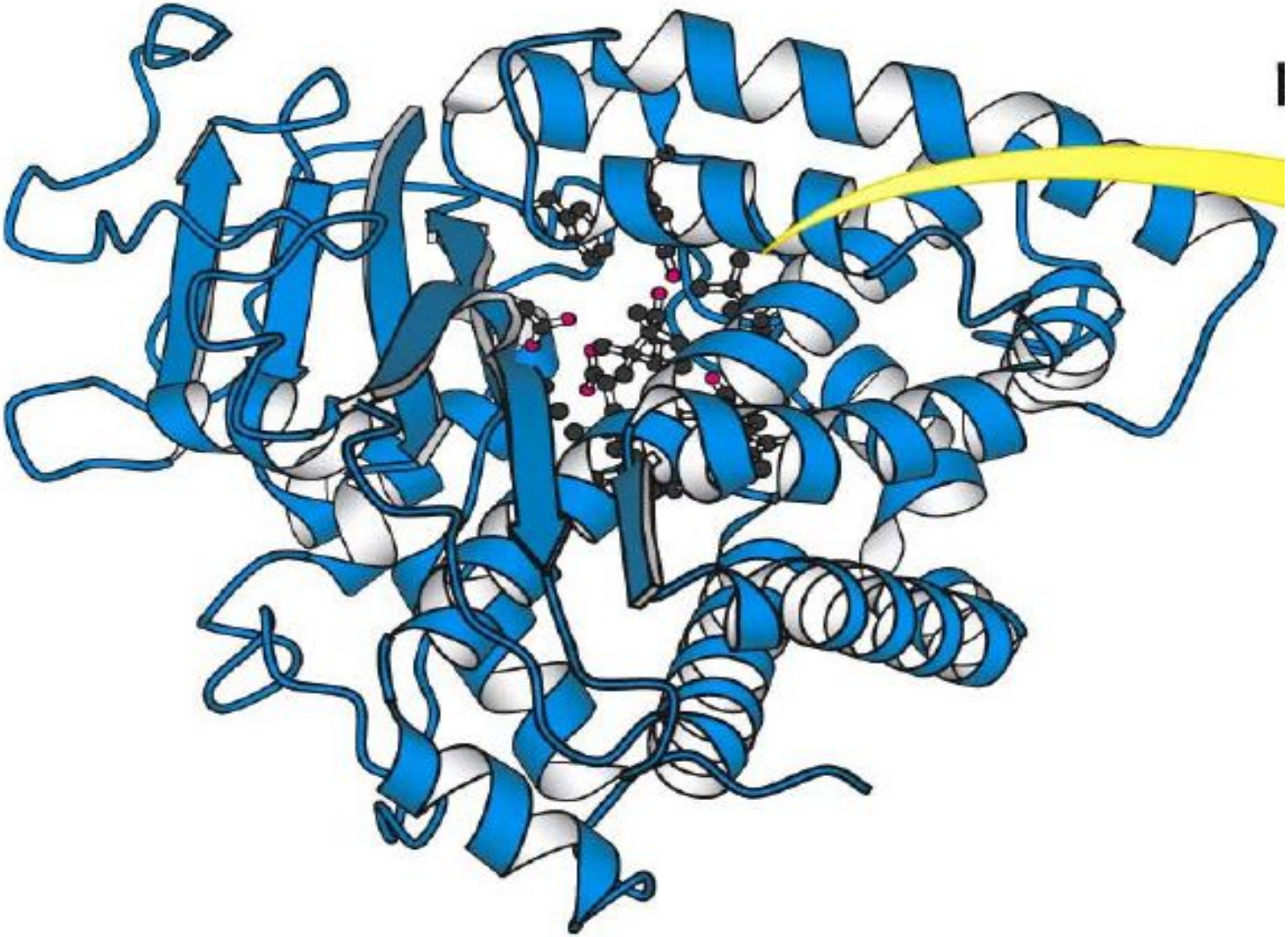
Кинетика ферментативных реакций



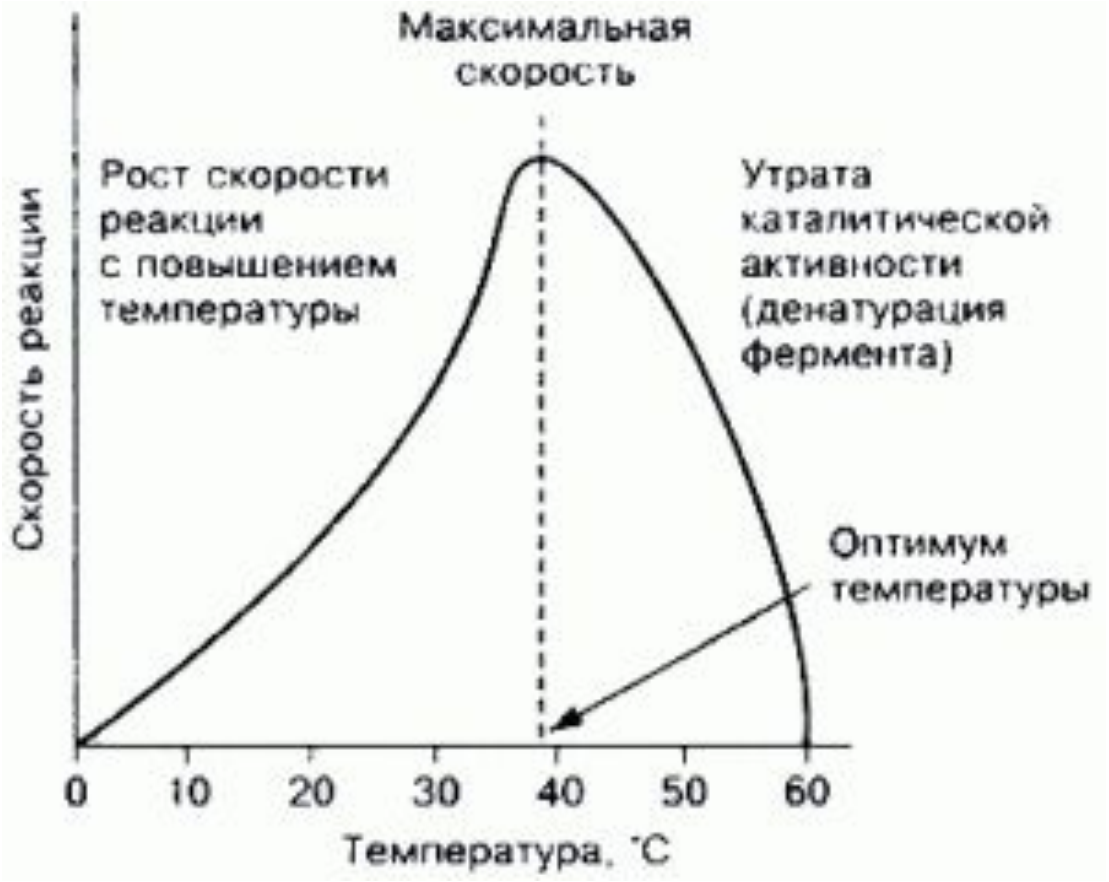
Клеточная организация ферментативной активности

Ферменты располагаются в субклеточных структурах (органеллах) соответственно их функциям. Например:
а) в ядре содержатся ферменты преобразования нуклеиновых кислот;
б) во внутренней мембране митохондрий – ферменты дыхательной цепи;
в) в лизосомах – гидролазы; г) в цитоплазме – ферменты гликолиза, синтеза жирных кислот; д) в матриксе митохондрий – ферменты ЦТК, окислительного декарбоксилирования α-кетокислот, β–окисления жирных кислот; е) плазматическая мембрана содержит ферменты транслоказы, которые переносят через мембрану ионы Na^+, K^+, глюкозу, аминокислоты и т.д.

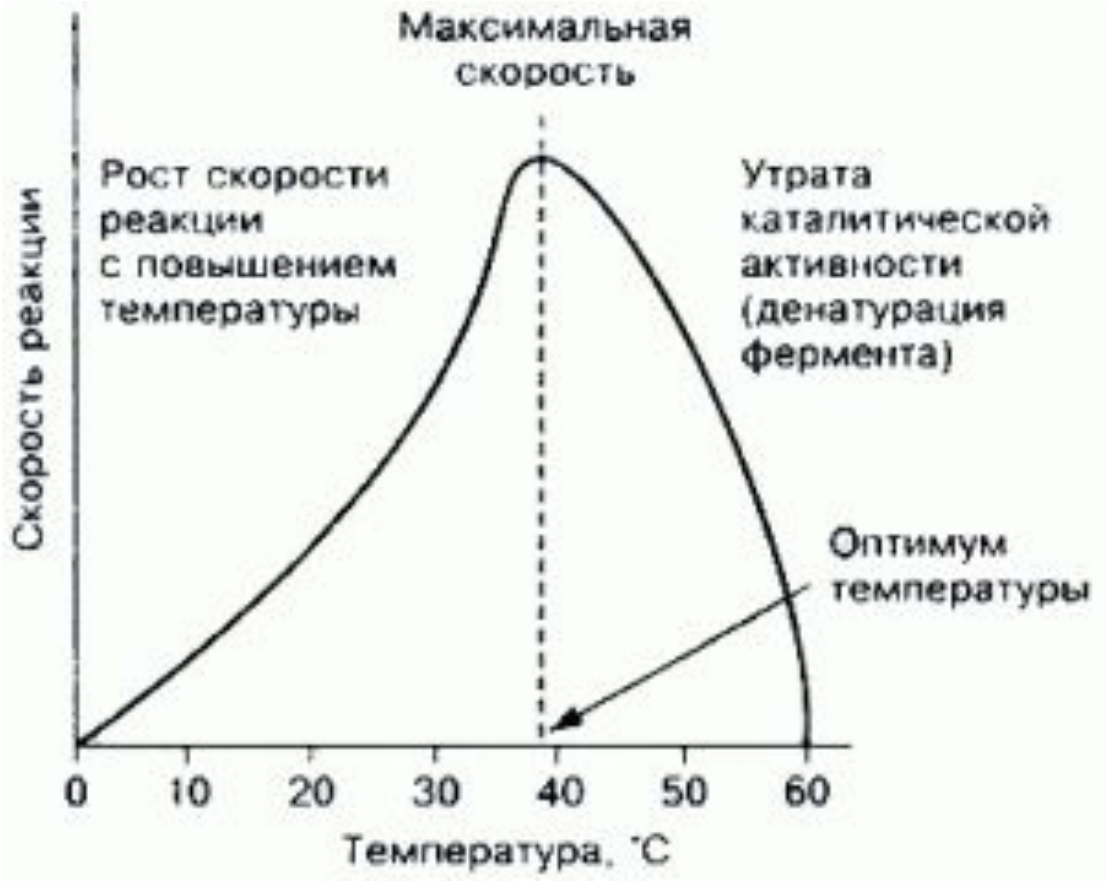
Скорость ферментативных реакций, как и всяких других реакций, зависит от температуры: при повышении температуры на каждые 10 °С скорость увеличивается примерно в 2-4 раза (правило Вант-Гоффа).

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

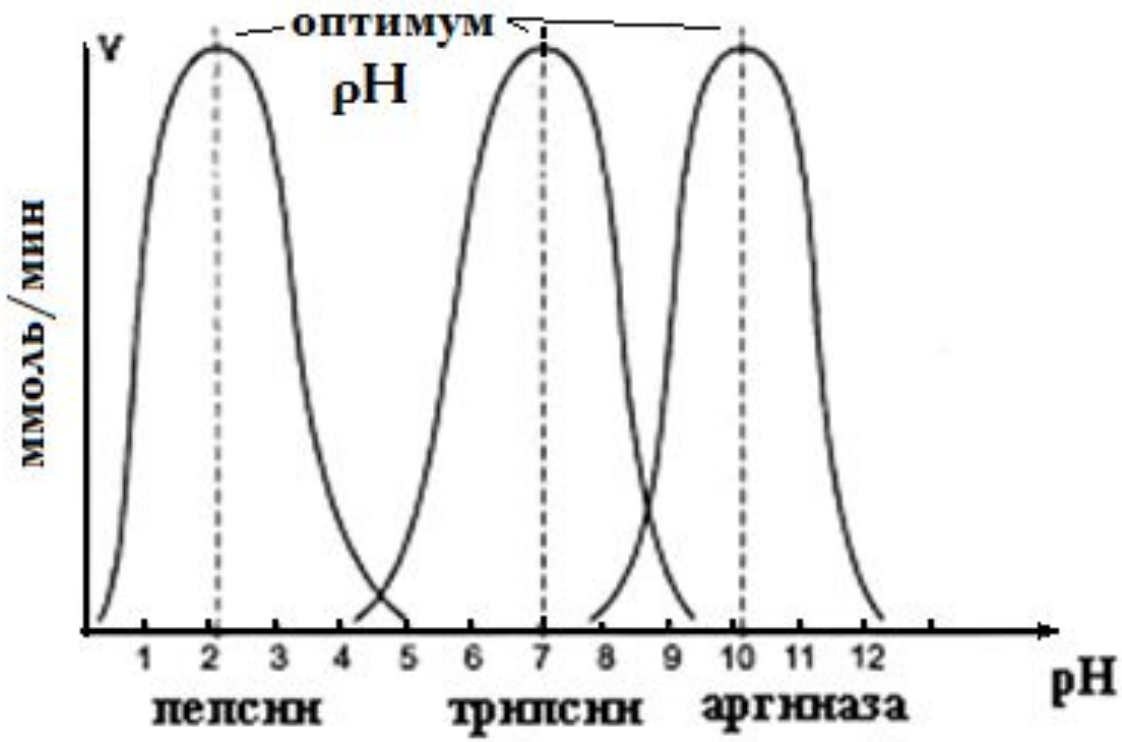
При высоких температурах, более 55–60 ^{o}C активность фермента резко снижается из-за его тепловой денатурации, и, как следствие этого, наблюдается резкое снижение скорости ферментативной реакции.



При высоких температурах, более 55–60 ^{o}C активность фермента резко снижается из-за его тепловой денатурации, и, как следствие этого, наблюдается резкое снижение скорости ферментативной реакции.



Скорость ферментативной реакции имеет свой температурный оптимум, превышение которого приводит к понижению активности ферментов из-за тепловой денатурации их молекул.



