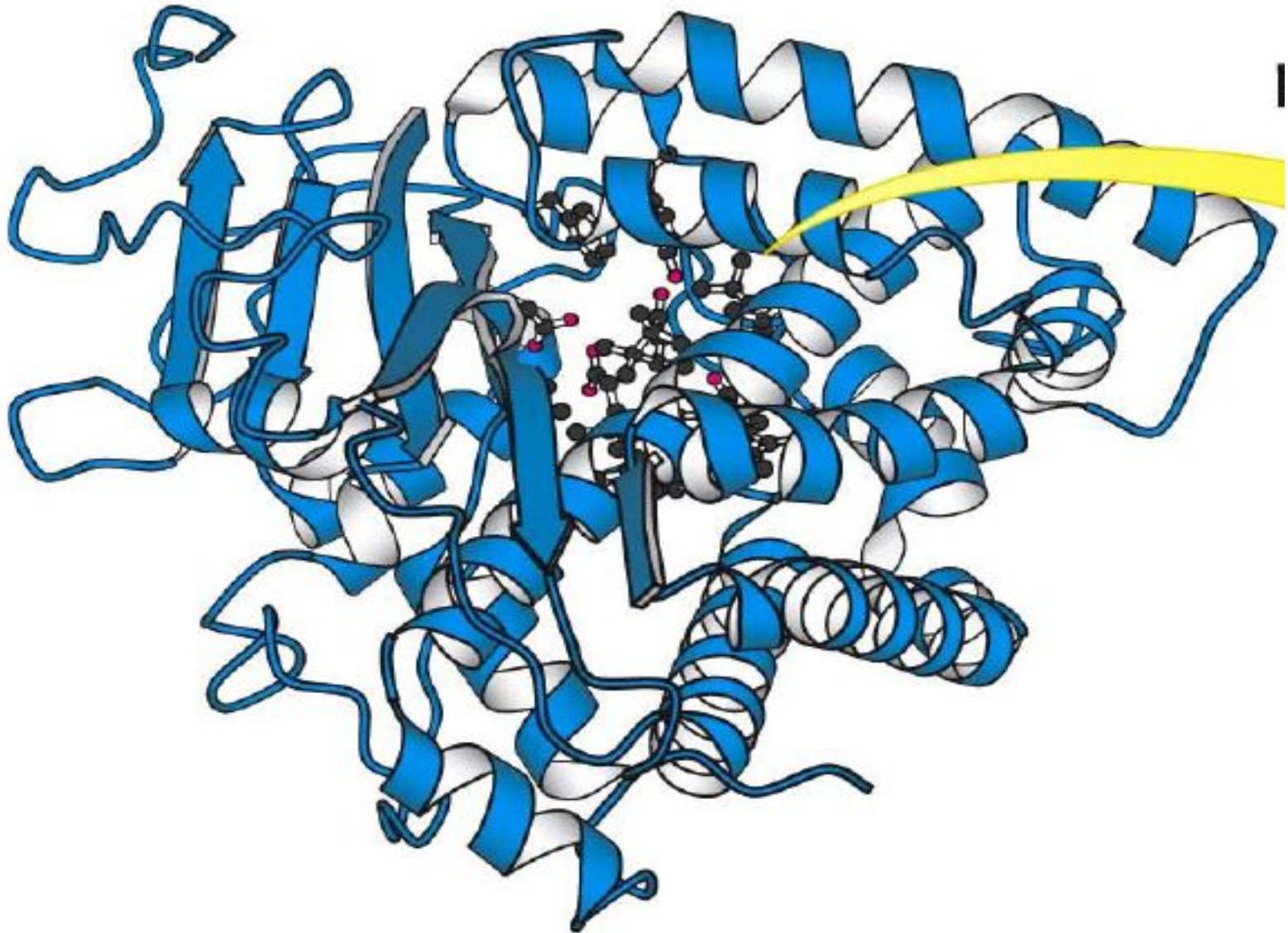


Кинетика ферментативных реакций



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 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ скорость увеличивается примерно в 2-4 раза (правило Вант-Гоффа).



Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

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

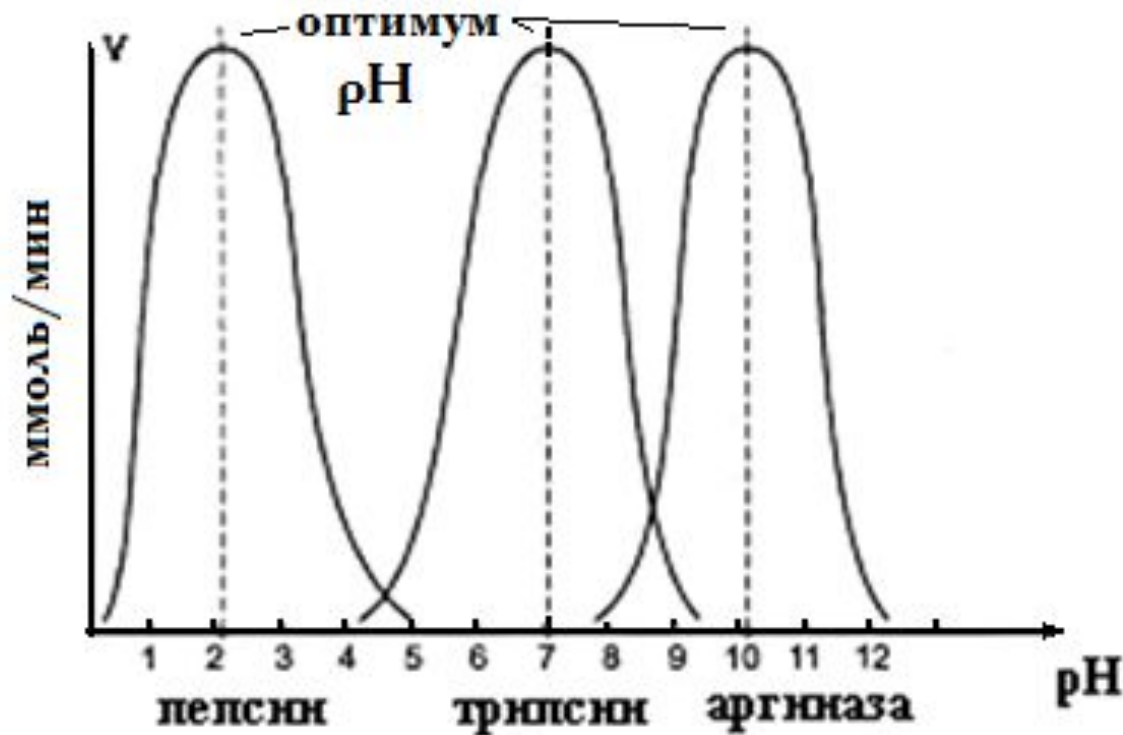


При высоких температурах, более 55–60 °С активность фермента резко снижается из-за его тепловой денатурации, и, как следствие этого, наблюдается резкое снижение скорости ферментативной реакции.



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

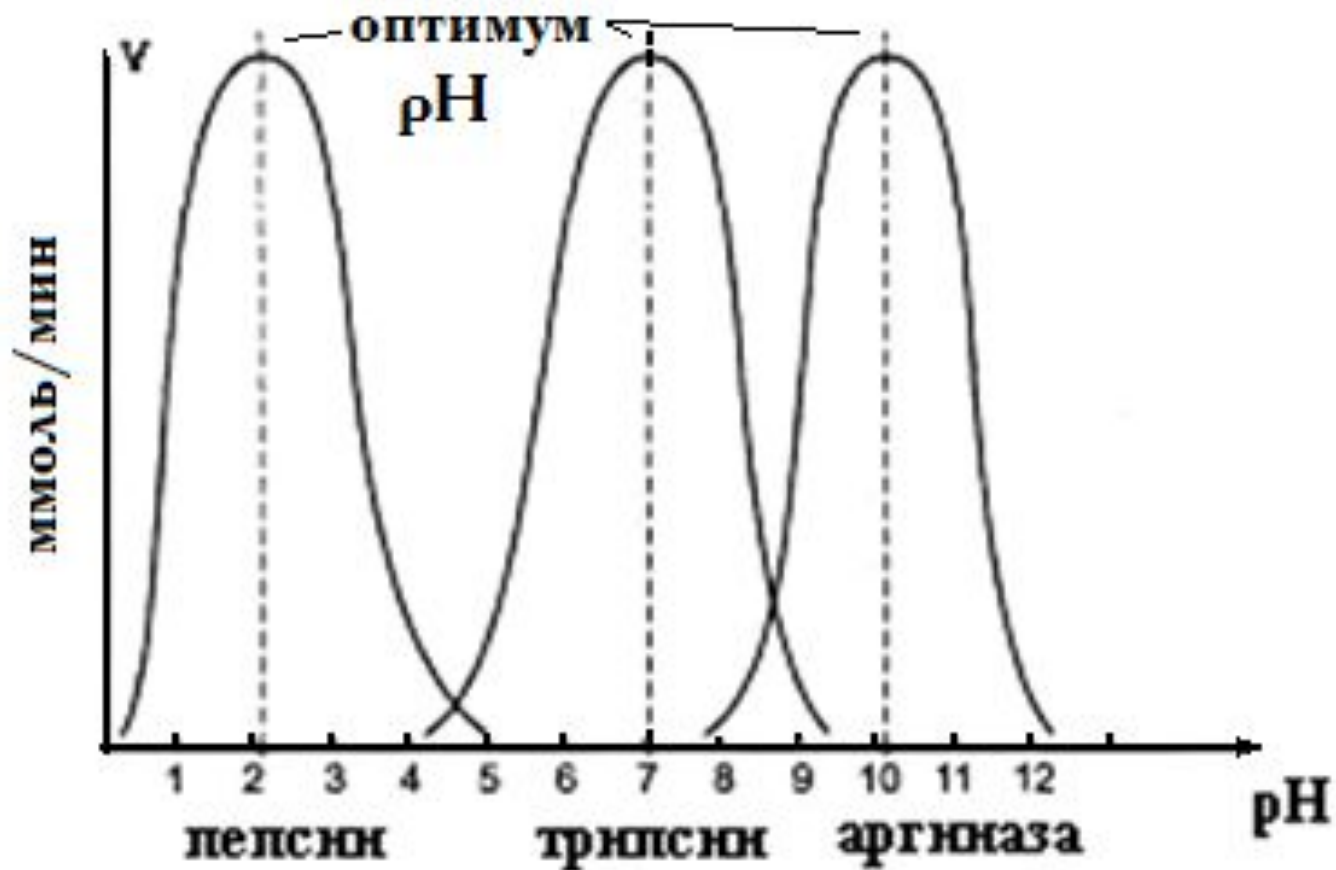




Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

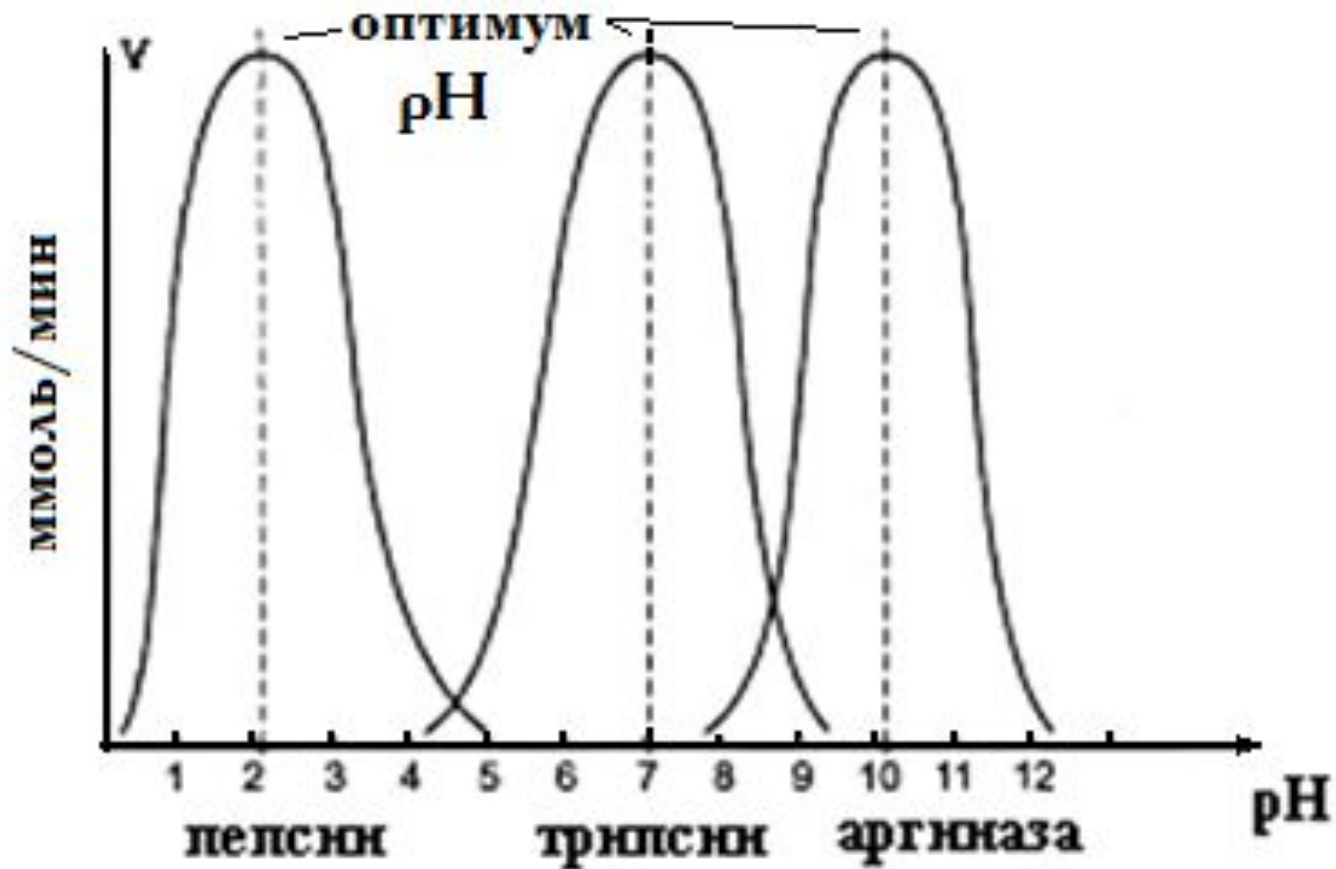
Характер зависимости ферментативной реакции от pH определяется тем, что этот показатель оказывает влияние на:

- ионизацию аминокислотных остатков, участвующих в катализе,
- ионизацию субстрата,
- 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.

