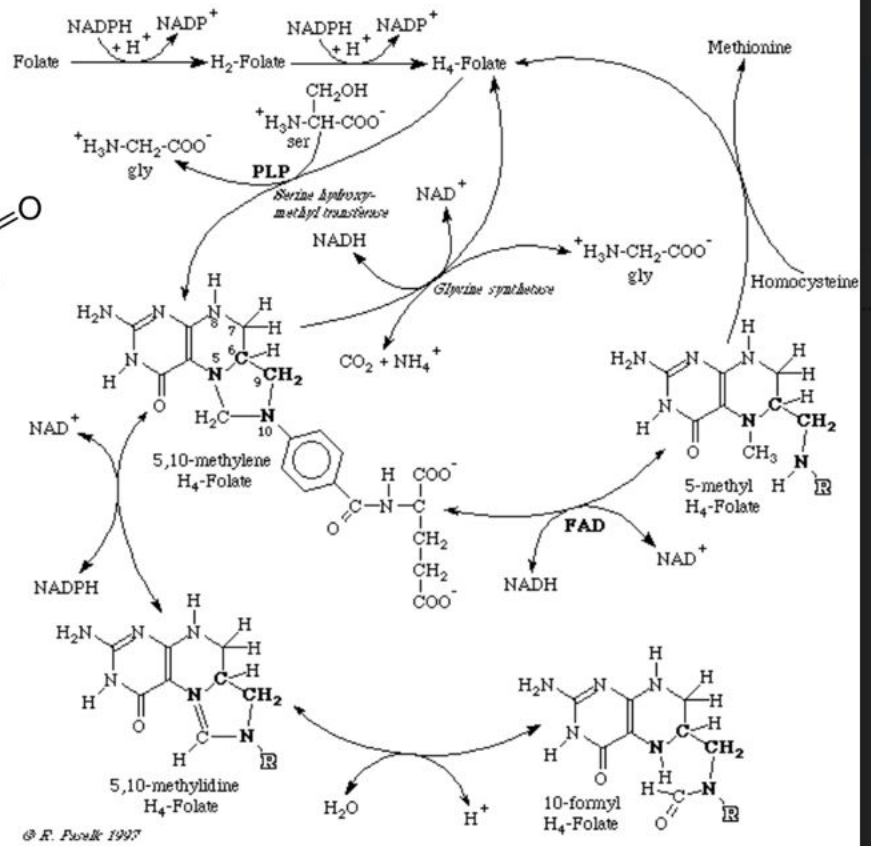
Перенос карбоксильной группы (CO_2)

<u>Пример</u>: пируваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза



Тетрагидрофолат (фолиевая кислота – витамин В9)

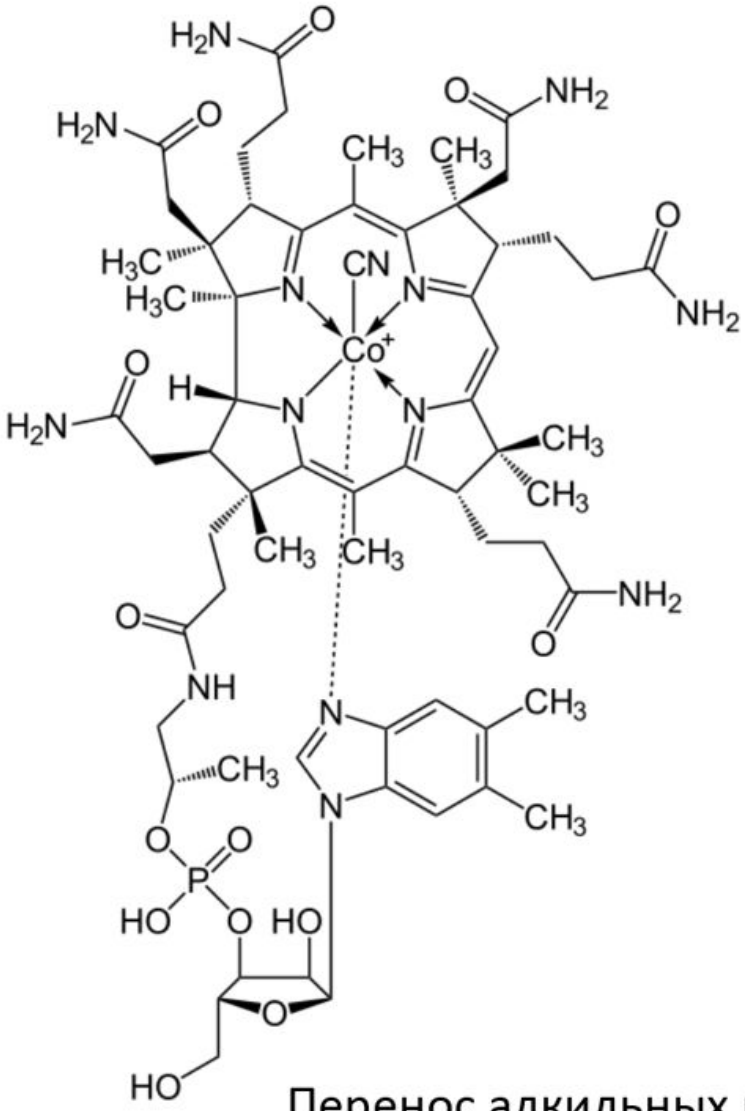




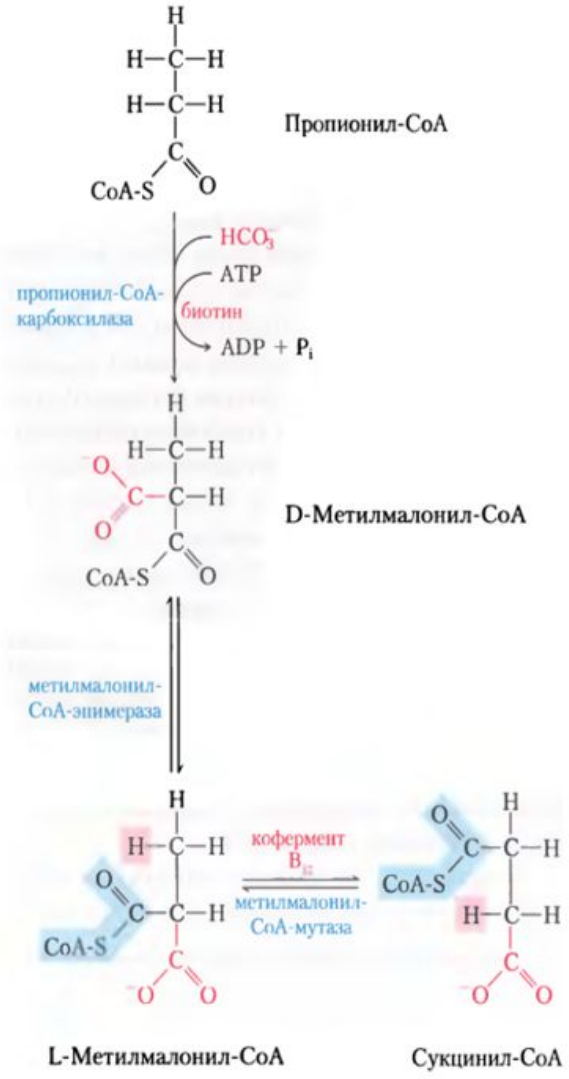
Перенос одноуглеродных групп

Пример: глицин-синтаза

Цианокобаламин (Витамин B12)



Перенос алкильных групп



Метилмалонил-КоА-мутаза