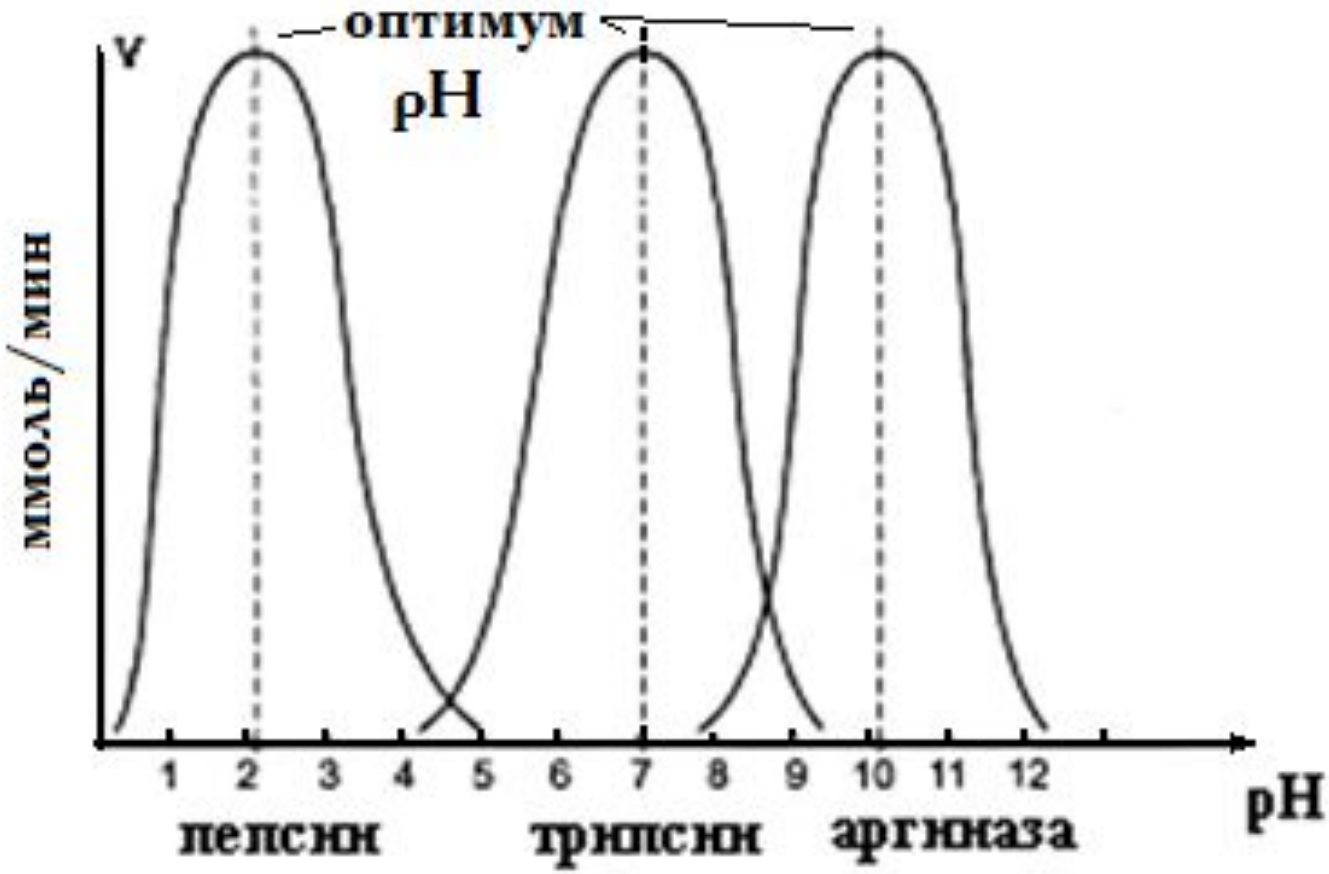
Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

Характер зависимости ферментативной реакции от pH определяется тем, что этот показатель оказывает влияние на:

a) ионизацию аминокислотных остатков, участвующих в катализе,

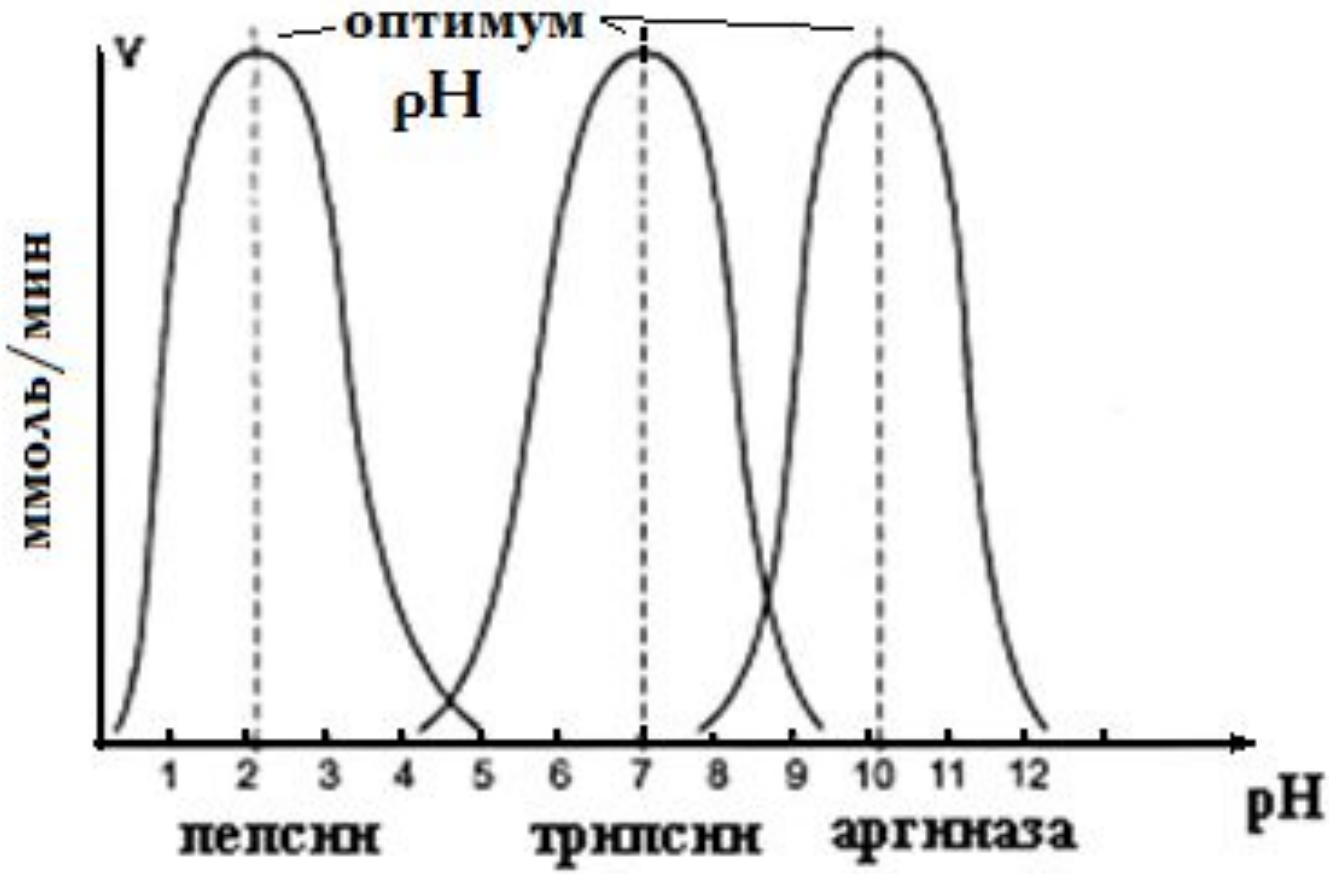
b) ионизацию субстрата,

c) конформацию фермента, его активного центра и субстрата.



Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

Каждый фермент имеет свой pH–оптимум - значение pH, при котором его активность максимальна.



Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

Большинство ферментов наиболее активны при pH=6-8. Исключения - пепсин ($pH_{опт}$=1,5-2), аргиназа ($pH_{опт}$=10-11).

Простейшая кинетическая схема взаимодействия фермента (E) и субстрата (S).

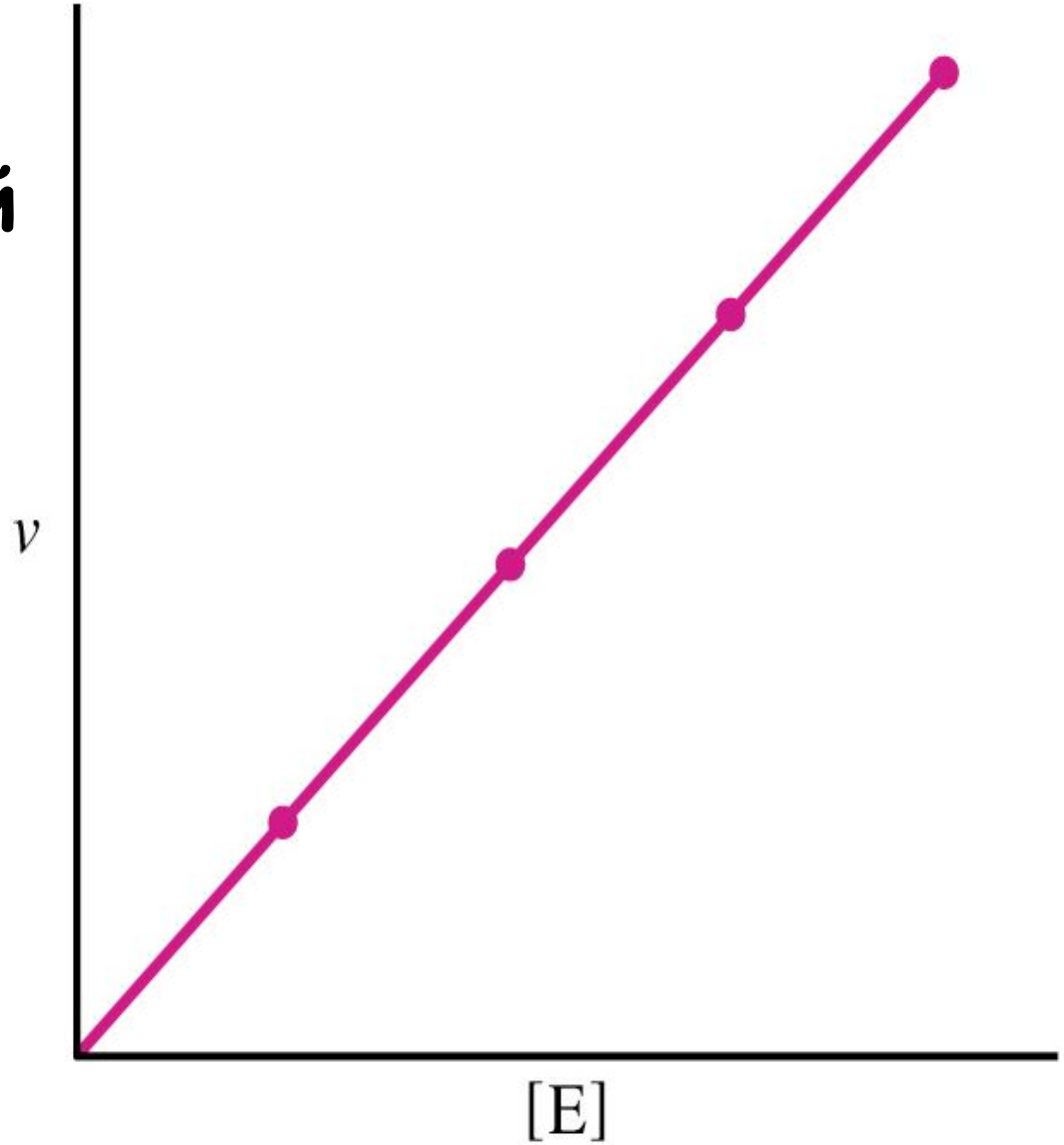
Во время реакции молекула фермента, E, и молекула субстрата, S, формируют **промежуточный фермент-субстратный (ES) комплекс**

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

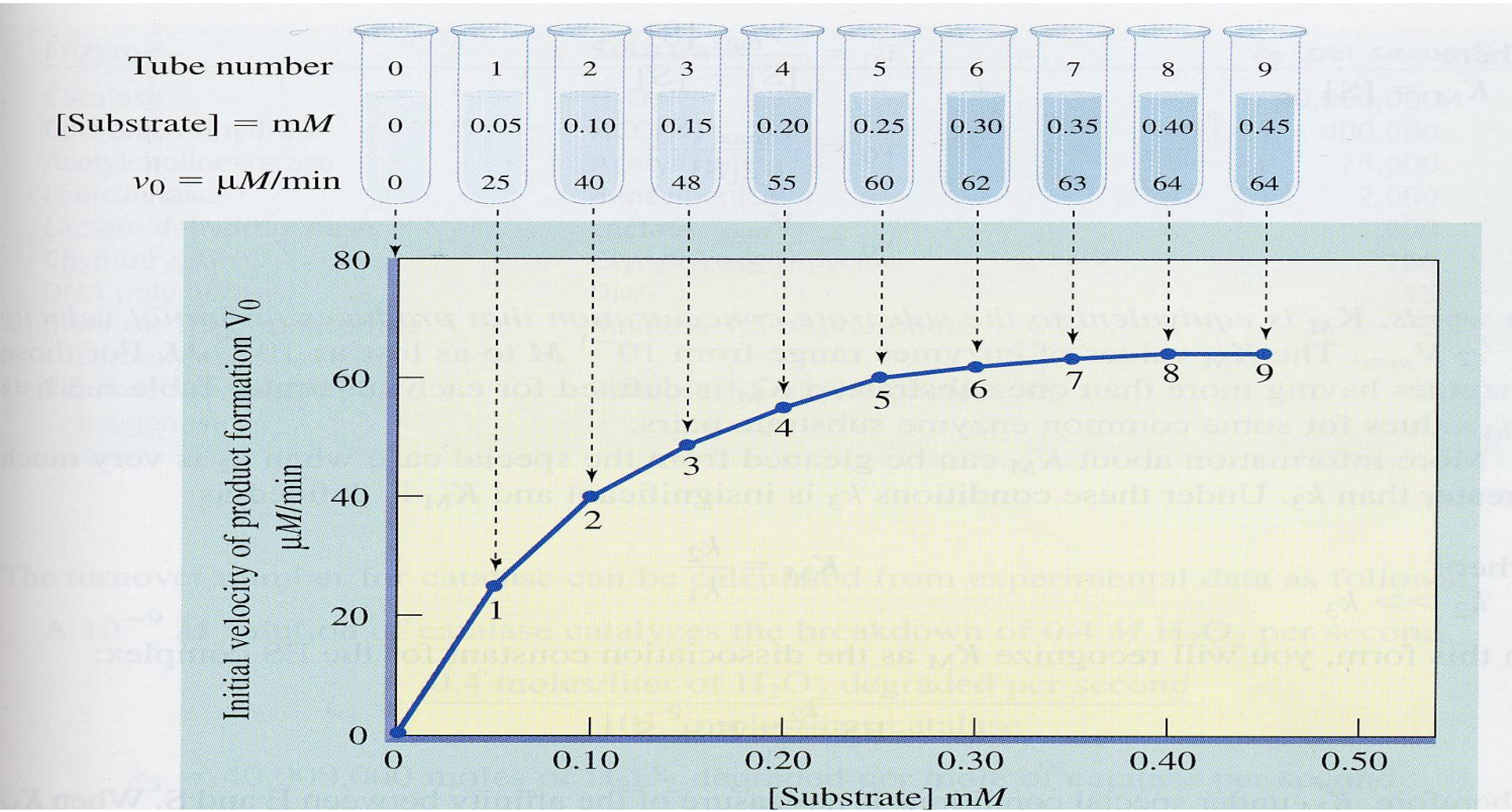
k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} – константы скорости – указывают на скорость или эффективность реакции