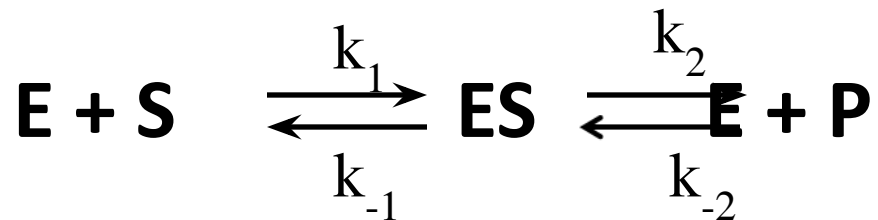


Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

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

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

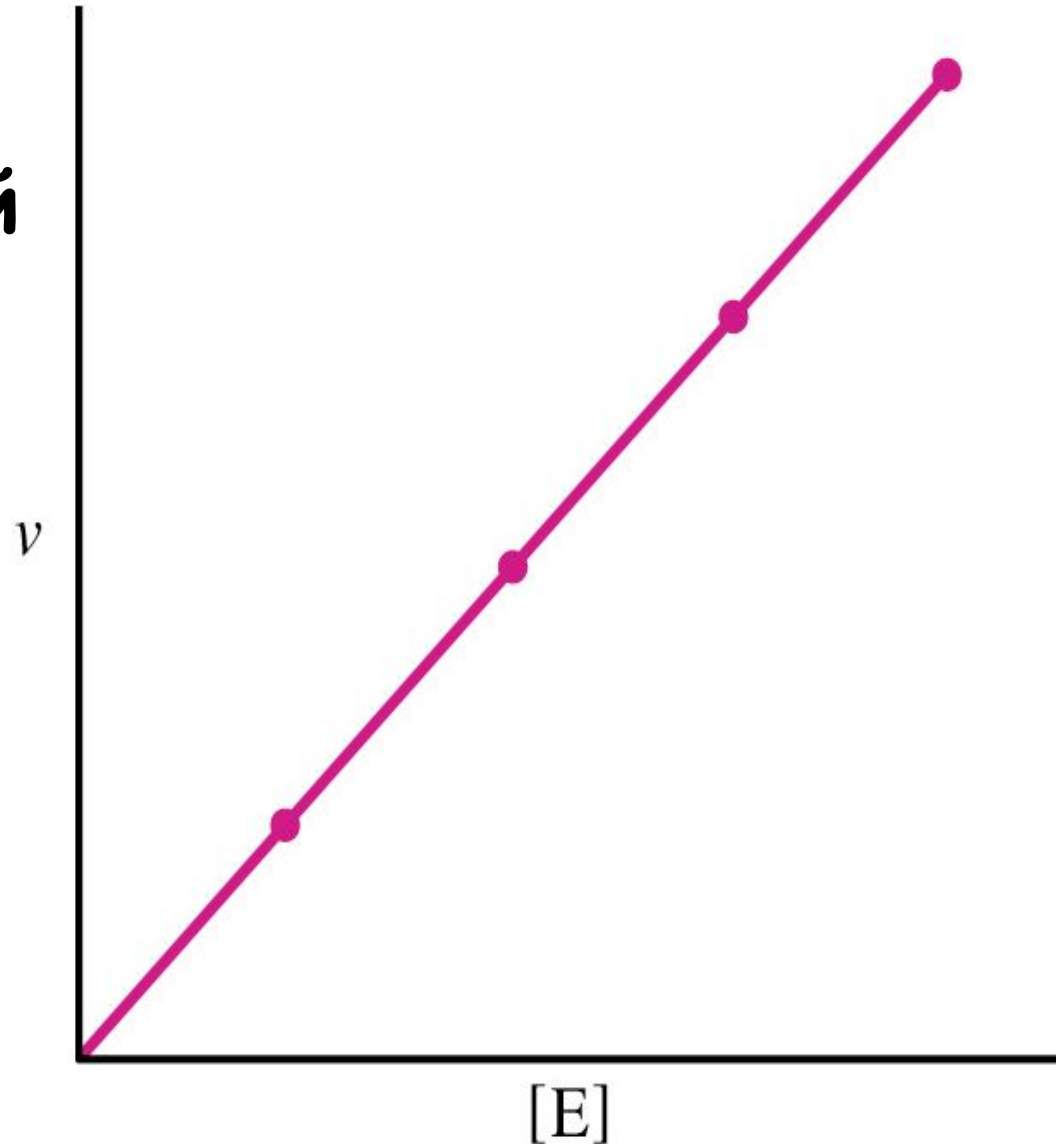
Во время реакции молекула фермента, E, и молекула субстрата, S, формируют **промежуточный фермент-субстратный (ES) комплекс**



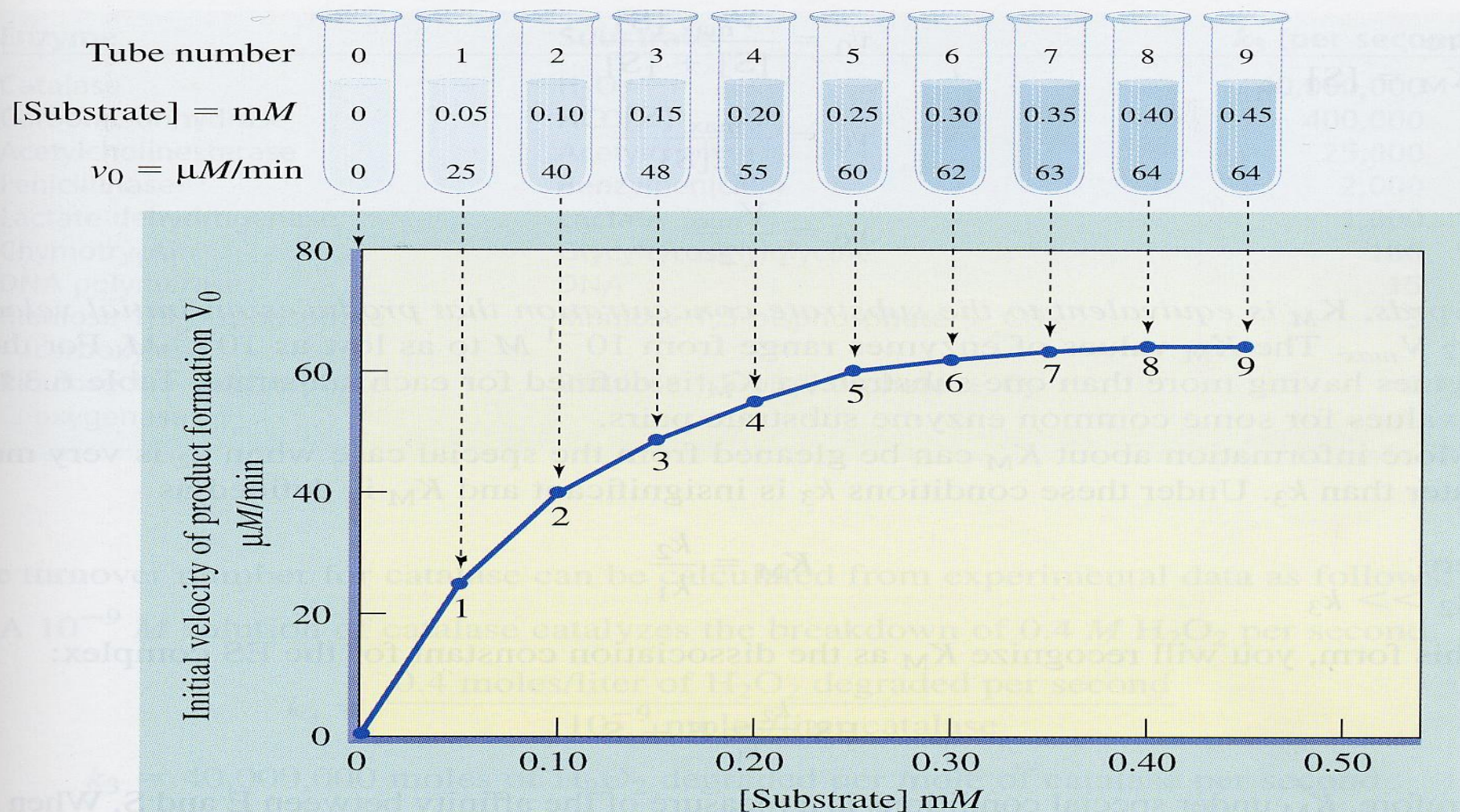
k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} - **константы скорости** - указывают на скорость или эффективность реакции

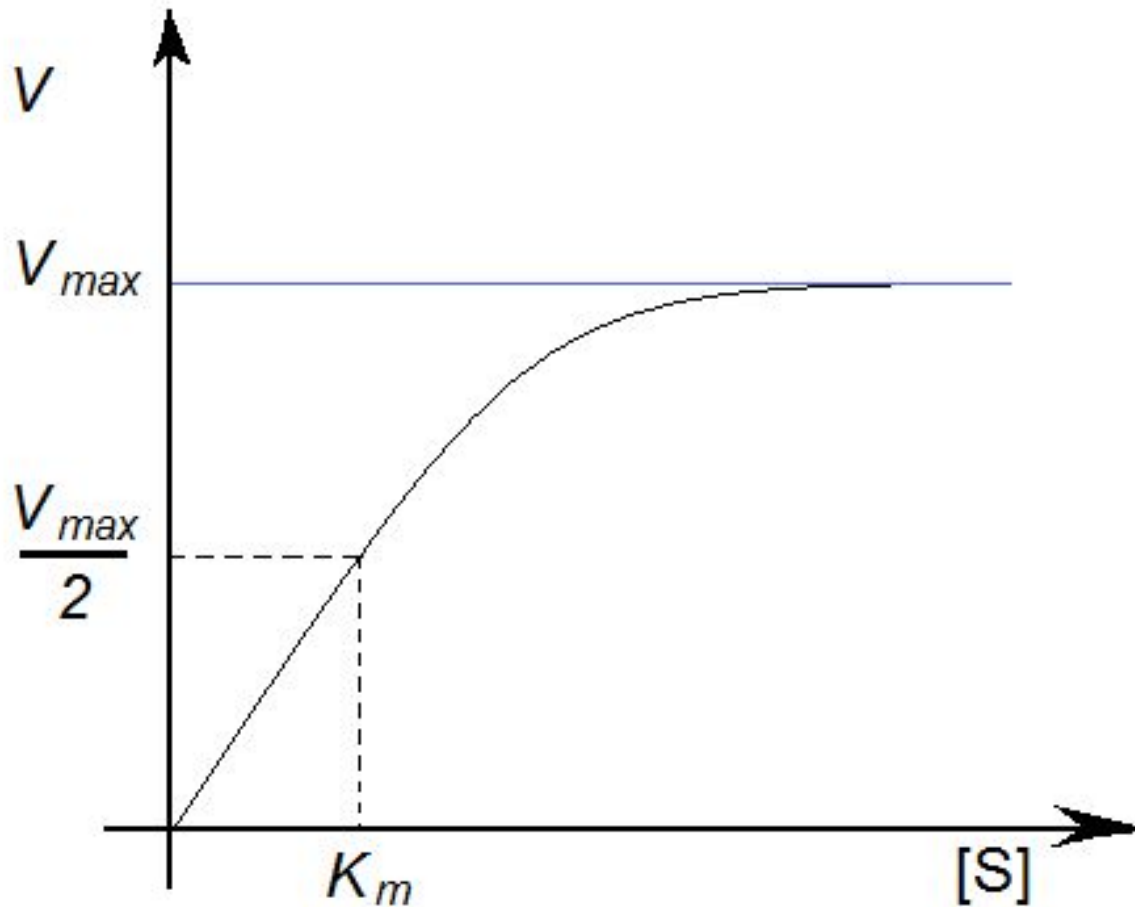
Влияние концентрации фермента на скорость реакции

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 возрастает 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 $K_{\text{cat}} E_0$;

$[S]$ – концентрация субстрата.