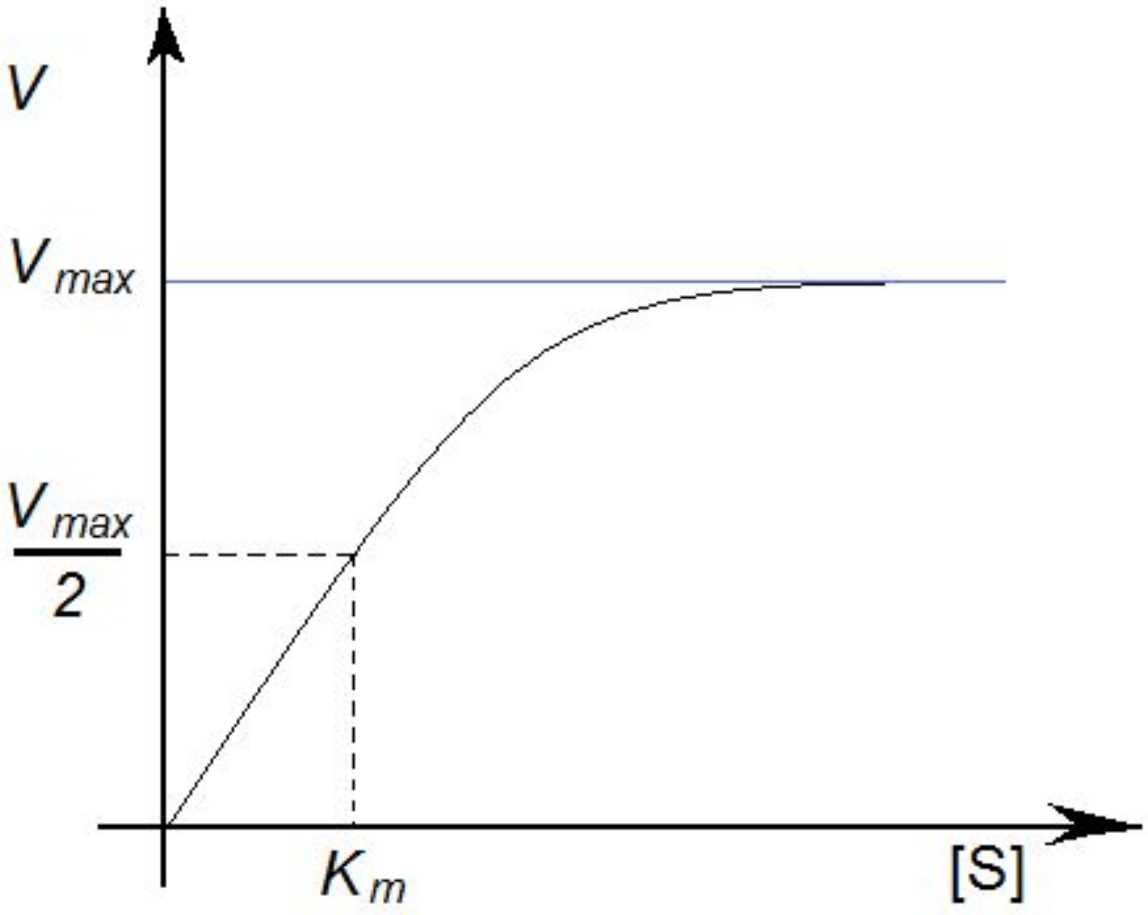
Впияние концентрации фермента на скорость реакции

При достаточной концентрации субстрата, чем выше концентрация фермента, тем выше скорость реакции



Влияние концентрации субстрата на скорость реакции





V – скорость реакции;

V_{max} – максимальная скорость равная $K_{cat}E_0$;

[S] — концентрация субстрата.

K_m – константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет 1/2 от V_m.

Кинетика ферментативных реакций

Скорость катализа

- При фиксированной концентрации фермента начальная скорость реакции линейно пропорциональна концентрации субстрата, если последняя маленькая, но не зависит от концентрации субстрата, если она большая.

- Скорость реакции возростает линейно при увеличении концентрации субстрата и потом останавливается при насыщении фермента

Уравнение Михаэлиса — Ментен

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

V – скорость реакции;

V_{max} – максимальная скорость равная $K_{cat}E_0$;

[S] — концентрация субстрата.

K_m – константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет 1/2 от V_m.

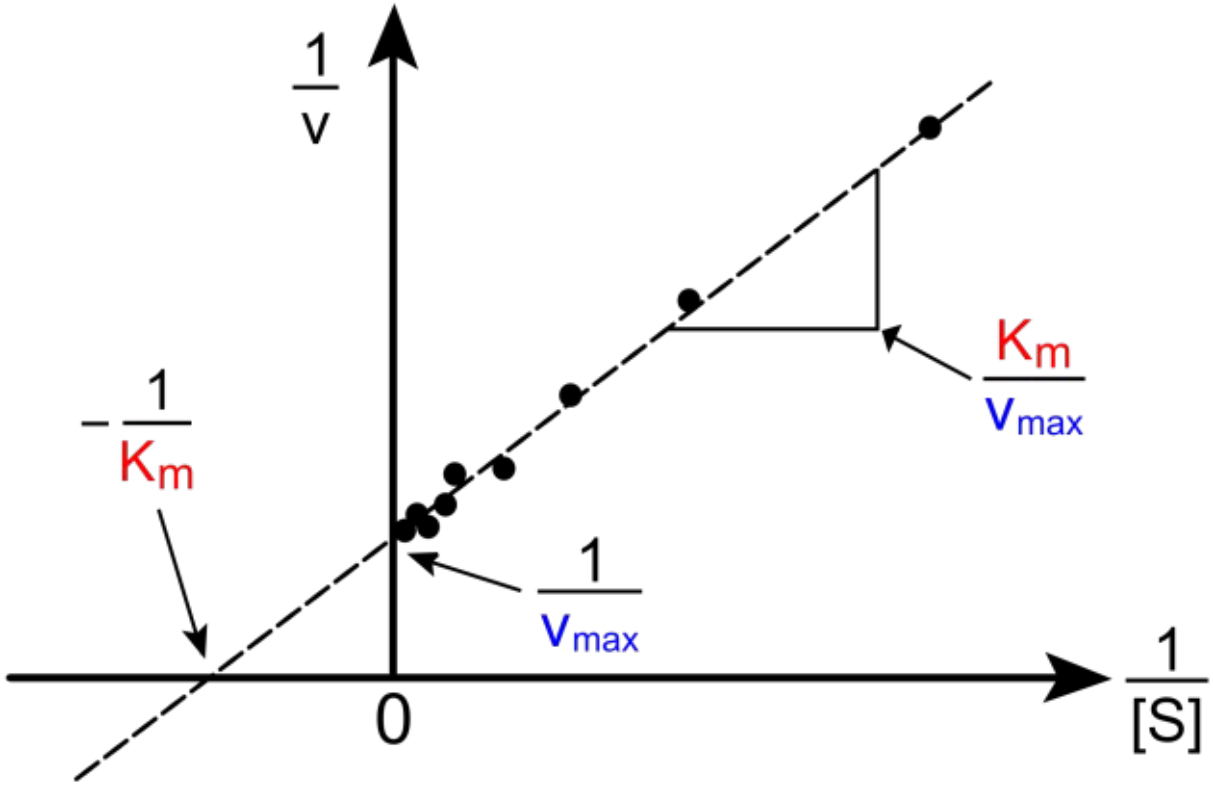
Скорость катализа

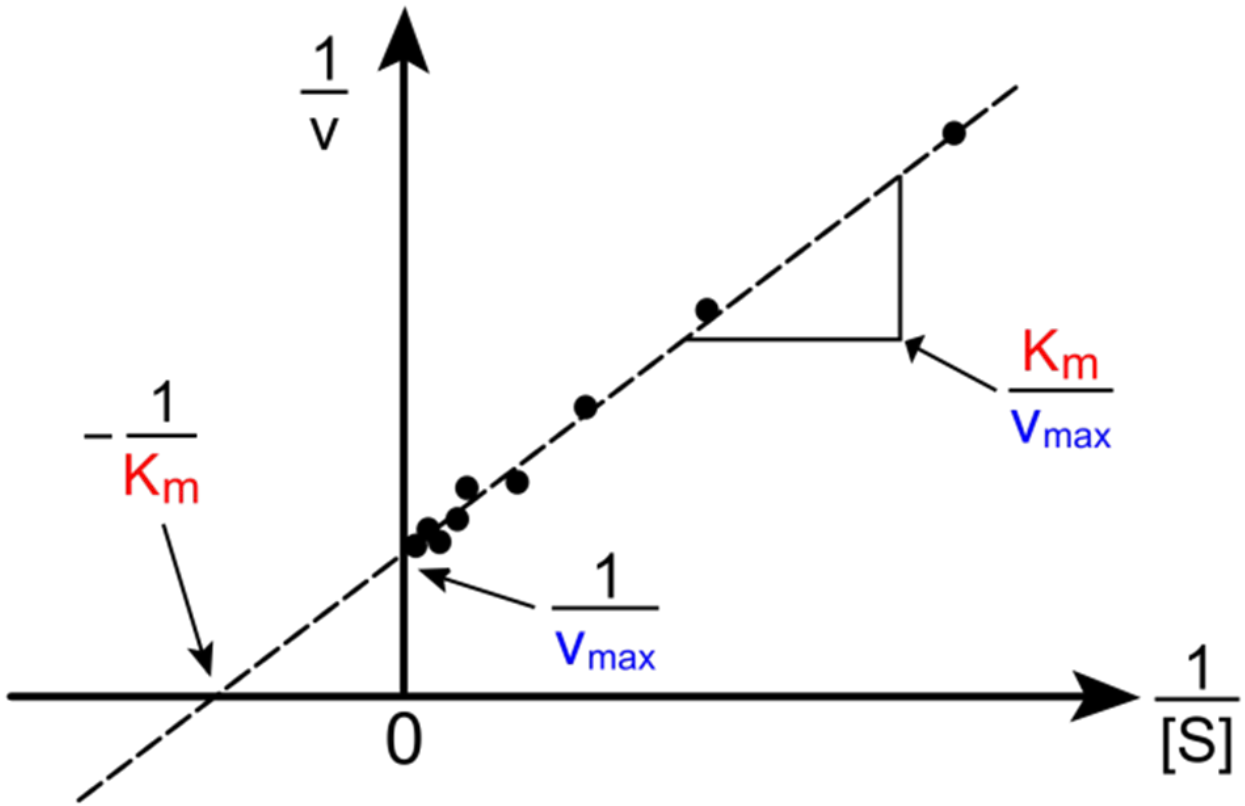
Уравнение Михаэлиса—Ментен — основное уравнение ферментативной кинетики, описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата.

Уравнение названо в честь физико-химиков Леонора Михаэлиса и Мод Леоноры Ментен.

Уравнение Лайнуивера-Бёрке

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





Когда [S] много больше чем K_m скорость реакции не зависит от [S] что соответствует *нулевому* порядку реакции.

Когда [S] = K_m тогда $v_0 = 1/2V_m$

Когда [S] меньше K_m скорость реакции пропорциональна [S], что соответствует *первому* порядку реакции.

Ингибирование ферментов

Разные химические агенты (метаболиты, аналоги субстратов, токсины, лекарственные средства, металлы) могут ингибировать ферменты, понижая их активность

Ингибитор связывается с ферментом и препятствует формированию комплекса ES или его расщепление в E + P

Обратимые и необратимые ингибиторы

<u>Обратимые,</u> с образованием EI комплекса, который быстро диссоциирует.

Фермент угнетен только когда связан с ингибитором

EI комплекс удерживается с помощью слабых нековалентных связей.

Три типа обратимого ингибирования:

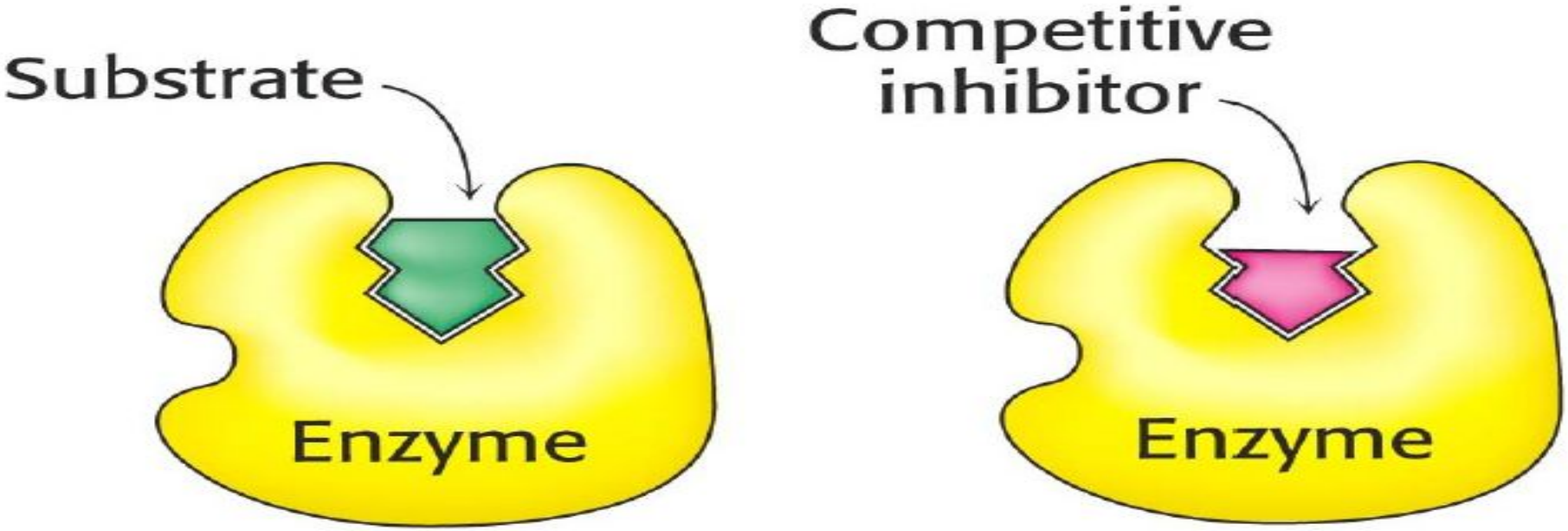
Конкурентное, Неконкурентное, Безконкурентное

Обратимое ингибирование

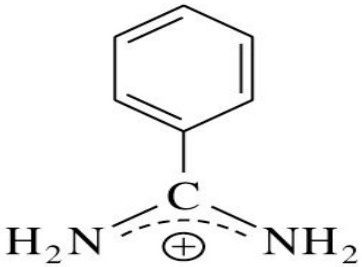
Конкурентное

- Ингибитор имеет схожую с субстратом структуру, поэтому связывается с тем же активным центром
- Фермент не может отличить ингибитор и субстрат
- Присоединение ингибитора к активному центру предотвращает связывание субстрата
- Конкурентный ингибитор снижает скорость катализа, уменьшая количество молекул фермента, доступных субстрату.
- Ингибитор может быть вытеснен из активного центра путем увеличения концентрации субстрата

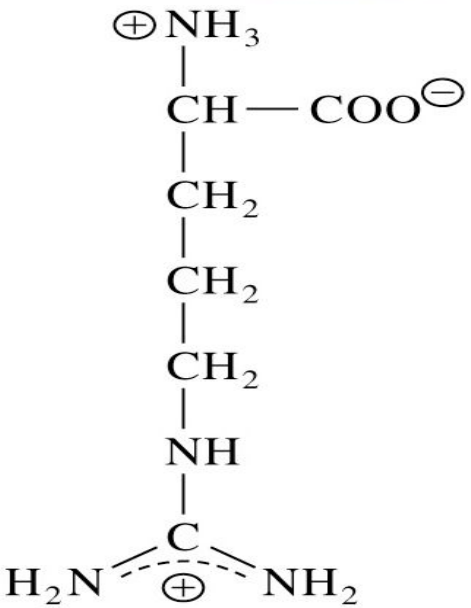
Конкурентное ингибирование



Бензамидин конкурирует с аргинином за связывание с трипсином



Benzamidine



Arginine

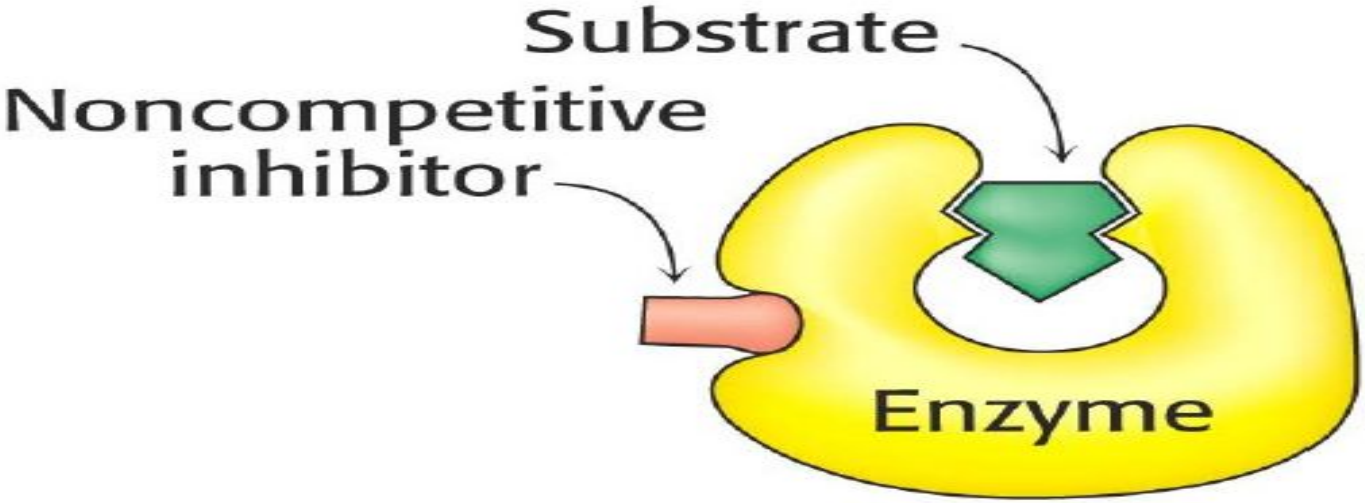
Неконкурентное торможение

• Ингибитор присоединяется не к активному центру, а к другому участку фермента

• Ингибитор и субстрат могут связываться с ферментом в одно и то же время

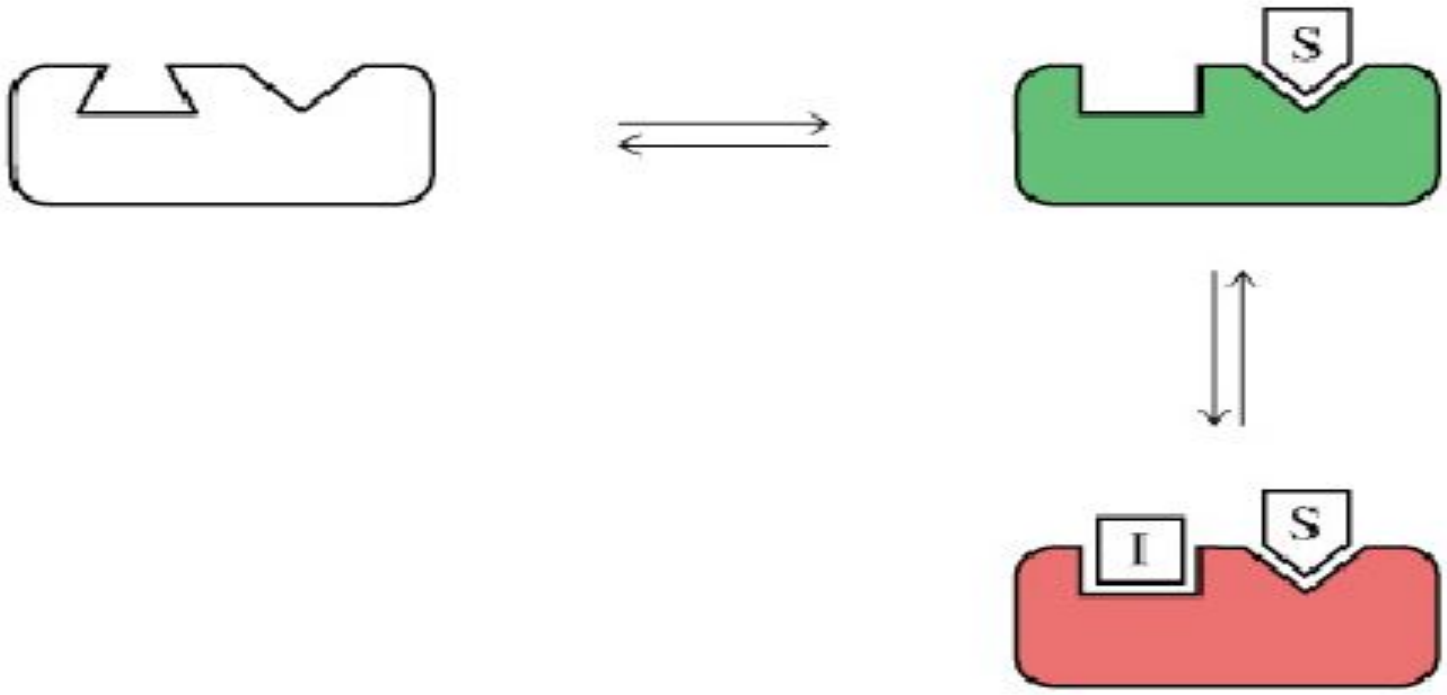
•Ингибитор может связываться как с ферментом (EИ) , так и с фермент-субстратным комплексом (ESИ)

•Ингибитор не может быть вытеснен путем увеличения концентрации субстрата



Безконкурентное торможение

Ингибитор присоединяется к комплексу фермент-субстрат (ES), но не к свободному ферменту E.



Необратимое ингибирование

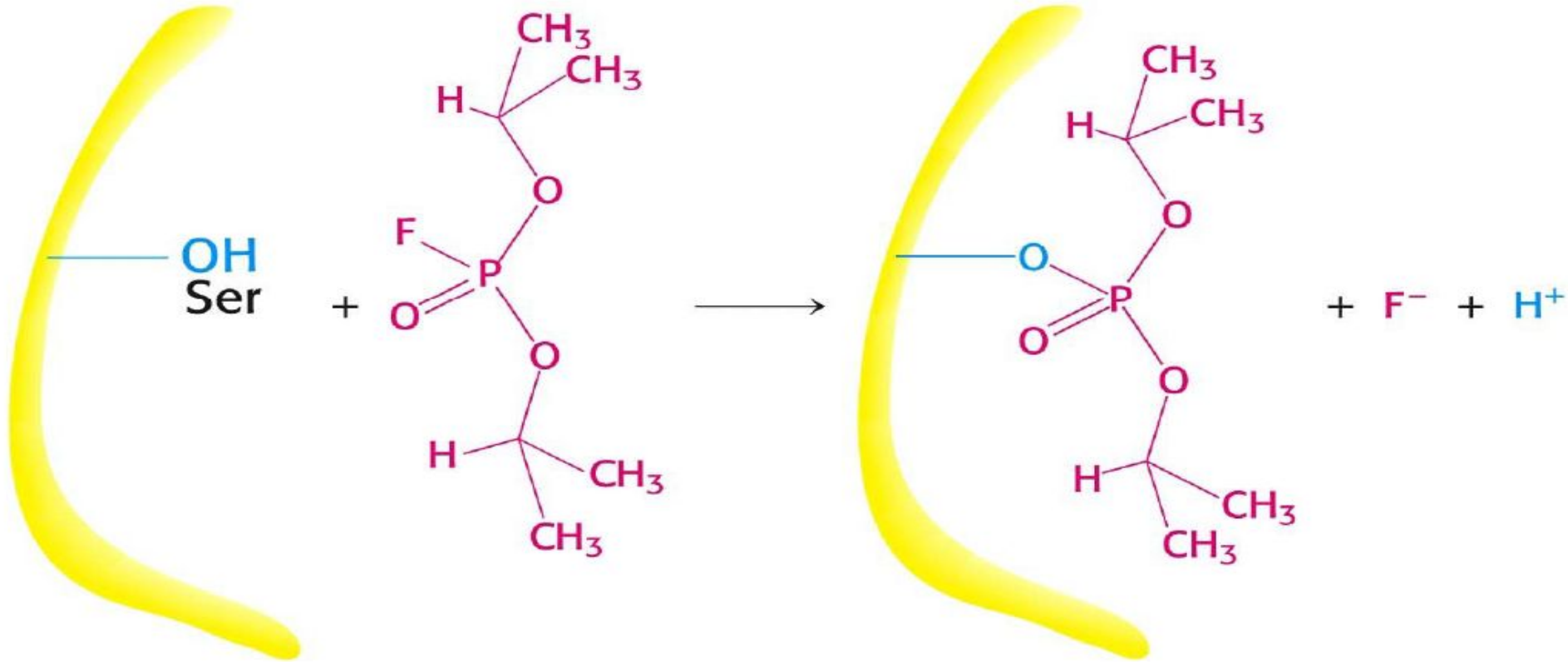
Очень медленная дисоциация комплекса EI

Связываются ковалентными связями с ферментом.

Необратимые ингибиторы

- ***ингибиторы специфические к группам аминокислотных остатков***
- ***аналоги субстратов***
- ***суицидные ингибиторы***

Ингибиторы специфические к группам аминокислотных остатков - взаимодействуют со специфическими R группами аминокислот



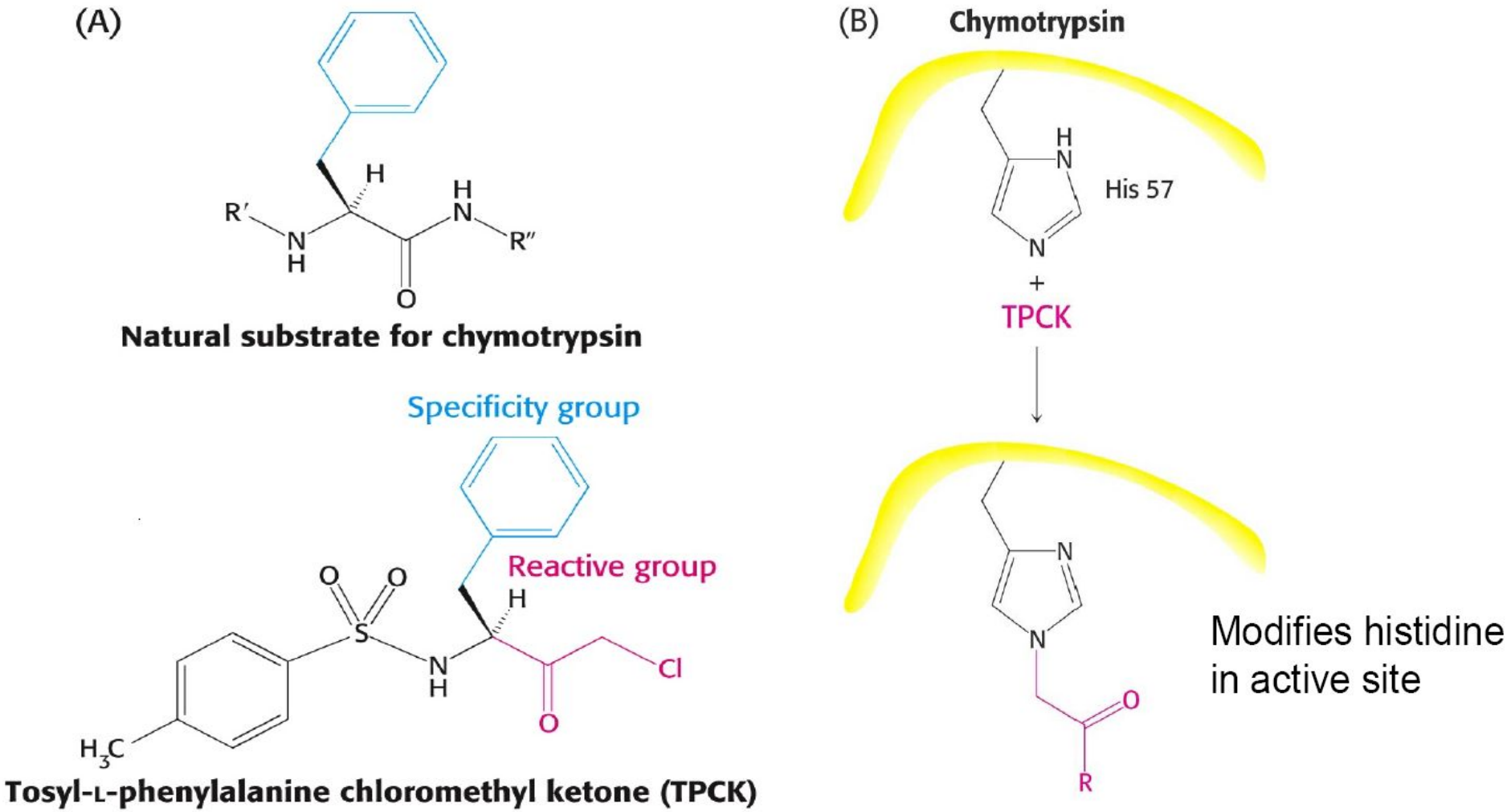
Acetylcholin-esterase

DIPF
diisopropylphosphofluoridate

Inactivated enzyme

Аналоги субстратов

– структурно похожи на субстрат фермента
- ковалентно модифицируют активный центр



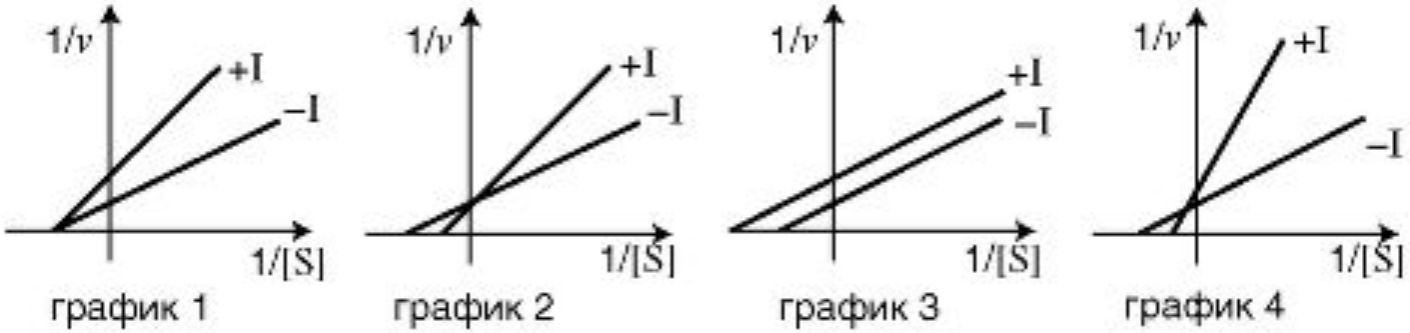
Суицидные ингибитори

- Ингибитор связывается как субстрат и сначала инициирует нормальный каталитический механизм