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

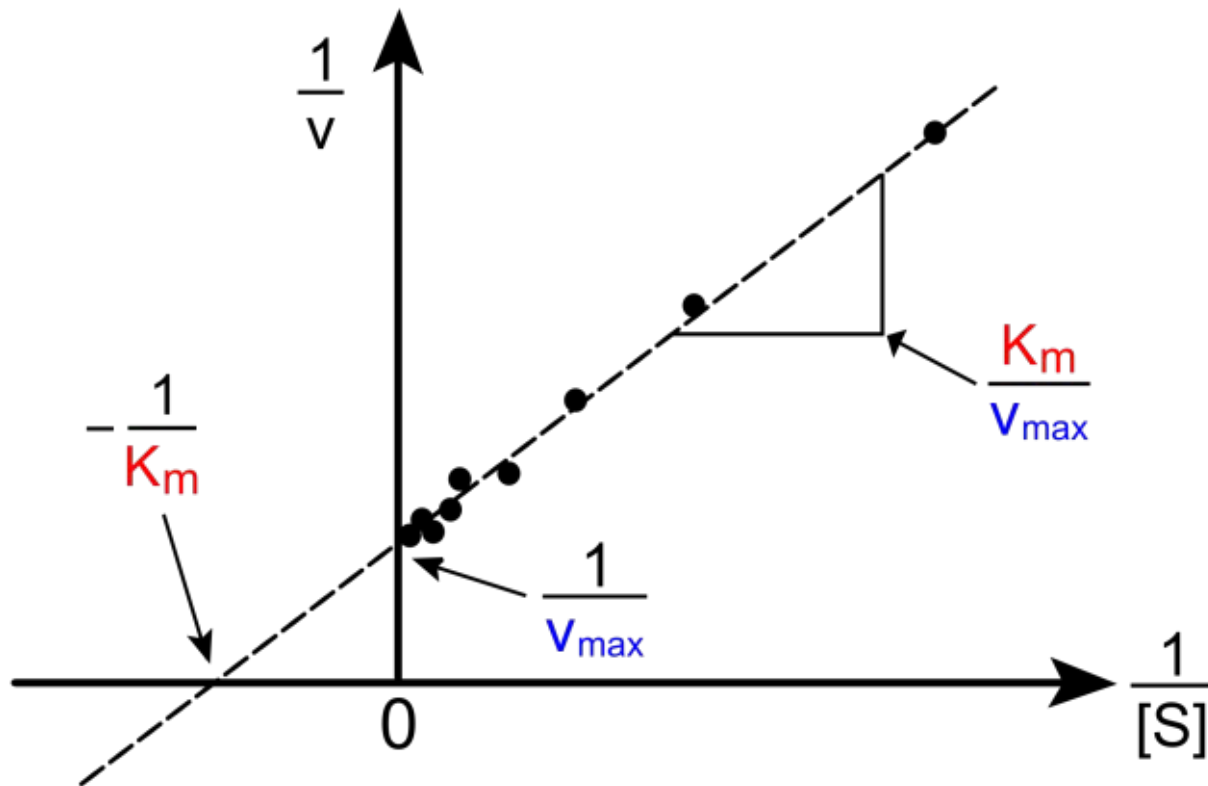
Скорость катализа

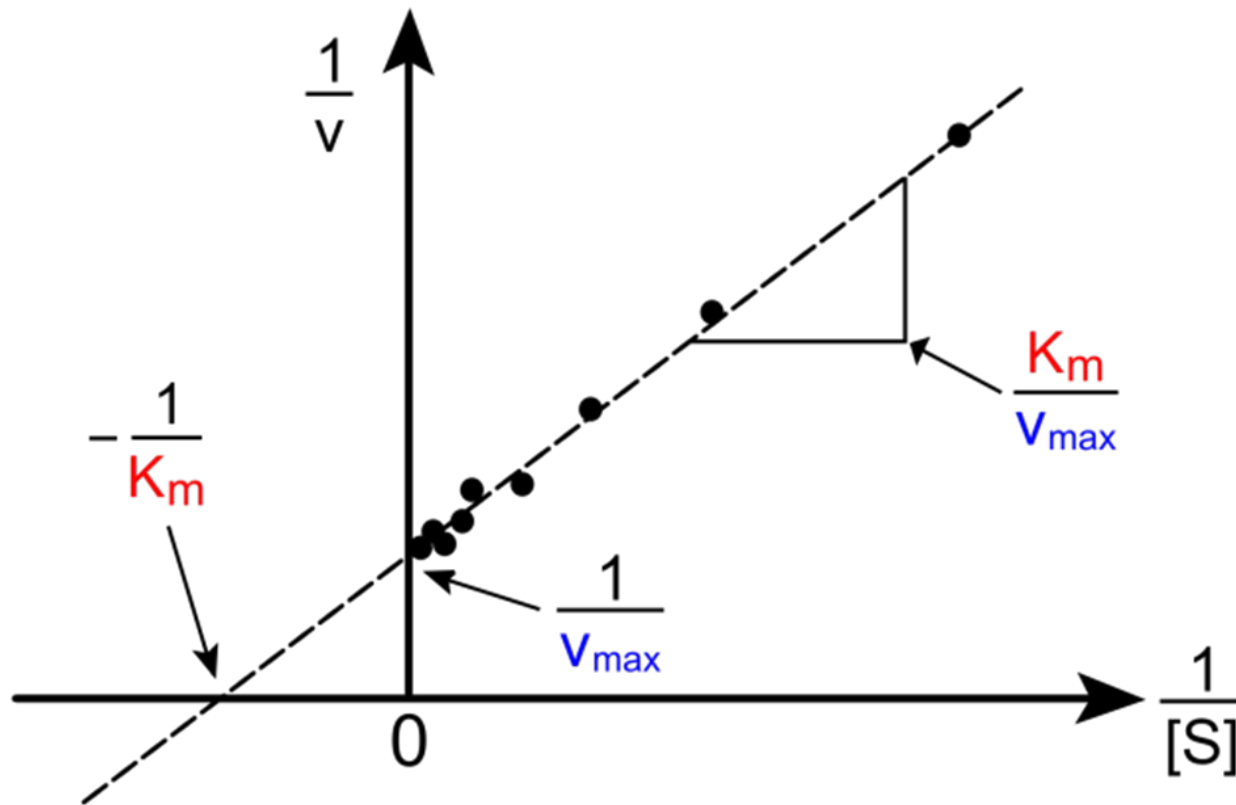
Уравнение Михаэлиса—Ментен — основное уравнение ферментативной кинетики, описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата.

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

Обратимые, 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

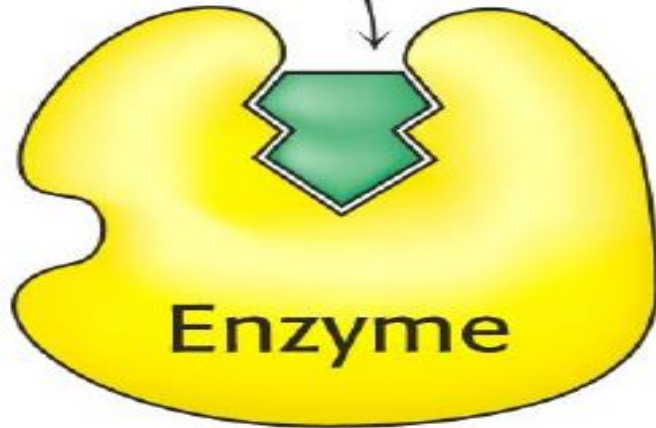
Обратимое ингибирование

Конкурентное

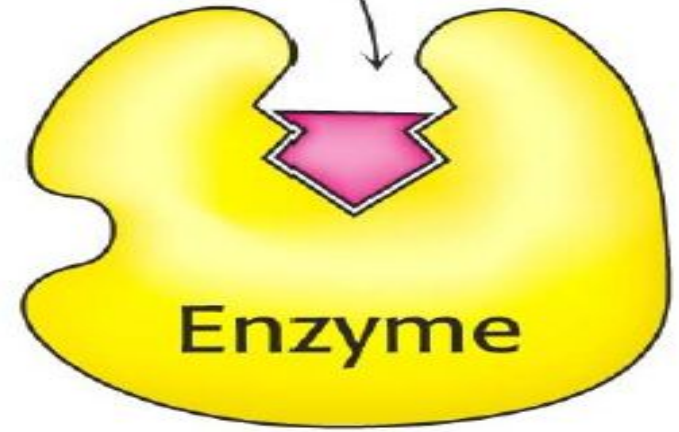
- Ингибитор имеет схожую с субстратом структуру, поэтому связывается с тем же активным центром
- Фермент не может отличить ингибитор и субстрат
- Присоединение ингибитора к активному центру предотвращает связывание субстрата
- Конкурентный ингибитор снижает скорость катализа, уменьшая количество молекул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