- Потом образуются химически реактивные соединения, которые инактивируют фермент-ковалентную модификацию

"Суицидный" потому что фермент сам принимае участие в своем инактивировании

Механизм ингибирования можно определить из графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата



А. Конкурентное
Б. Неконкурентное
В. Смешанное
Г. Бесконкурентное

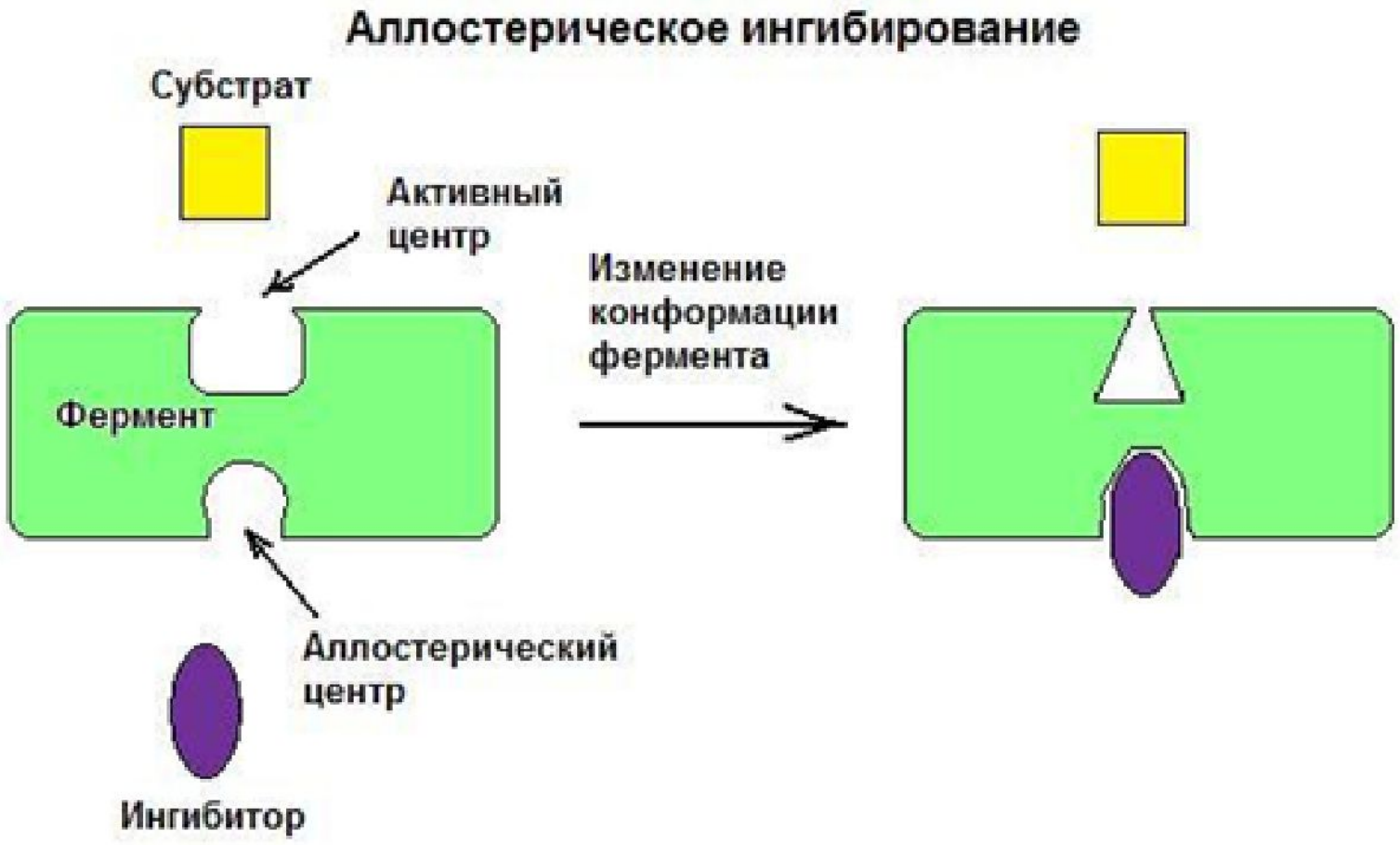
Аллостерические ферменты

Термин «аллостерический» происходит от греческих слов allo – другой, stereo – твердый (относящийся к трехмерной структуре, пространству).

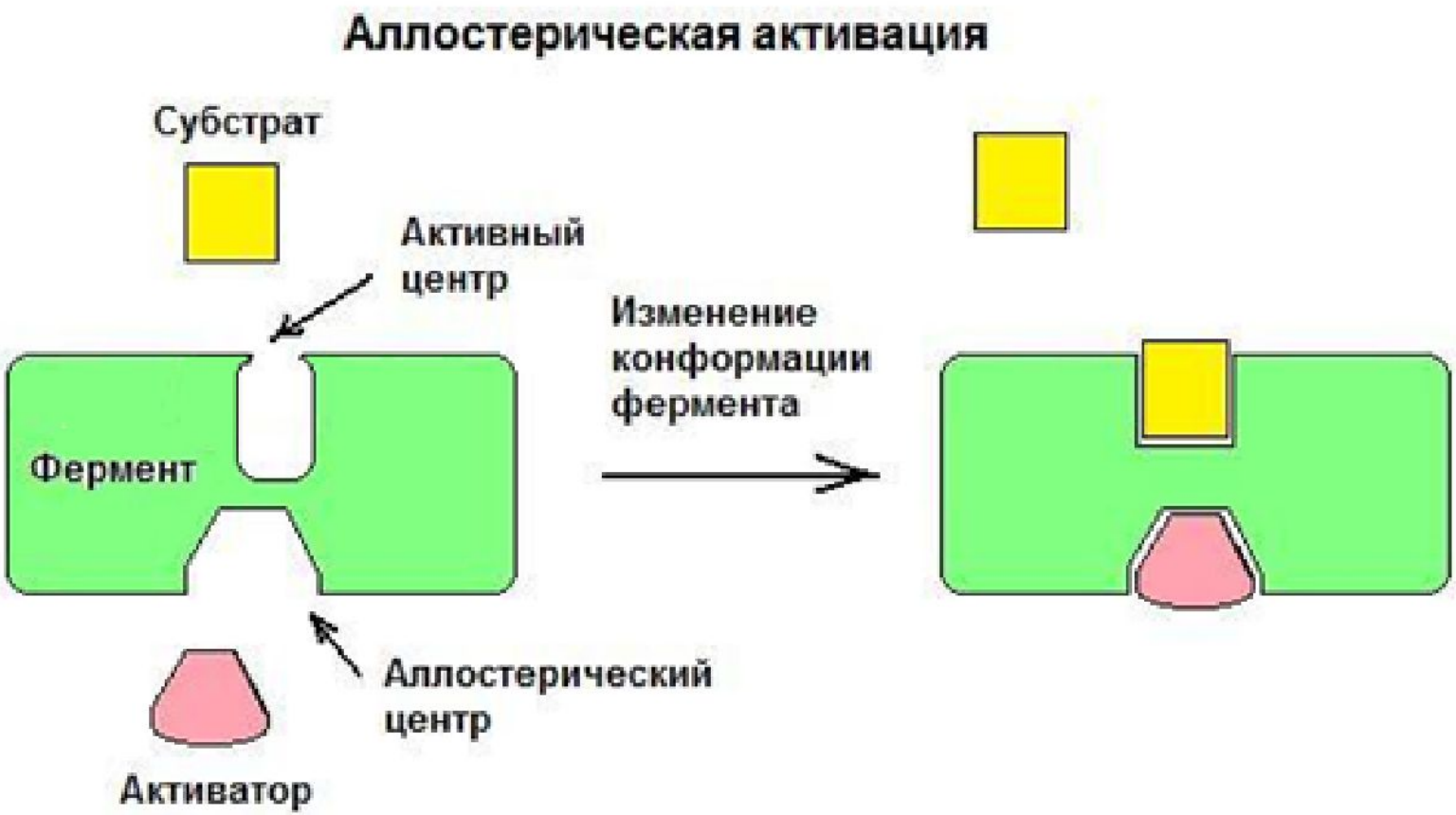
Аллостерические ферменты имеют специальный регуляторный участок, **аллостерический центр,** который пространственно отдален от активного центра.

С аллостерическим центром связываются вещества, способные изменять активность ферментов, эти вещества называют **аллостерическими эффекторами**.

Аллостерические ферменты



Аллостерические ферменты



Регуляция Активности Ферментов

Методы регуляции активности ферментов

- Аллостерическая регуляция
- Обратимая ковалентная модификация
- Изоферменты
- Протеолитическая активация

Аллостерические ферменты

Аллостерические модуляторы

-связываются нековалентно с аллостерическим центром.

- регулируют активность фермента изменяя его конформацию.

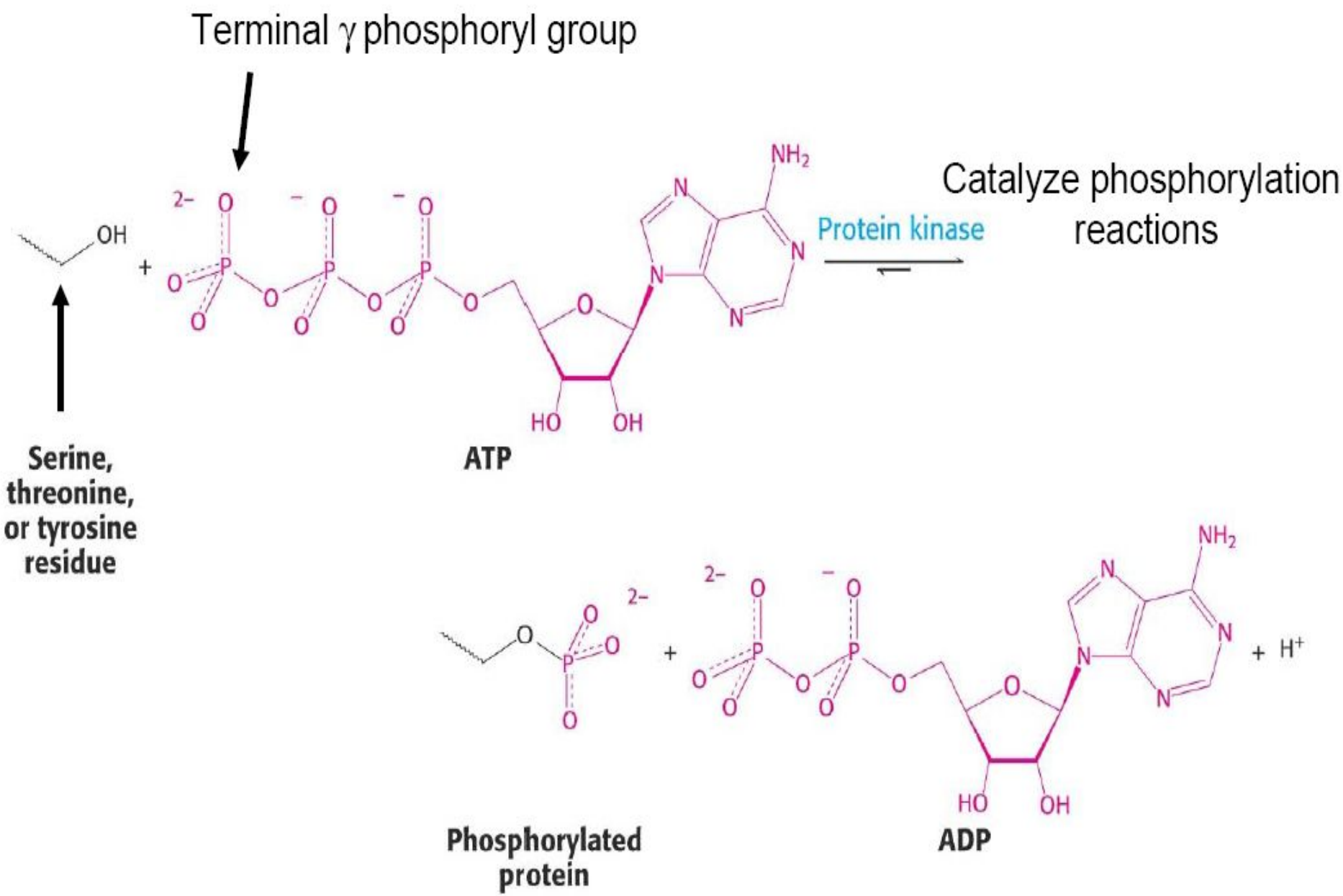
Регуляция активности ферментов путем ковалентной модификации

Ковалентное присоединение молекулы к аминокислотному остатку фермента может модифицировать активность последнего

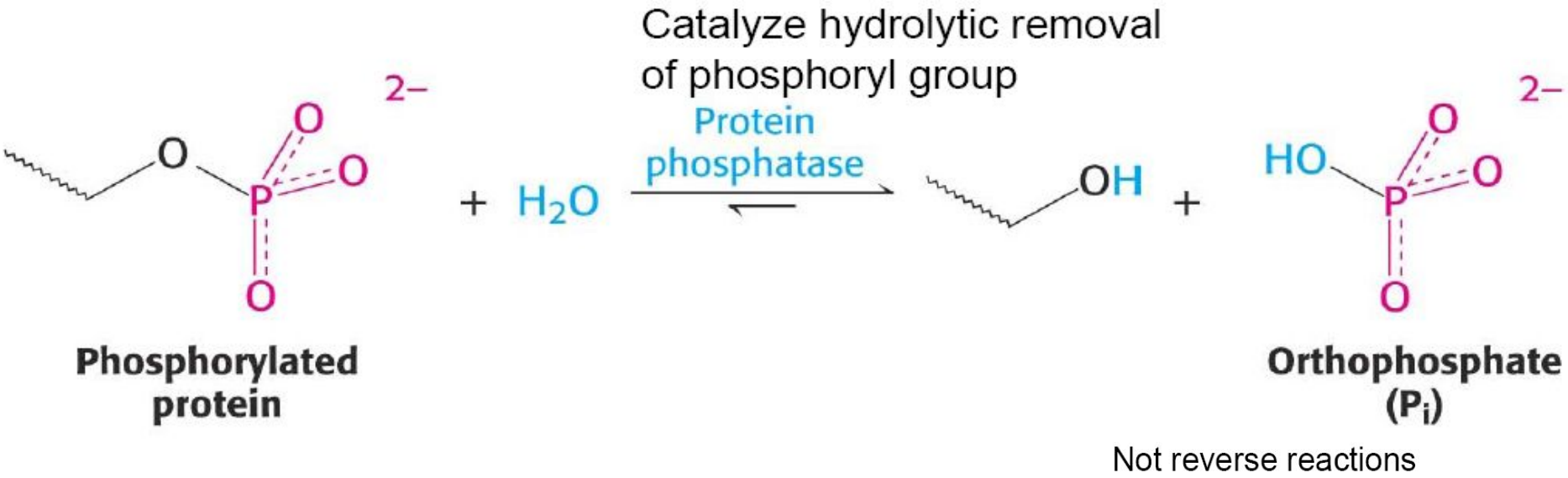
Типы ковалентной модификации:

- фосфорилирование;
- ацетилирование;
- карбоксилирование и др.