Конкурентное ингибирование

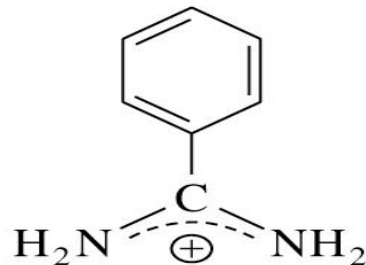
Substrate



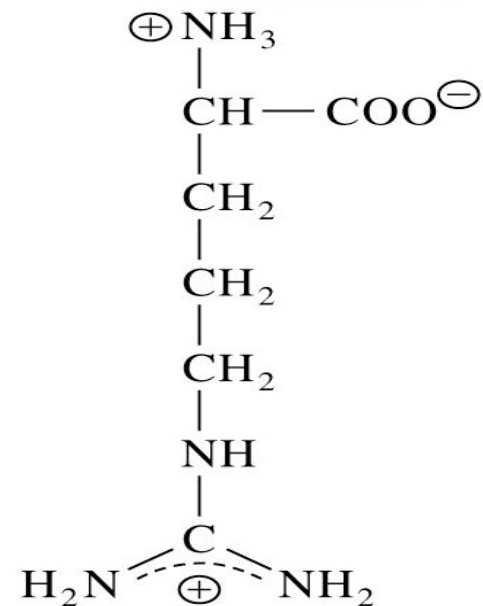
Competitive inhibitor



Бензамидин
конкурирует с
аргинином за
связывание с
трипсином



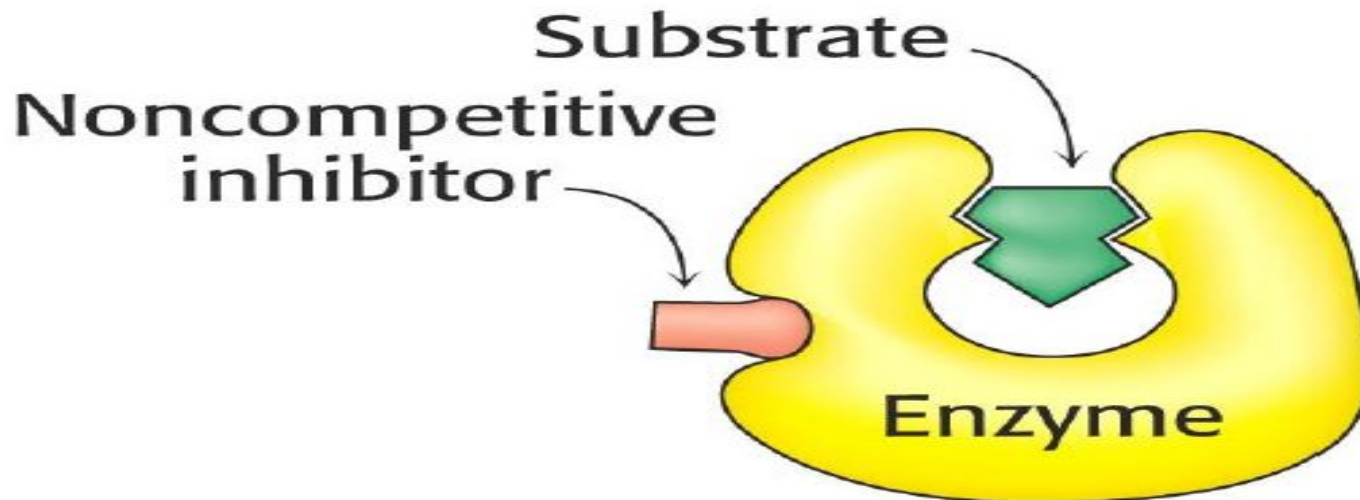
Benzamidine



Arginine

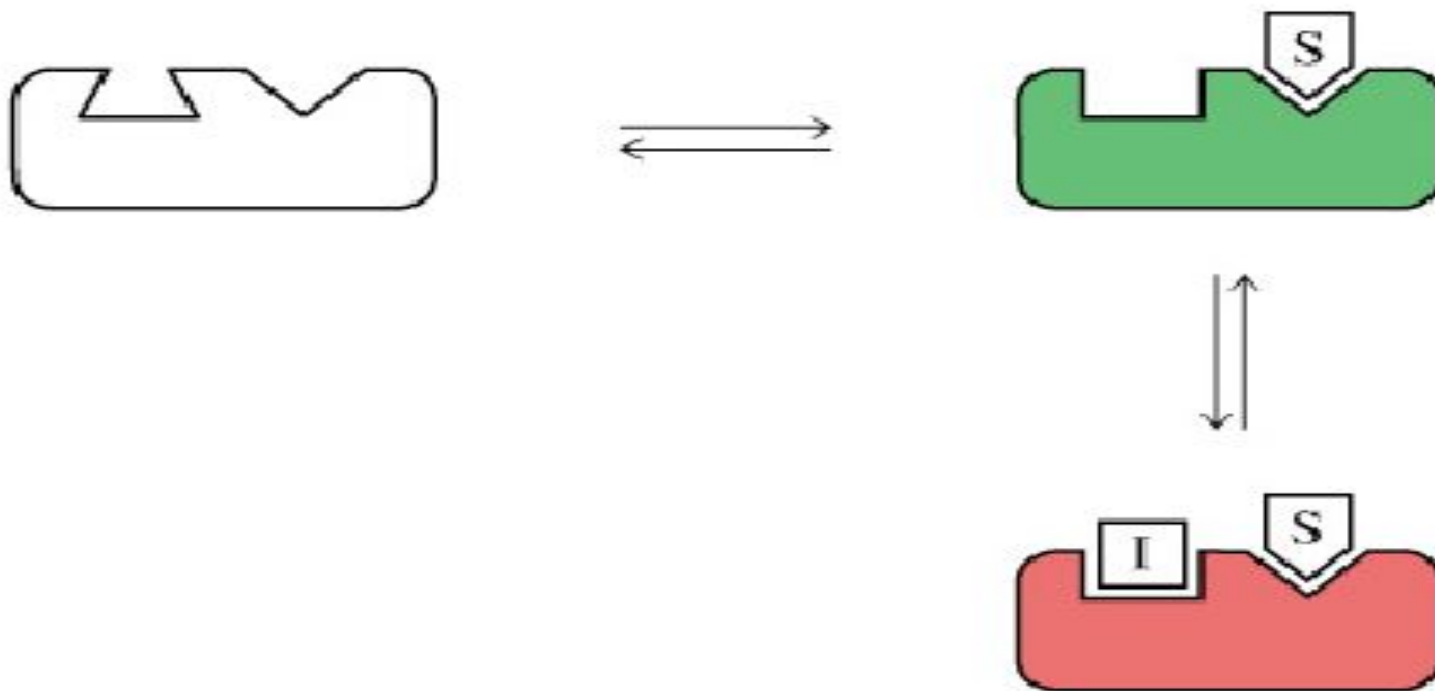
Неконкурентное торможение

- 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 (EI), так и с фермент-субстратным комплексом (ESI)
- 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

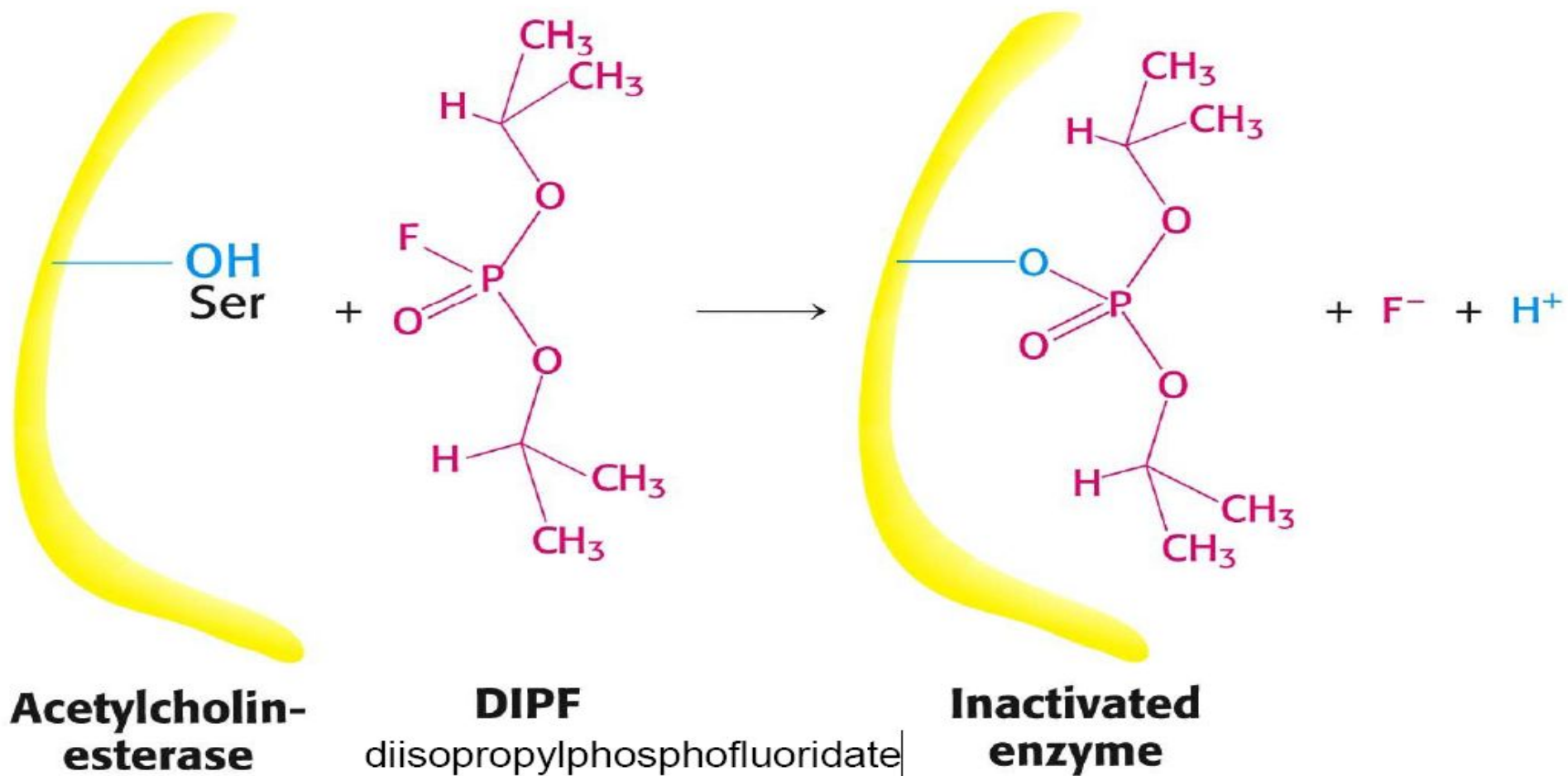
Очень медленная диссоциация комплекса EI

Связываются ковалентными связями с ферментом.

Необратимые ингибиторы

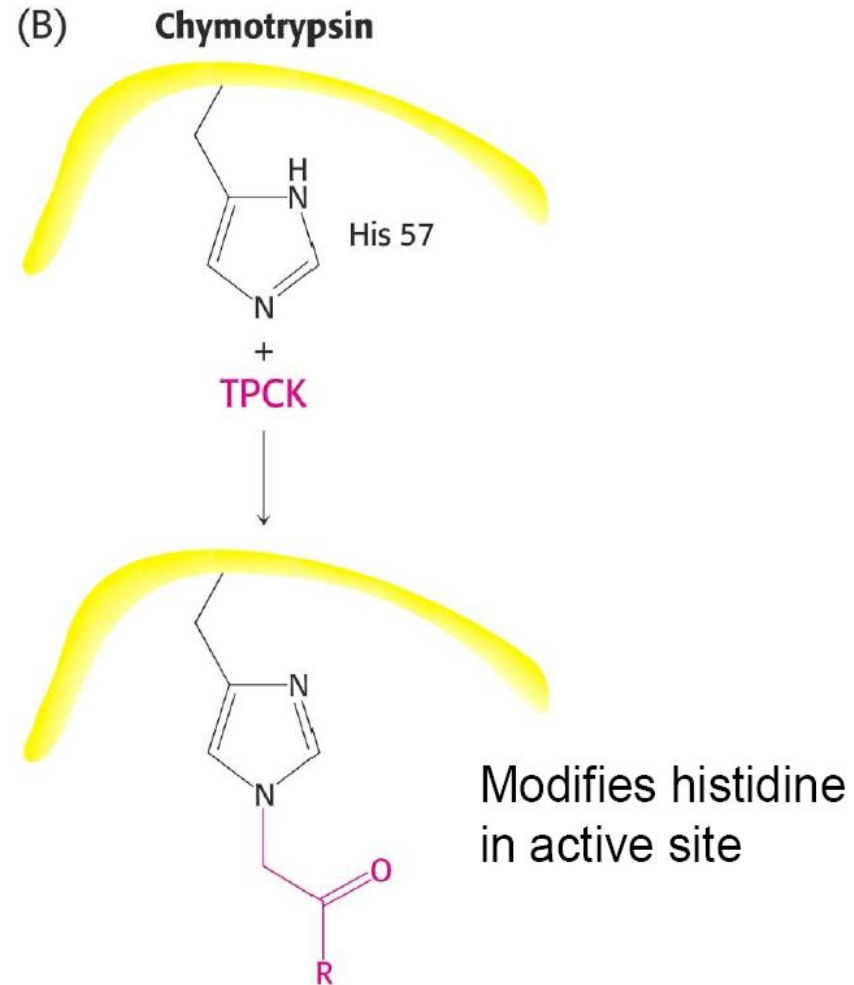
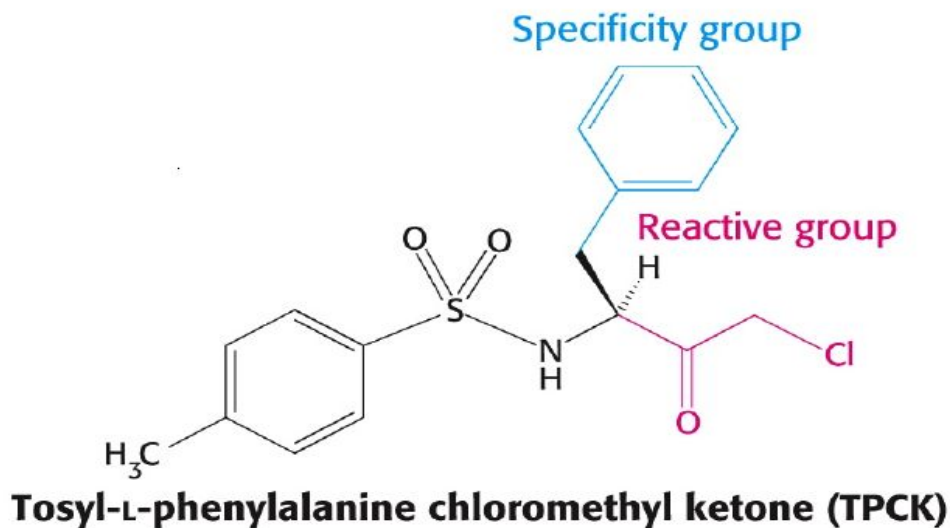
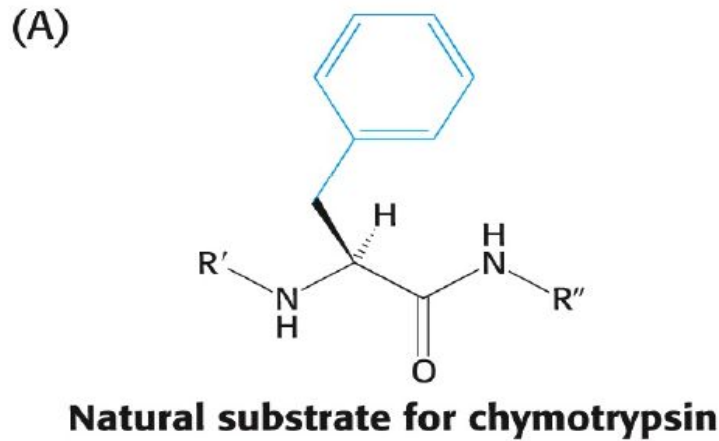
- *ингибиторы специфические к группам аминокислотных остатков*
- *аналоги субстратов*
- *суицидные ингибиторы*

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



Аналоги субстратов

- структурно похожи на субстрат фермента
- ковалентно модифицируют активный центр



Суицидные ингибиторы

- 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 принимает участие в своем инактивировании

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

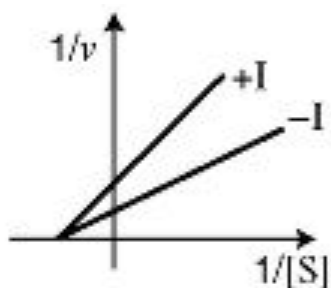


график 1

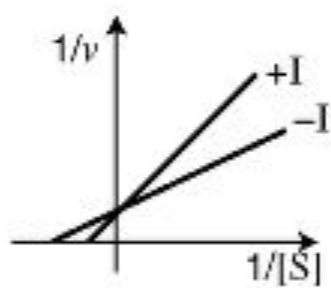


график 2

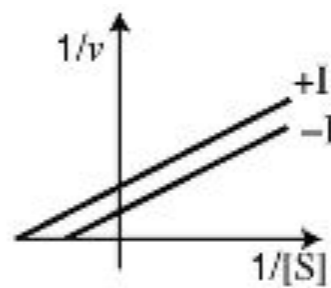


график 3

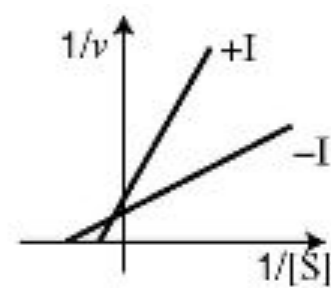


график 4

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

Аллостерические ферменты

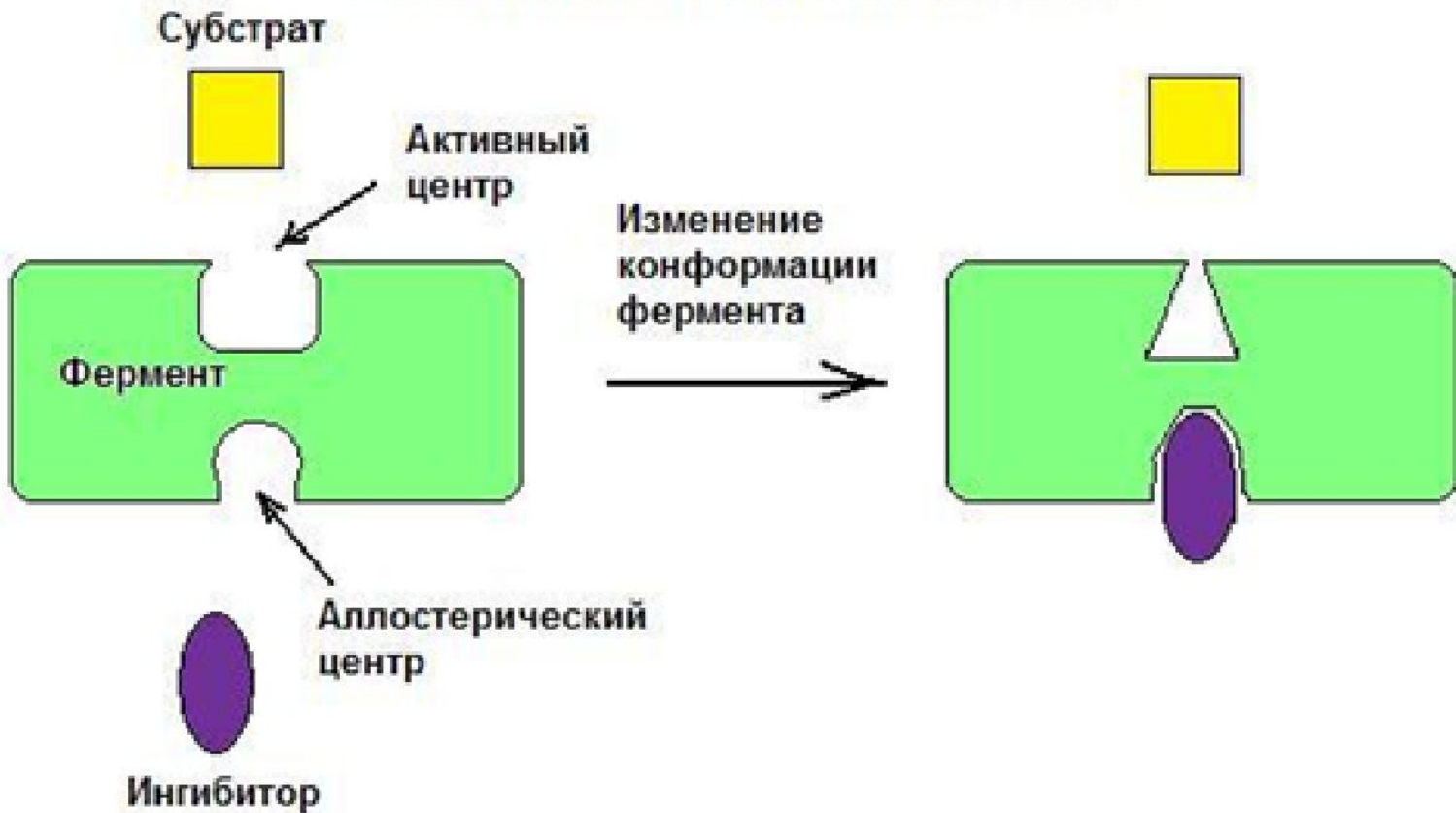
Термин «аллостерический» происходит от греческих слов allo – другой, stereo – твердый (относящийся к трехмерной структуре, пространству).

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**.

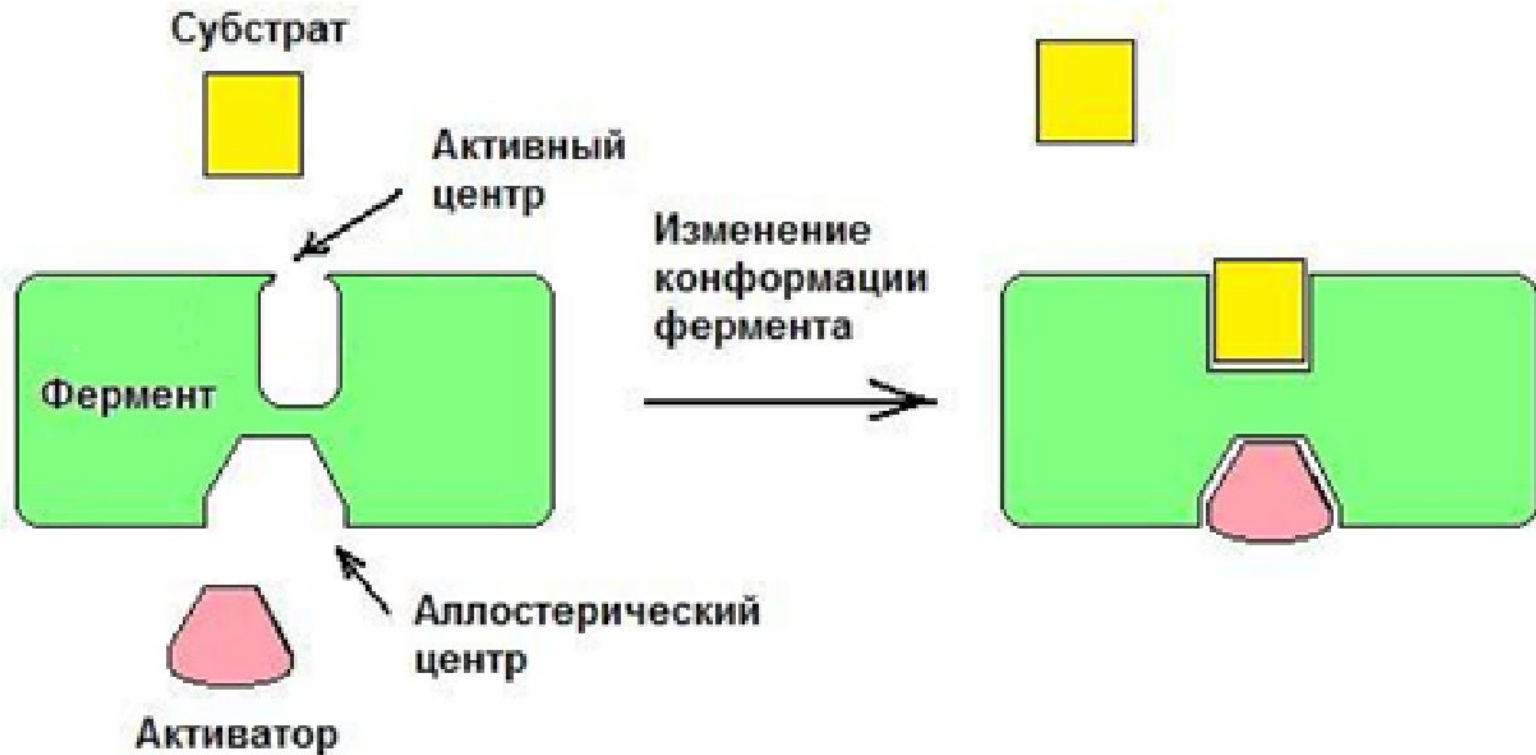
Аллостерические ферменты

Аллостерическое ингибирование



Аллостерические ферменты

Аллостерическая активация



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

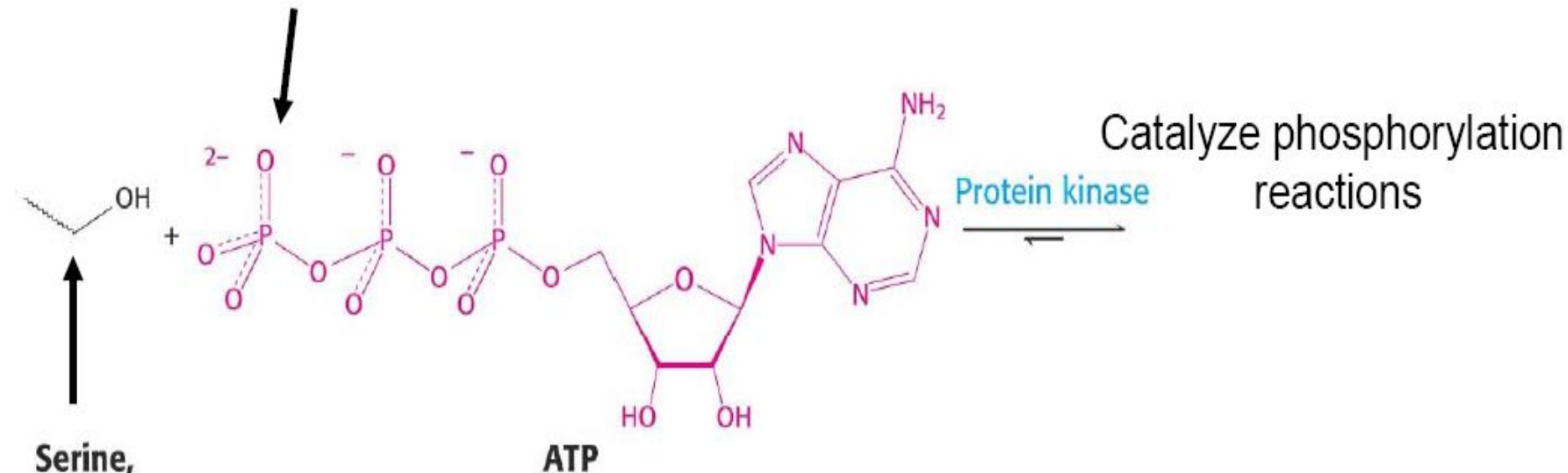
Ковалентное присоединение молекулы к аминокислотному остатку фермента может модифицировать активность последнего

Типы ковалентной модификации:

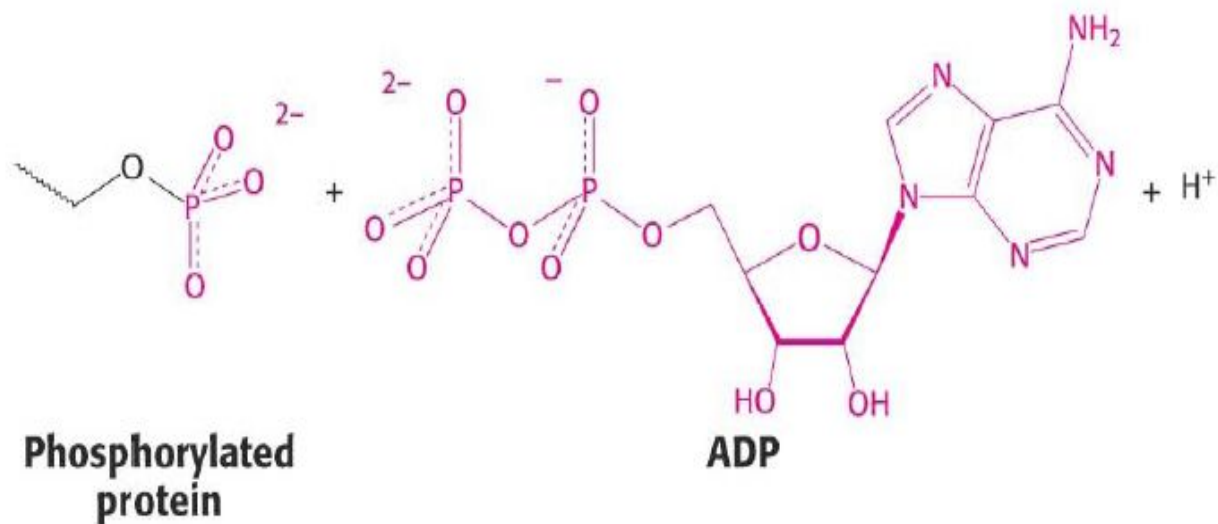
- фосфорилирование;
- ацетилирование;
- карбоксилирование и др.