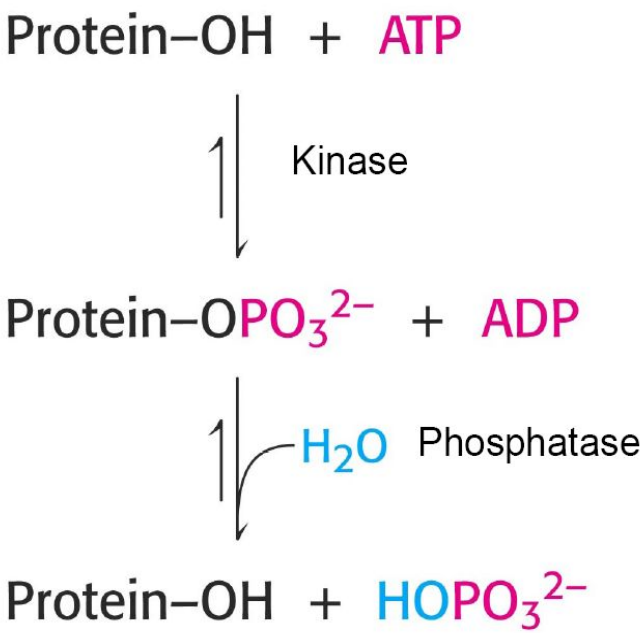
Фосфорилирование



Реакция дефосфорилирования



Как правило, фосфорилированные ферменты более активные



Ферменты, ответственные за фосфорилирование - протеинкиназы

Ферменты, ответственные за дефосфорилирование – фосфатазы

Изоферменты

множесственные формы фермента, которые отличаются аминокислотной последовательностью, но катализируют ту же реакцию.

Изоферменты могут отличаться:

- ***кинетической активностью,***
- ***регуляторными свойствами,***
- ***коэнзимом,***
- ***распространением в клетках и тканях***

Изоферменты **кодируются разными генами**

Пример: ***лактатдегидрогеназа (ЛДГ)***

$$\text{Лактат} + \text{НАД}^+ \rightleftharpoons \text{пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+$$

– tetramer (4 субединицы) – состоит из двух типов полипептидных цепей, **M** и **H**

Есть 5 изоферментов ЛДГ:

- **H_4 – в сердце**
- **HM_3**
- **H_2M_2**
- **H_3M**
- **M_4 – в печени, мышцах**

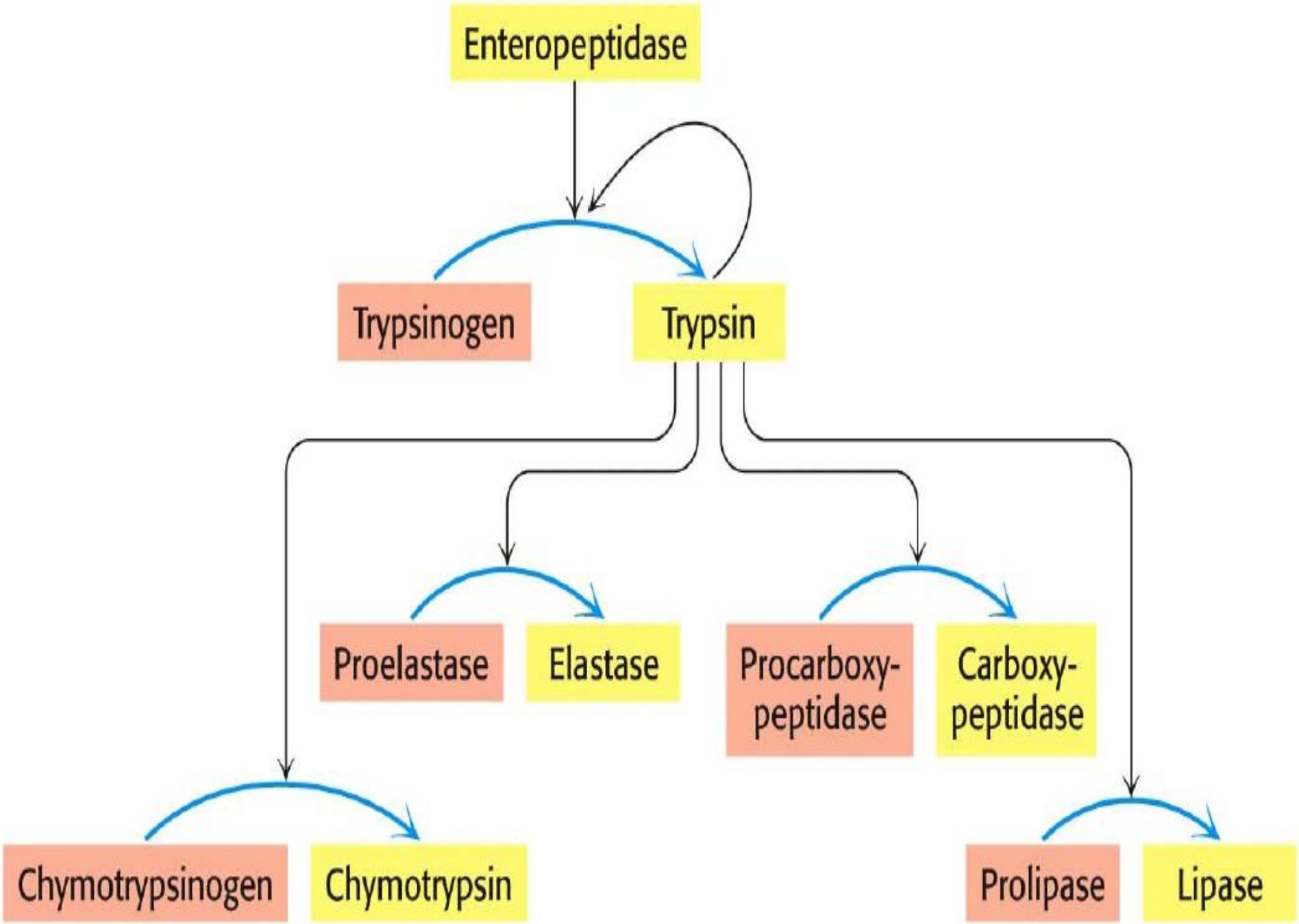
Анализ концентрации изоферментов в крови важен для диагностики различных болезней.

Протеолитическая активация

- Много ферментов синтезируются как неактивные предшественники (зимогены) и активируются протеолитическим расщеплением

Примеры специфического протеолиза

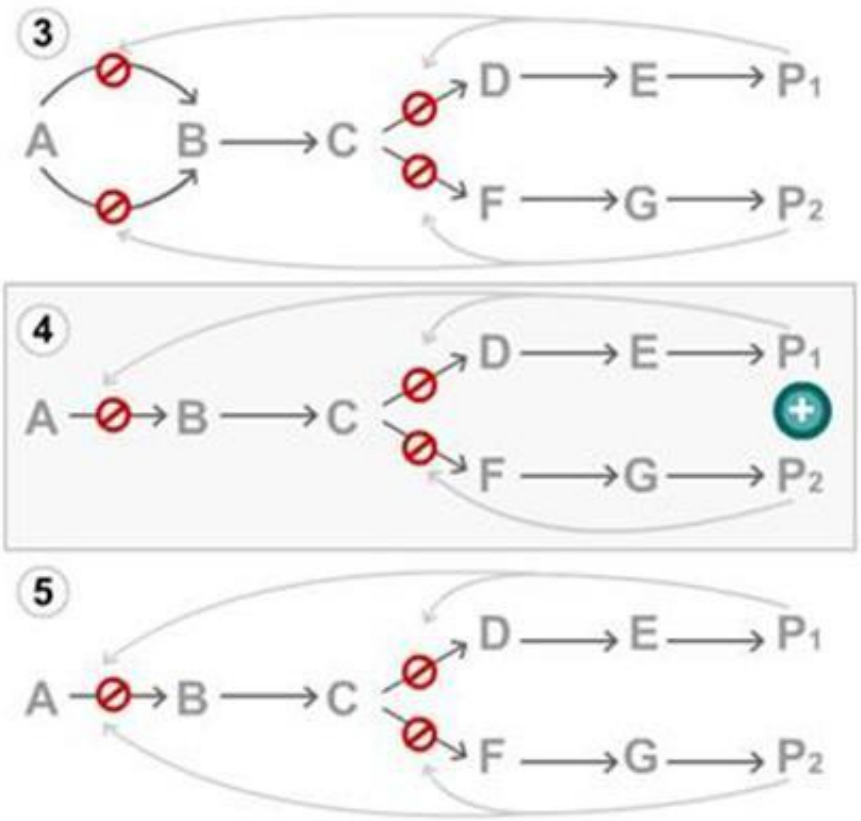
- Ферменты переваривания пищи синтезируются как зимогены (проферменты) в желудке и поджелудочной железе
- Ферменты свертывания крови обеспечивают функционирование каскада протеолитической активации
- Некоторые белковые гормоны образуются протеолизом например, проинсулин превращается в инсулин путем удаления части пептида


Enteropeptidase
Trypsinogen
Trypsin
Proelastase
Elastase
Procarboxy-peptidase
Carboxy-peptidase
Chymotrypsinogen
Chymotrypsin
Prolipase
Lipase

Полиферментные комплексы и полифункциональные ферменты

- **Полиферментные комплексы –** разные ферменты, которые катализируют последовательные реакции одного процесса и пространственно размещаются в одном месте.
- - продукт одной реакции переносится прямо на активный центр следующего фермента, при этом значительно увеличивается скорость реакции.
- **Полифункциональные ферменты** – в зависимости от условий один фермент может иметь различные активности

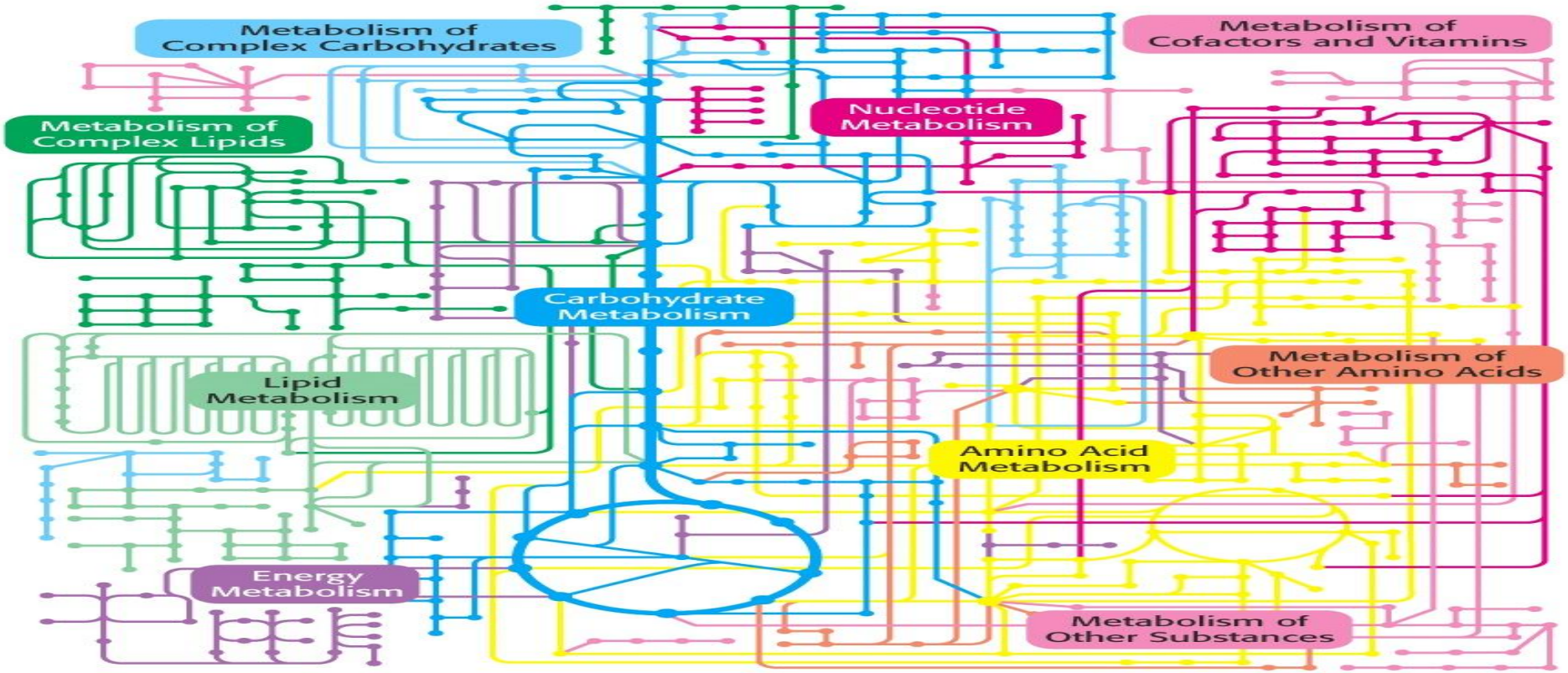
Отрицательная обратная связь и метаболический путь



Образование конечного продукта (P) в достаточном количестве будет приводить к его связыванию в аллостерическом центре ингибирования соответствующего фермента и выключению метаболического пути между соответствующими стадиями.

Введение в обмен веществ. Специфические и общие пути превращения углеводов, липидов и белков (окислительное декарбоксилирование ПВК, цикл трикарбоновых кислот).

- **Метаболизм** – химические реакции, которые проходят в организме
- **Метаболиты** – маленькие промежуточные молекулы, которые образуются в процессе деградации и синтеза полимеров



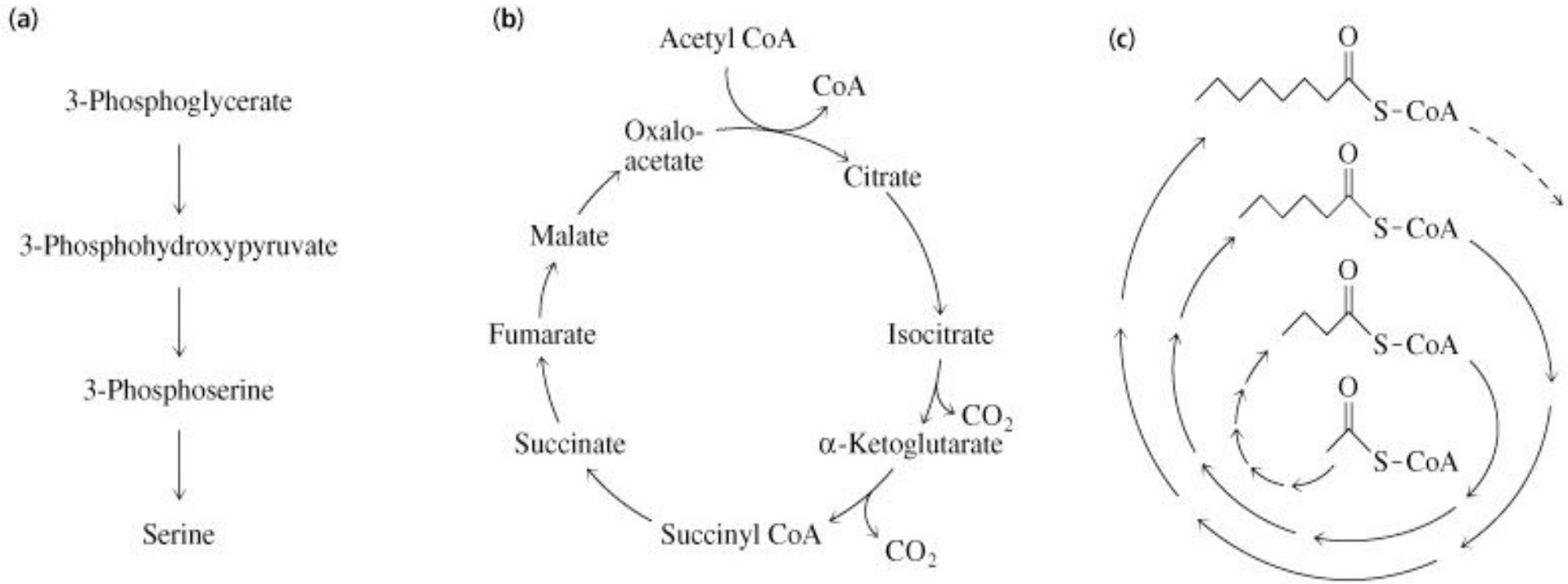
Последовательность реакций, которые имеют цель (например, расщепление глюкозы, синтез жирных кислот) **называется метаболичным путем**

Метаболические пути могут быть:

(a) Линейными

(b) Циклическими

(c) Спиральными (синтез жирных кислот)



Метаболизм разделяется на – **катаболизм и анаболизм**

Катаболические реакции – деградация больших молекул с образованиемм меньших и энергии

Анаболические реакции – синтез макромолекул для жизнедеятельности клеток, роста и репродукции

Катаболизм характеризируется реакциями окисления и освобождения энергии, которая трансформируется в АТФ

Анаболизм характеризируется реакциями восстановления и утилизацией энергии, аккумулированной в АТФ

Регуляция метаболических путей

Уровни регуляции метаболизма

1. Нервная система
2. Эндокринная система
3. Взаимодействие между органами
4. Клеточный (мембранный) уровень
5. Молекулярный уровень

Стадии метаболизма

Катаболизм

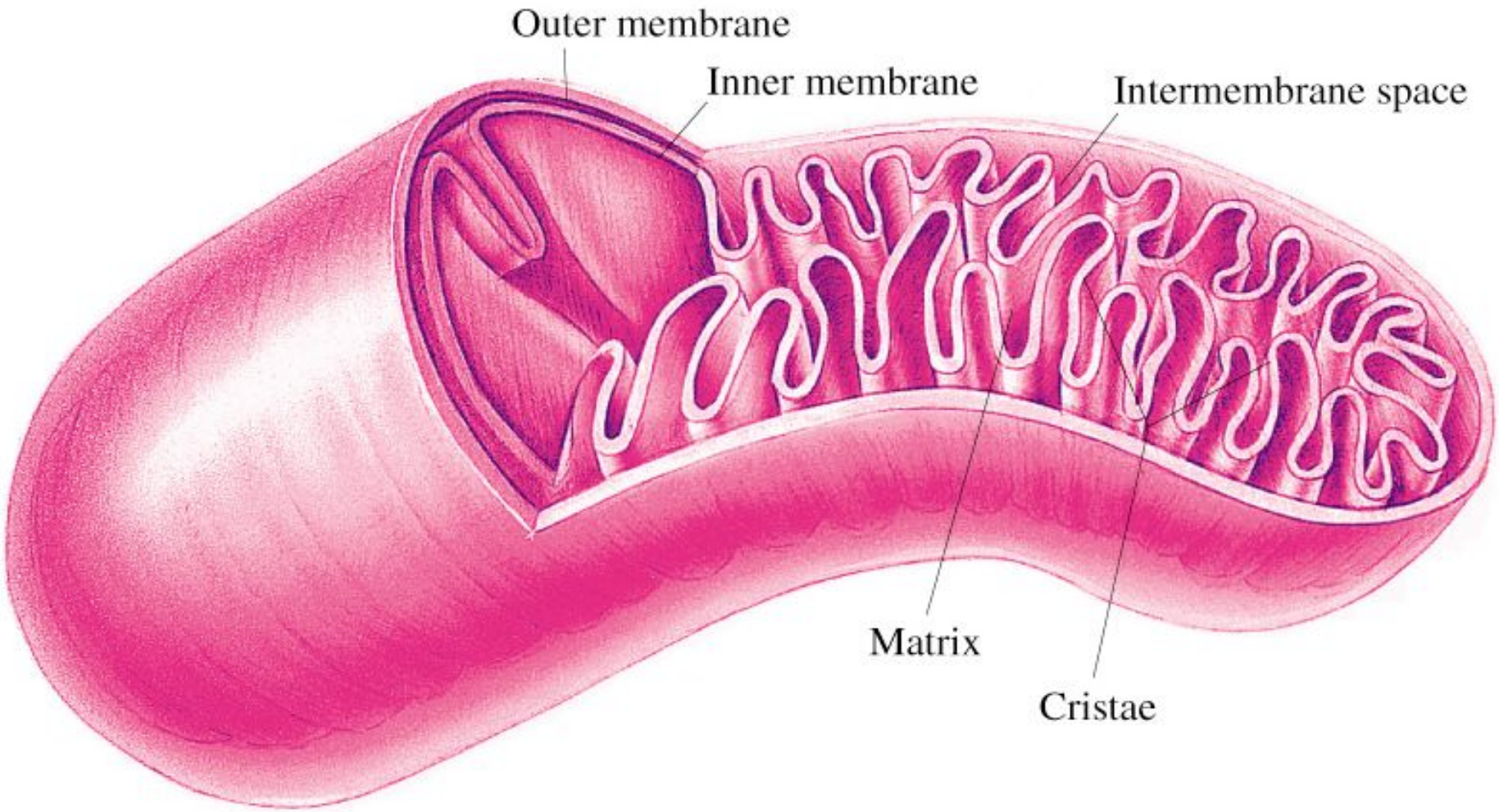
Стадия I (специфическая). Деградация макромолекул (белков, углеводов, липидов) к мономерам

Стадия II (специфическая). Аминокислоты, жирные кислоты и глюкоза окисляются к общему метаболиту – ацетил коэнзиму А

Стадия III (неспецифическая).

Ацетил CoA окисляется в цикле лимонной кислоты в CO_2 и воду.

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПИРУВАТА



Глюкоза

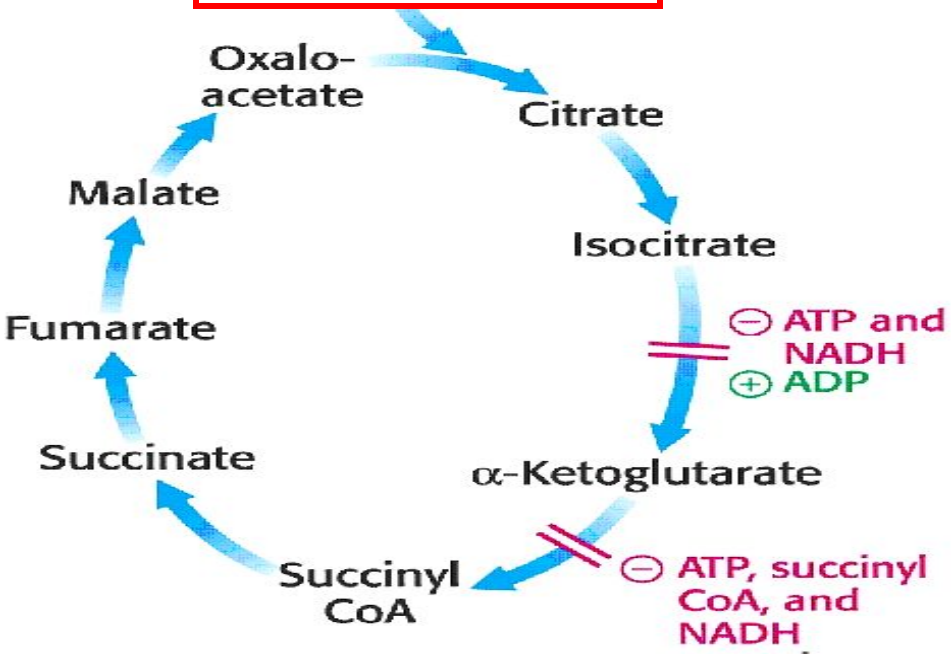
Гликолиз

Амино-кислоты

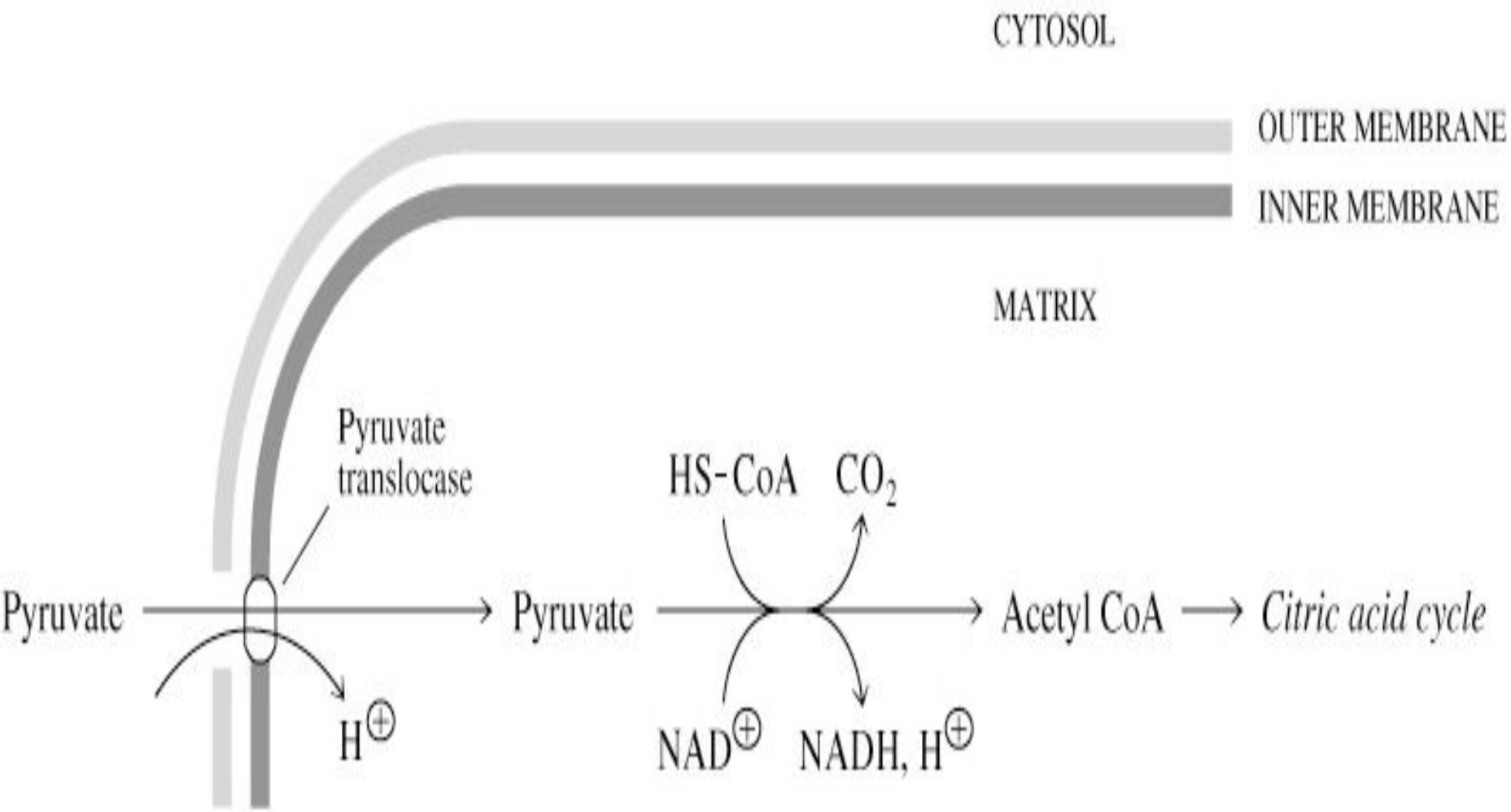
Пируват

Глицерол

Ацетил CoA



Транспорт пирувата в митохондрию

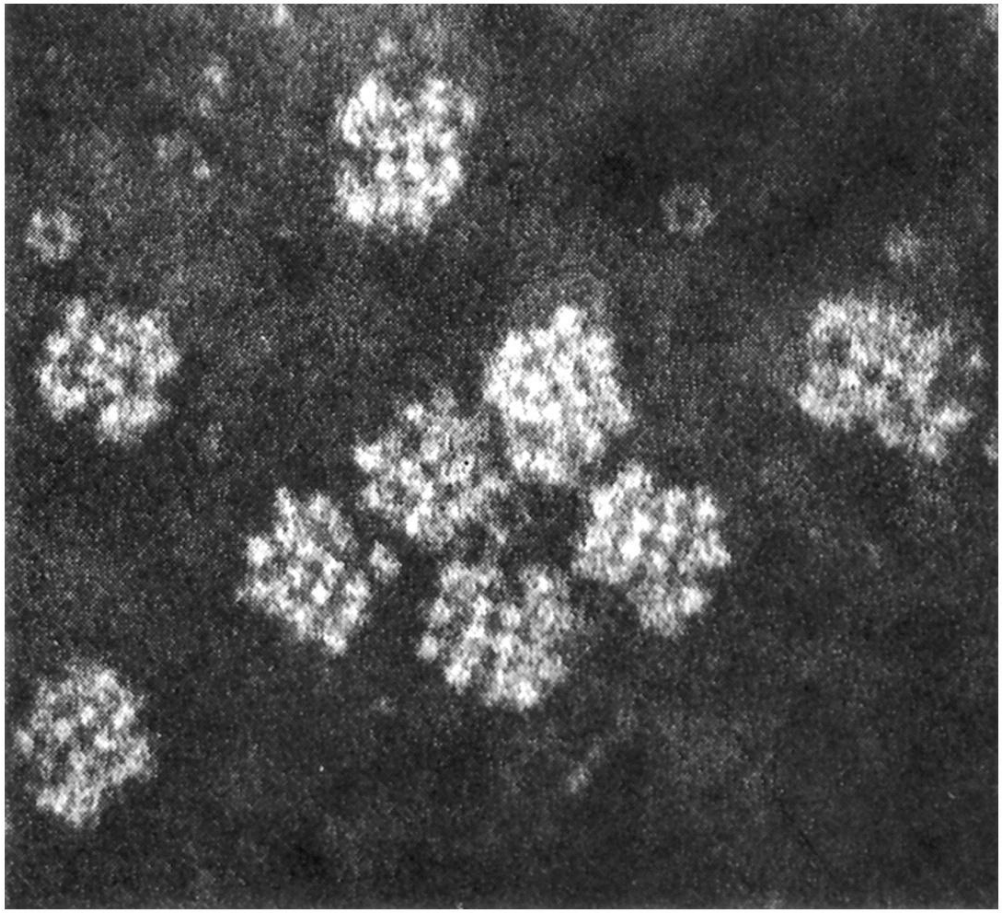


Превращение пирувата в ацетил КоА

- ***Пируватдегидрогеназный комплекс*** - поли-ферментный комплекс, который состоит с **3 ферментов**, **5 коферментов**