Фосфорилирование

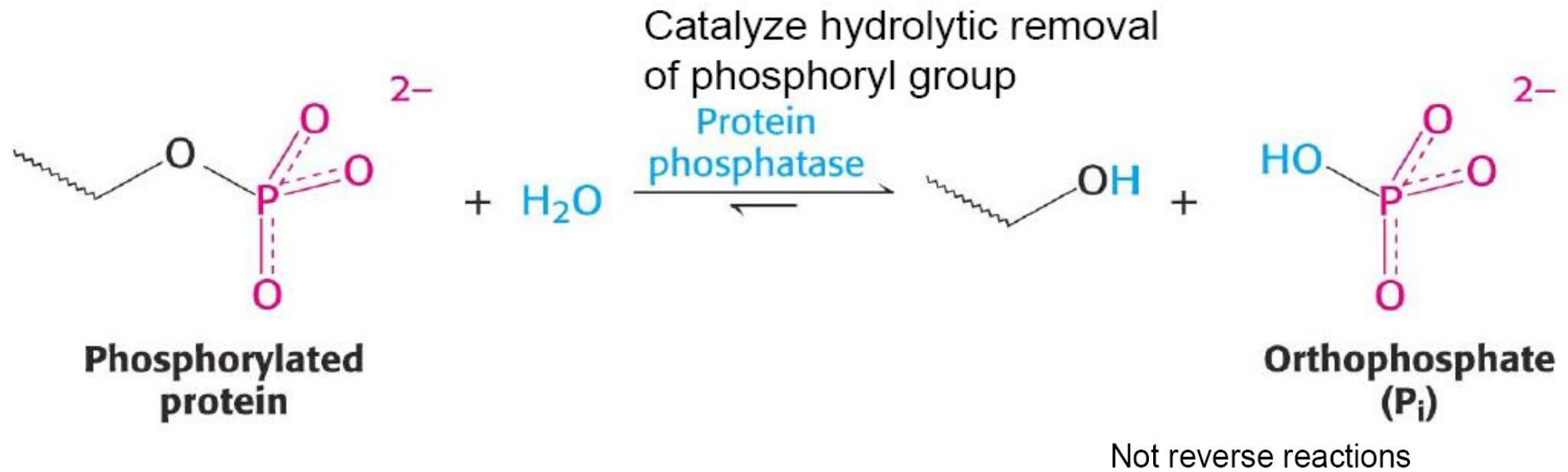
Terminal γ phosphoryl group



Serine,
threonine,
or tyrosine
residue



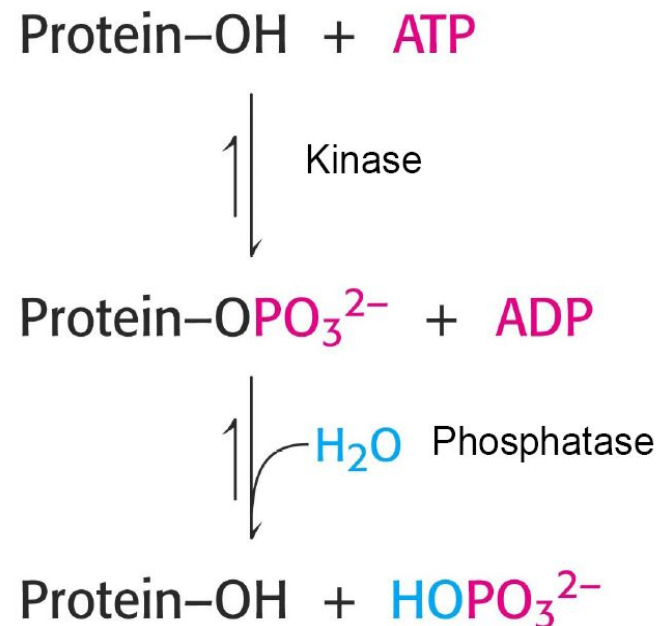
Реакция дефосфорилирования



Как правило, фосфорилированные ферменты более активные

Ферменты, ответственные за фосфорилирование - **протеинкиназы**

Ферменты, ответственные за дефосфорилирование - **фосфатазы**



Изоферменты

множественные 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: ~~лактат~~дегидрогеназа (ЛДГ)



- 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

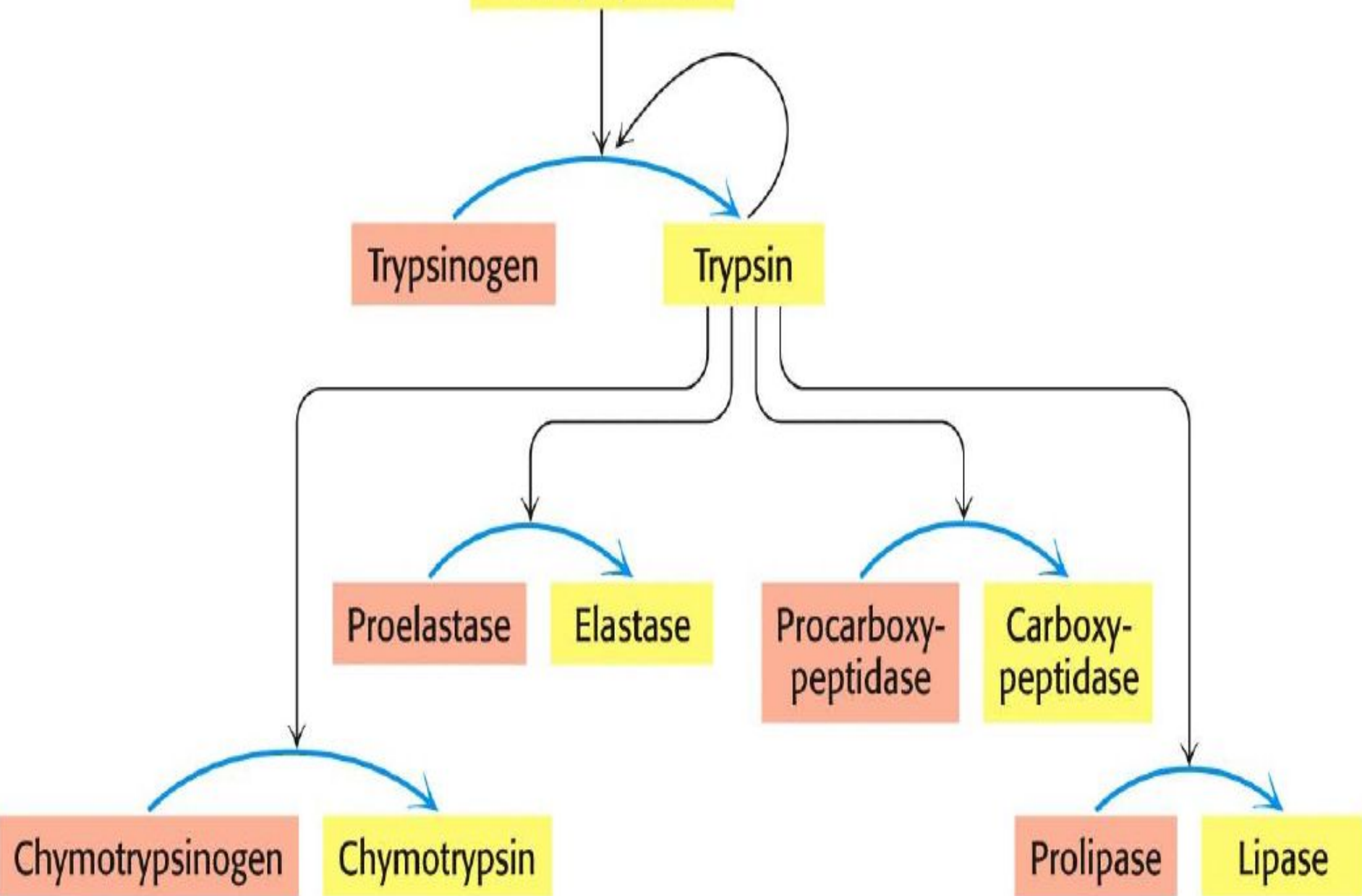
Carboxy-
peptidase

Chymotrypsinogen

Chymotrypsin

Prolipase

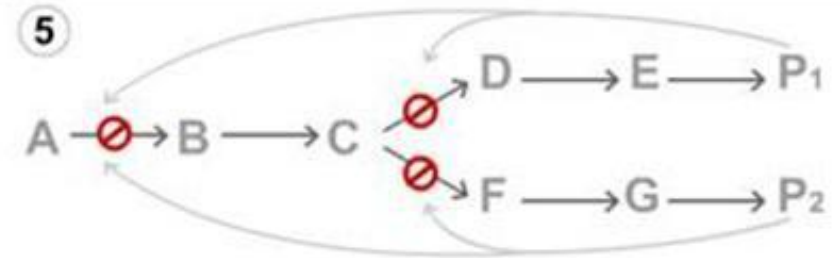
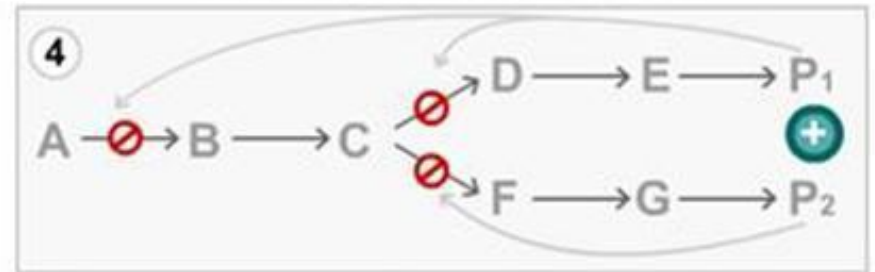
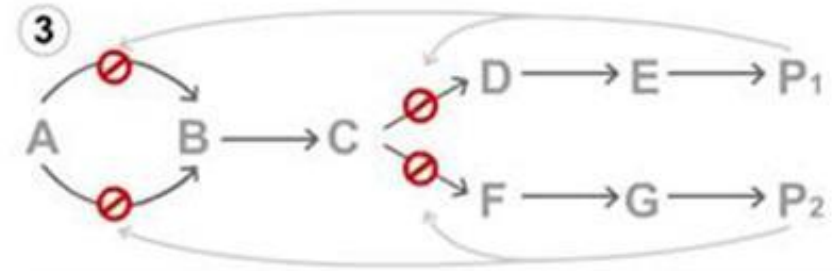
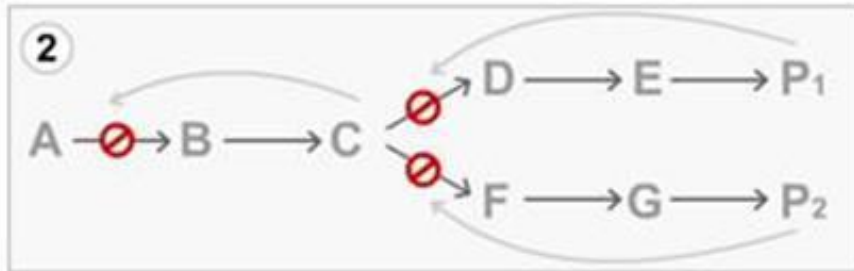
Lipase



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

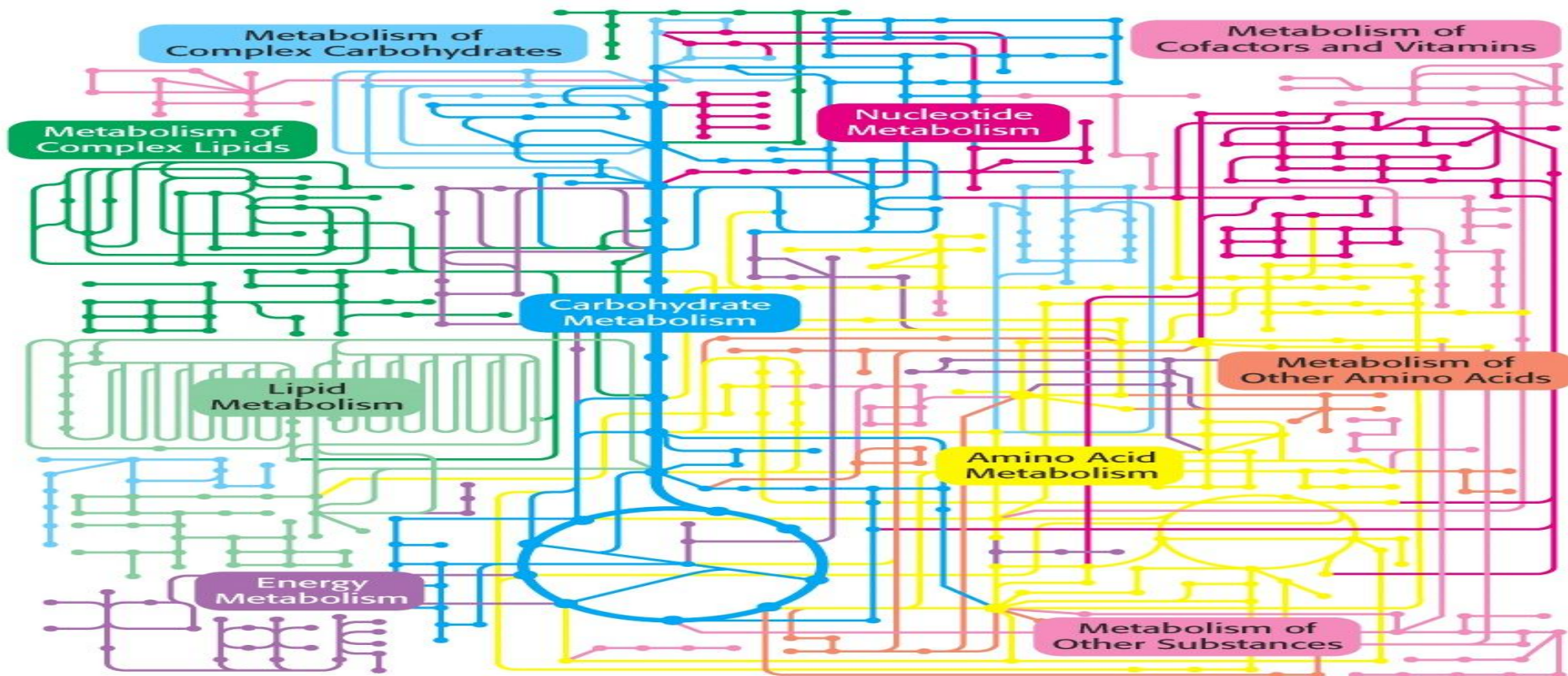
Отрицательная обратная связь и метаболический путь



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



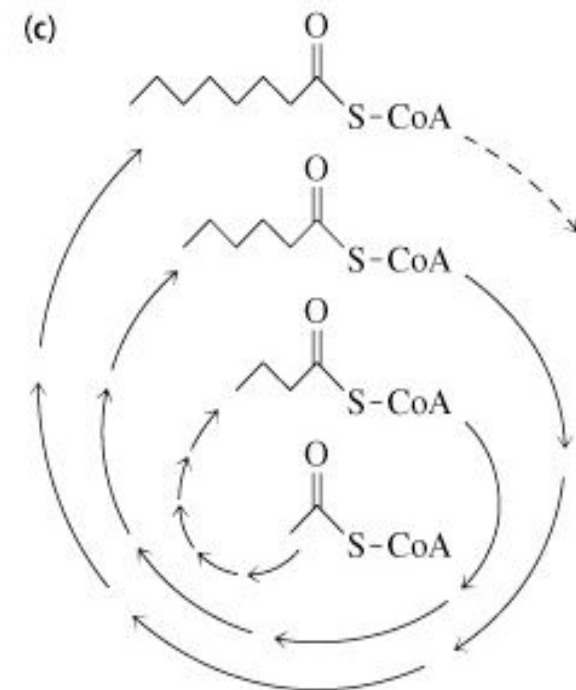
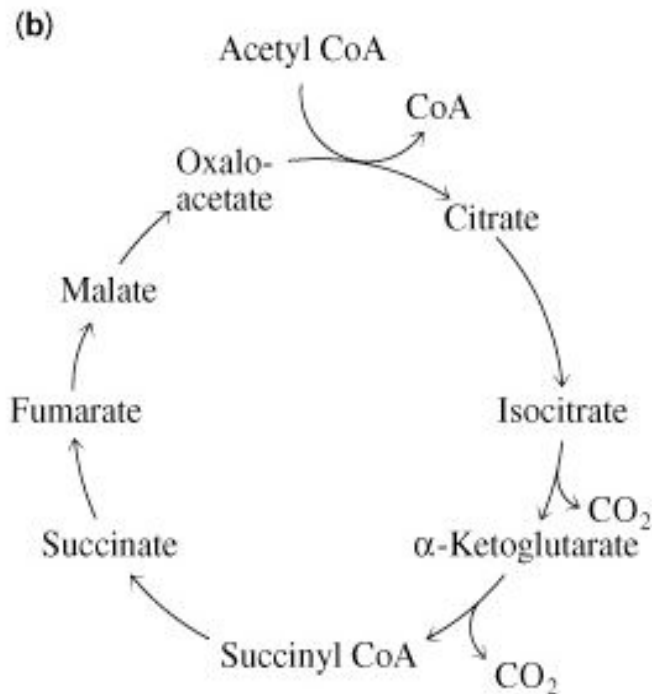
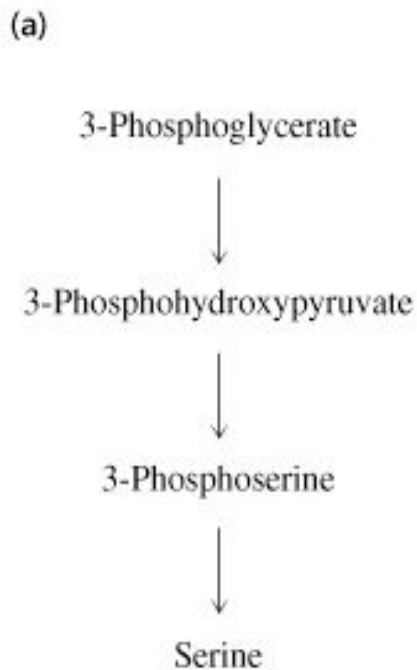
Последовательность реакций, которые имеют цель (например, расщепление глюкозы, синтез жирных кислот) называется **метаболическим путем**

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 образованием меньших и энергии

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

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

Анаболизм характеризуется 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

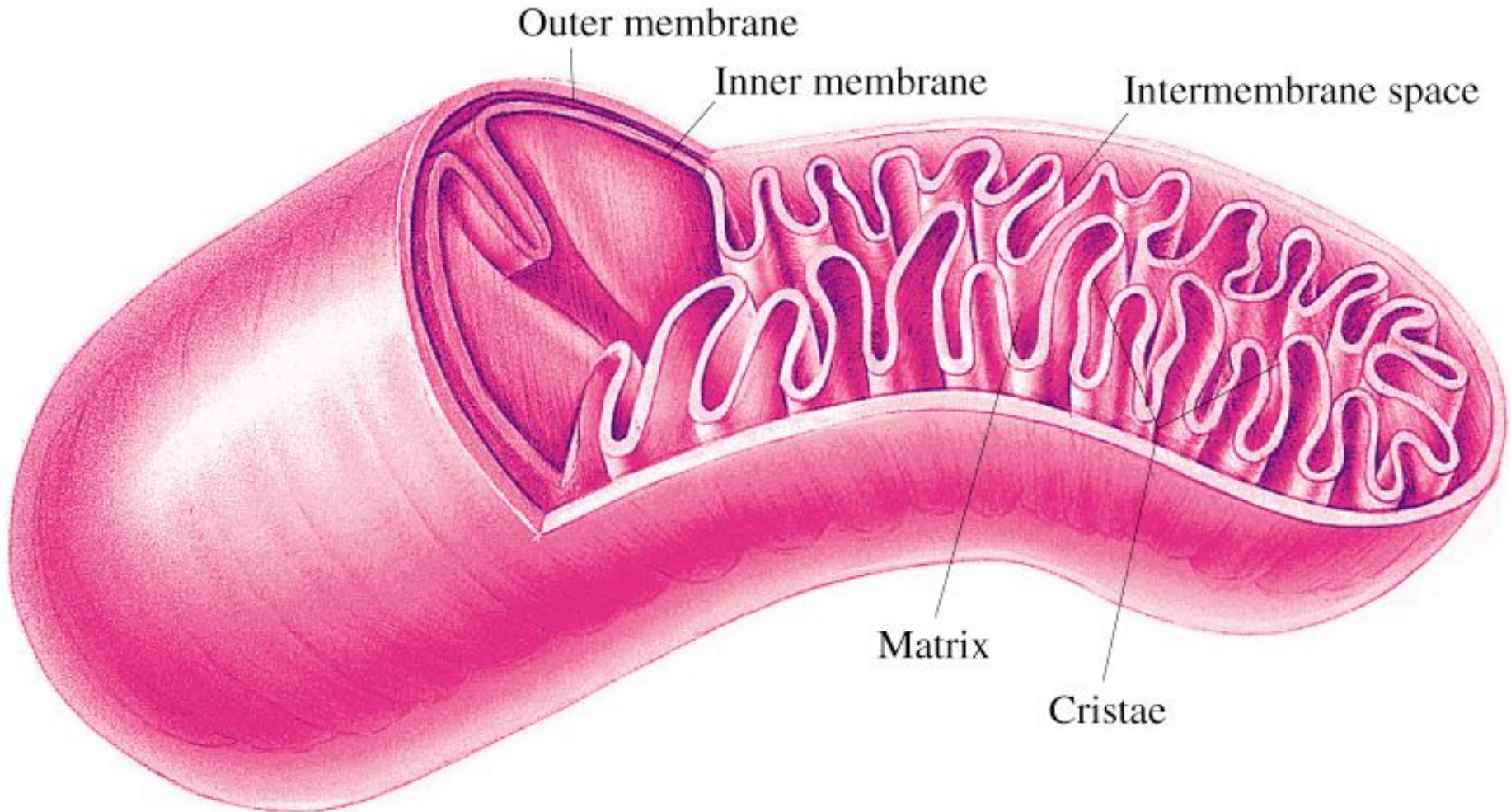
Стадия I (специфическая). Деградация макромолекул (белков, углеводов, липидов) к мономерам

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

Стадия III (неспецифическая).