Пируватдегидрогеназный комплекс –

молекулярная масса от 4 до 10 млн дальтон



Ферменты:

E1 = ***пируватдегидрогеназа***

E2 = ***дигидролипоил ацетилтрансфераза***

E3 = ***дигидролипоил дегидрогеназа***

Коферменты: ***ТПФ (тиамин пирофосфат), липоамид, HS-КоА, ФАД, НАД+.***

ТПФ является производным **витамина B_1** (тиамин);

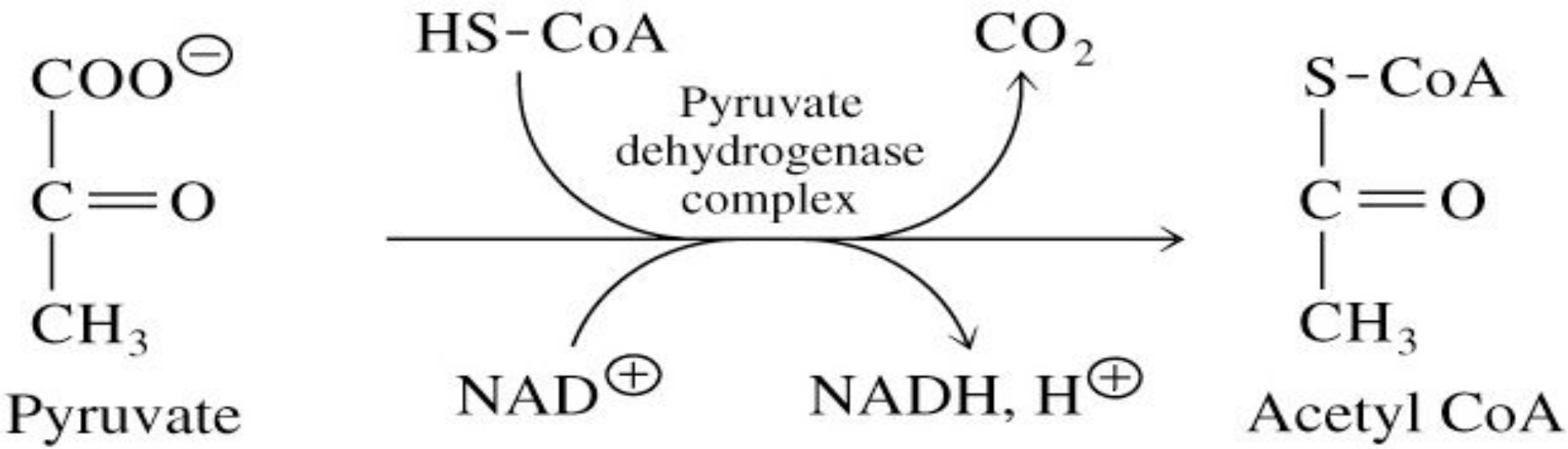
НАД – B_5 (никотинамид);

ФАД –B_2 (рибофлавин),

HS-CoA –B_3 (пантотеновая кислота),

липоамид – липоевая кислота

Общая реакция пируватдегидрогеназного комплекса



$$H_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + НАД^+ + KoASH \longrightarrow H_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-SKoA + CO_2 + НАДН + H^+$$

Цикл трикарбоновых кислот

Ганс Адольф Кребс,
выдающийся биохимик, родился в Германии. Работал в Британии. Его открытие в 1937 г. цикла трикарбоновых кислот, было критическим для понимания клеточного метаболизма. Нобелевская премия в 1953 г.

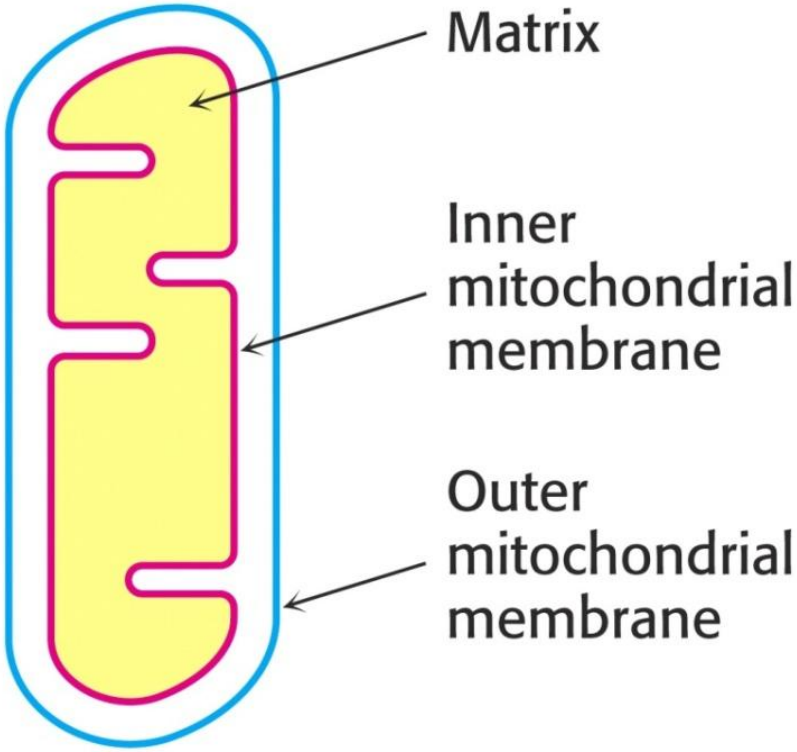
Названия:

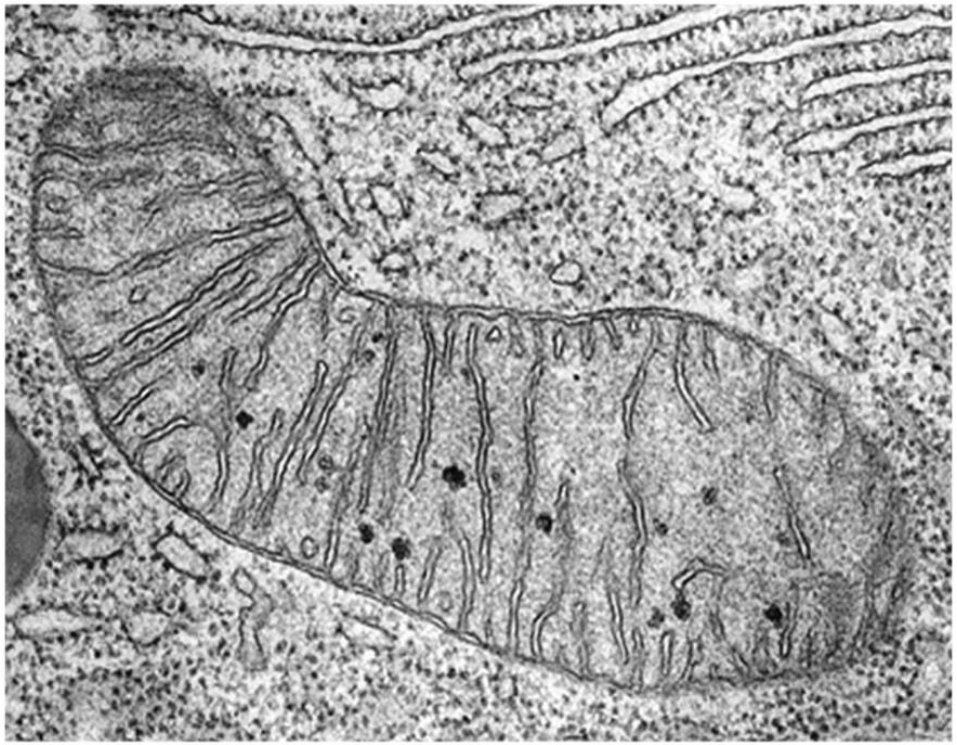
Цикл трикарбоновых кислот

Цикл лимонной кислоты

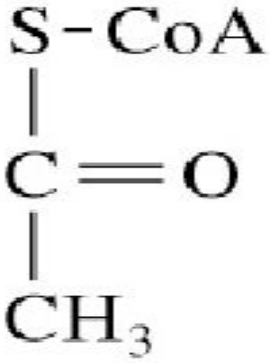
Цикл Кребса

У эукариотов все реакции цикла Кребса проходят в матриксе митохондрий

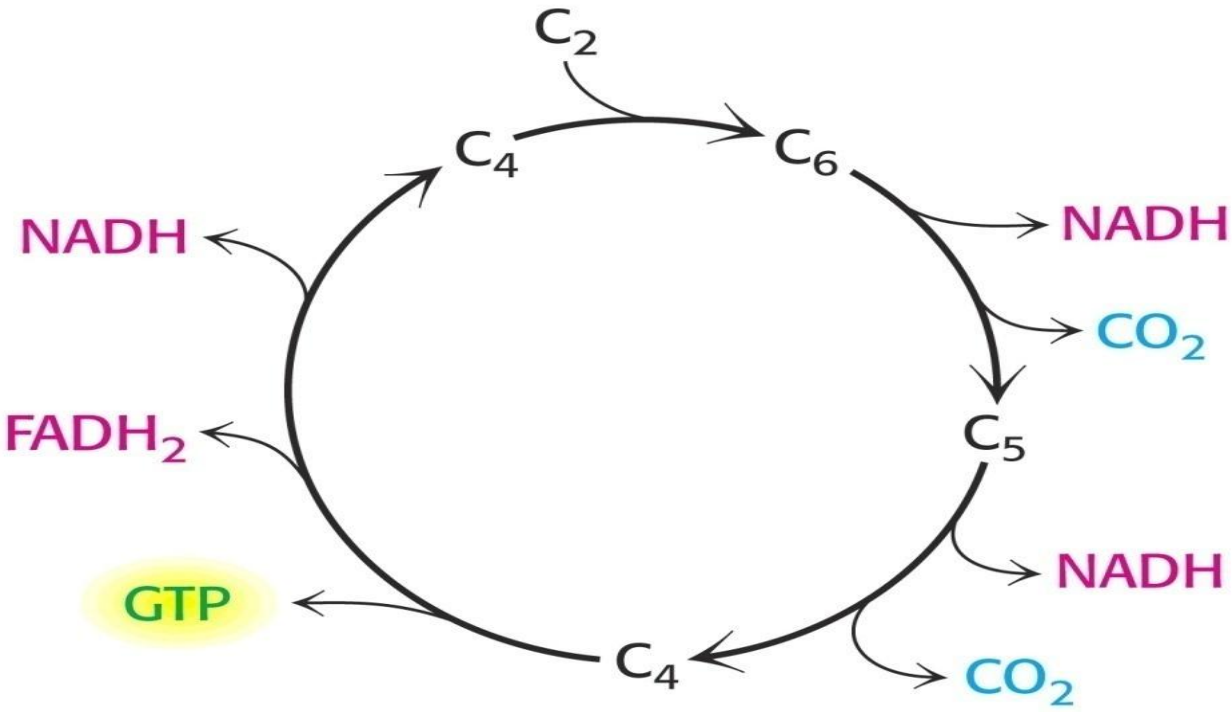


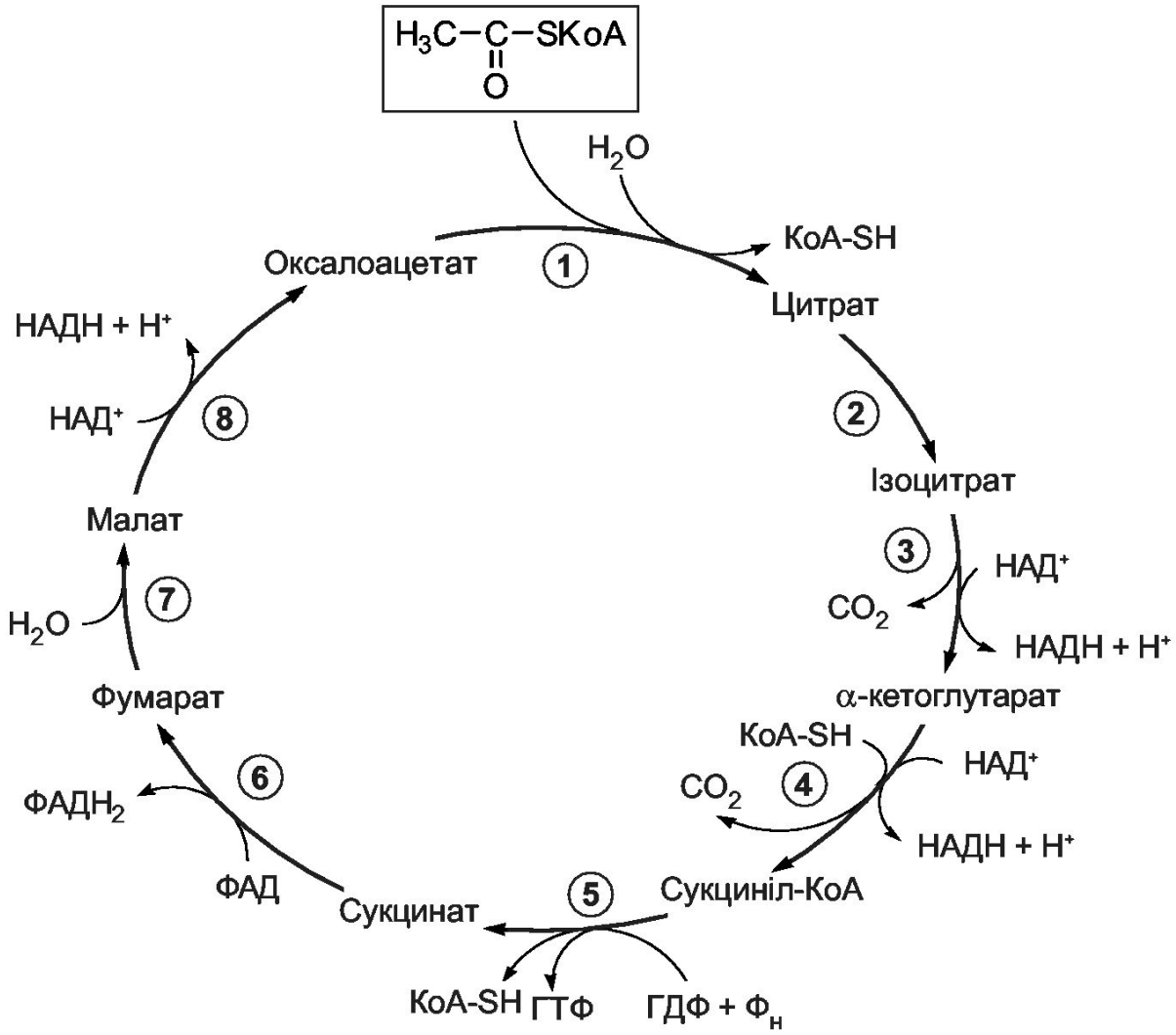


Общие представления о цикле Кребса



Acetyl CoA





Цикл лимонной кислоты.

Ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 — аконитаза; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — а-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; 5 — сукцинаттиокиназа; 6 — сукинатдегидрогеназа; 7 — фумаратгидратаза; 8 — малатдегидрогеназа.

Функции цикла трикарбоновых кислот

- **Интеграция метаболизма.**
- Цикл является ***амфиболичным*** **(катаболичным и анаболичным одновременно).**
- Образование **энергии** в форме **ГТФ (АТФ).**
- Образование **восстановительных эквивалентов** в форме **НАДН** и **ФАДН$_2$**