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

ОКИСЛИТЕЛЬНО ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПИРУВАТА



Глюкоза

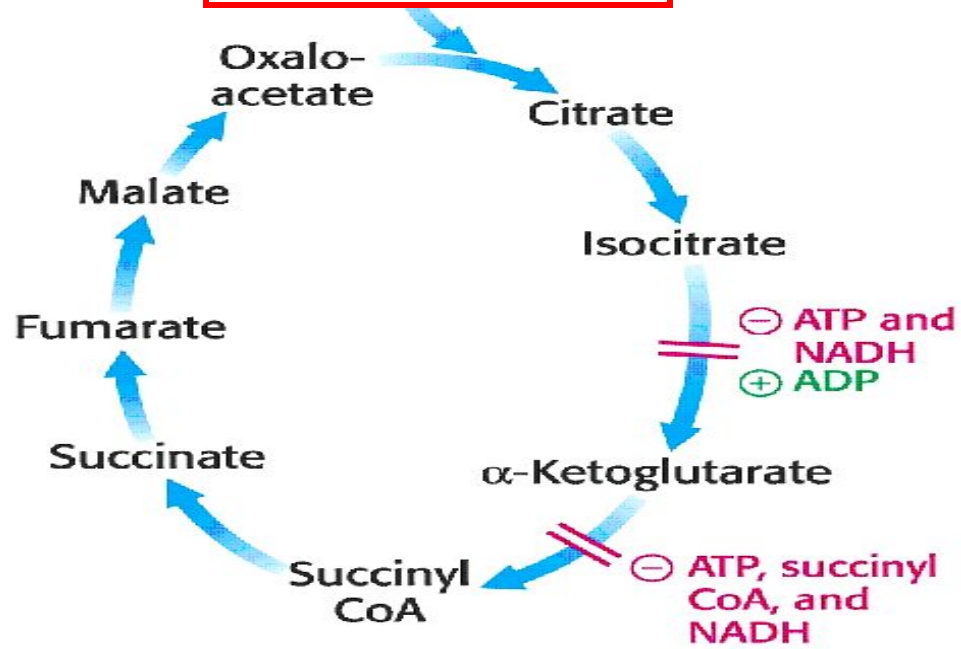
Гликолиз

Амино-
кислоты

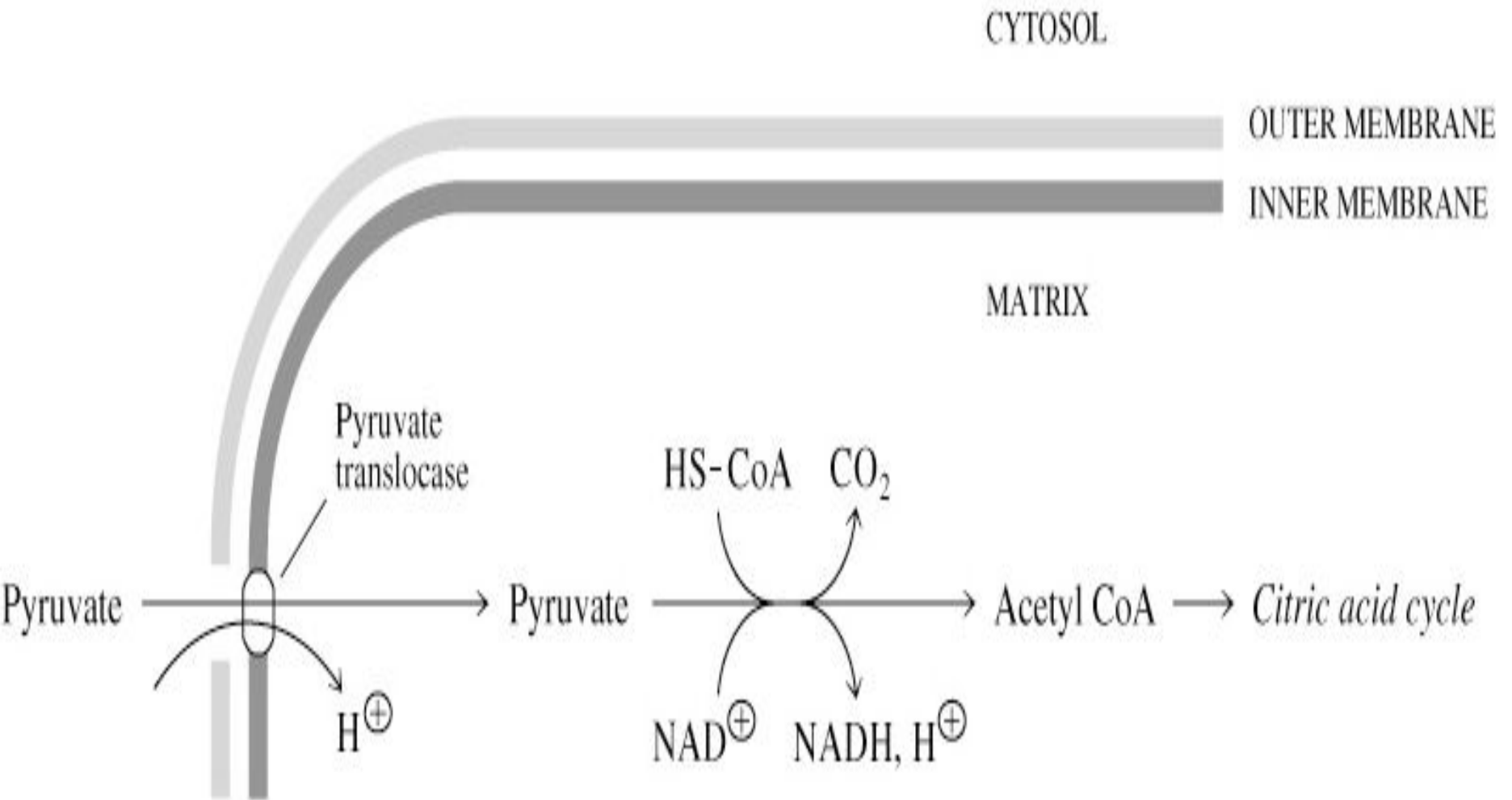
Пируват

Глицерол

Ацетил СоА



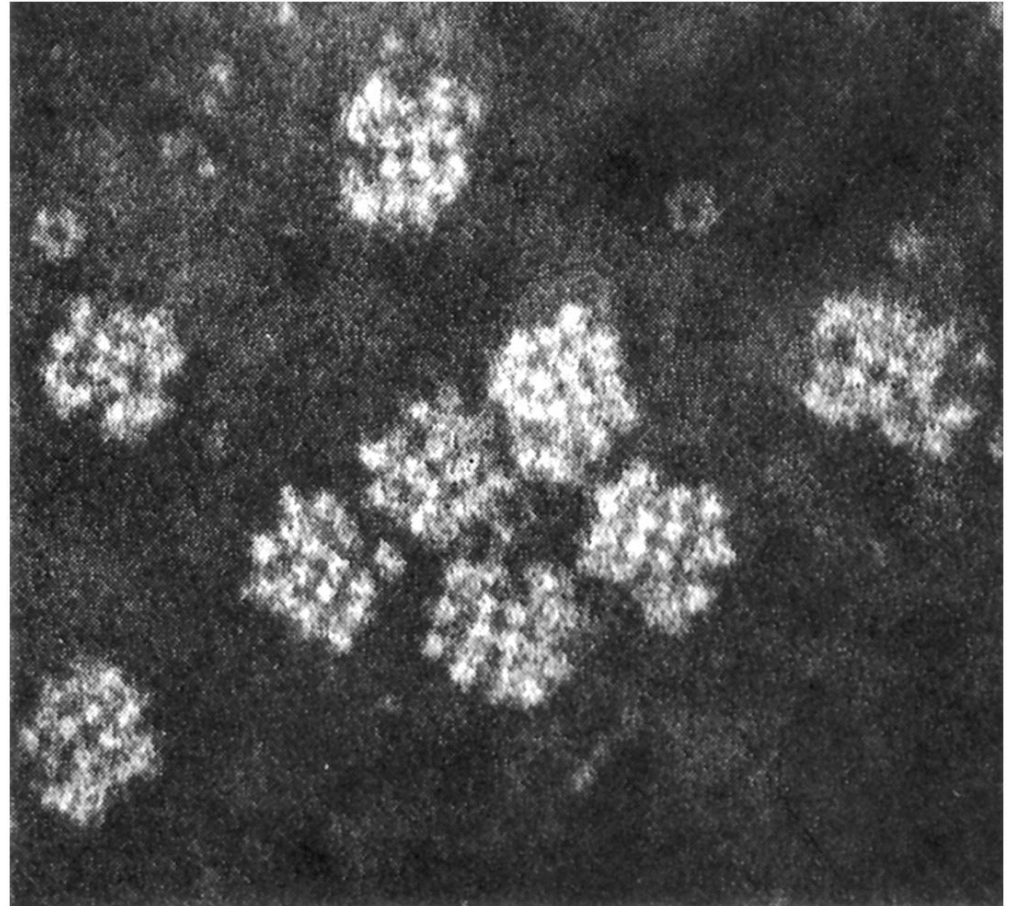
Транспорт пирувата в митохондрию



Преобразование пирувата в ацетил КоА

- **Пируватдегидрогеназный комплекс** - полиферментный 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-CoA, ФАД, НАД+.

ТПФ является производным витамина B₁ (тиамин);

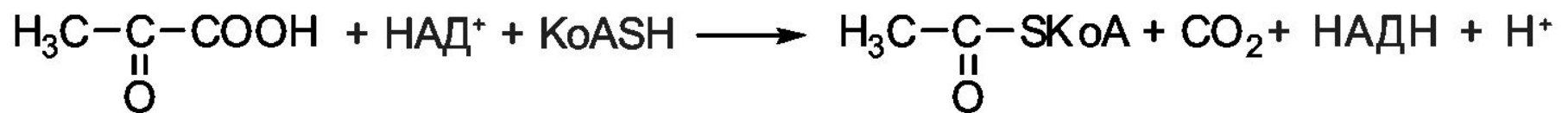
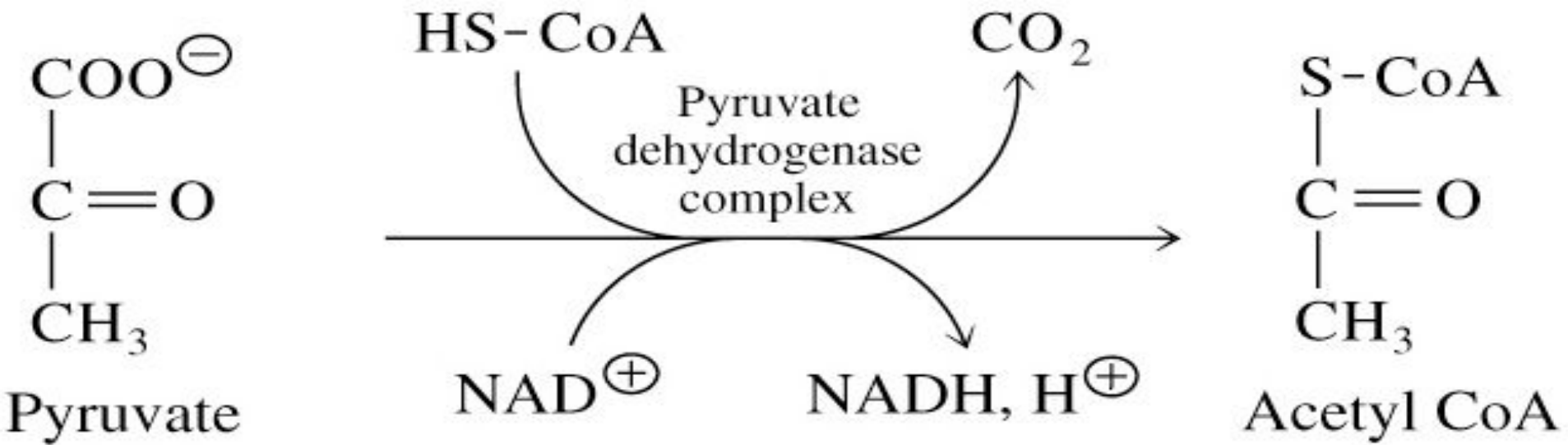
НАД - B₅ (никотинамид);

ФАД - B₂ (рибофлавин),

HS-CoA - B₃ (пантотеновая кислота),

липоамид - липоевая кислота

Общая реакция пируватдегидрогеназного комплекса



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.*



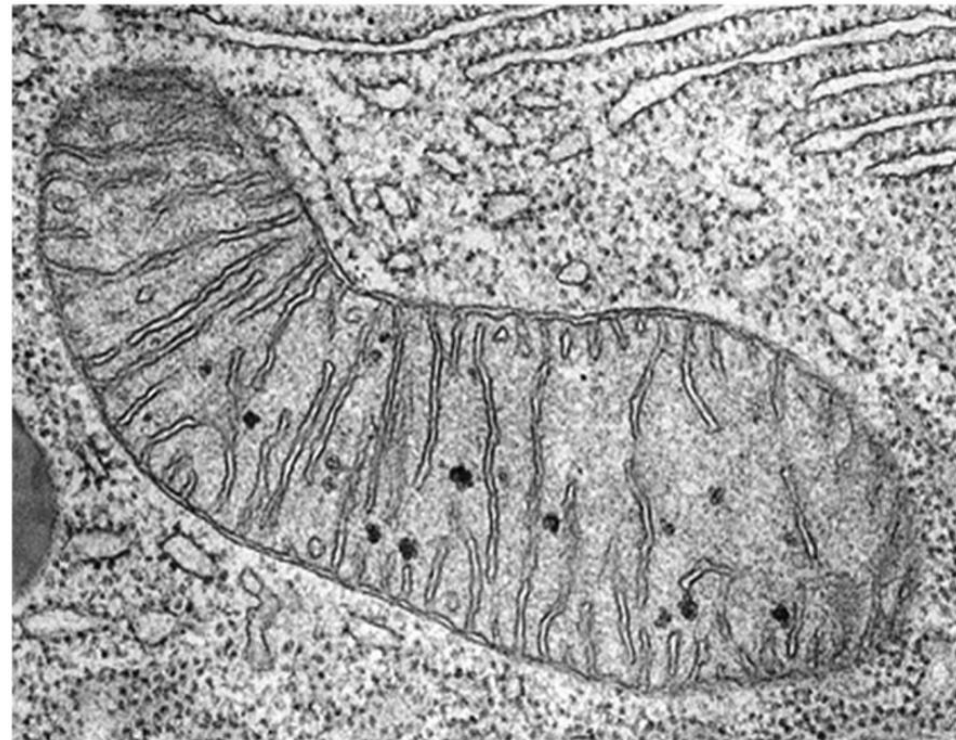
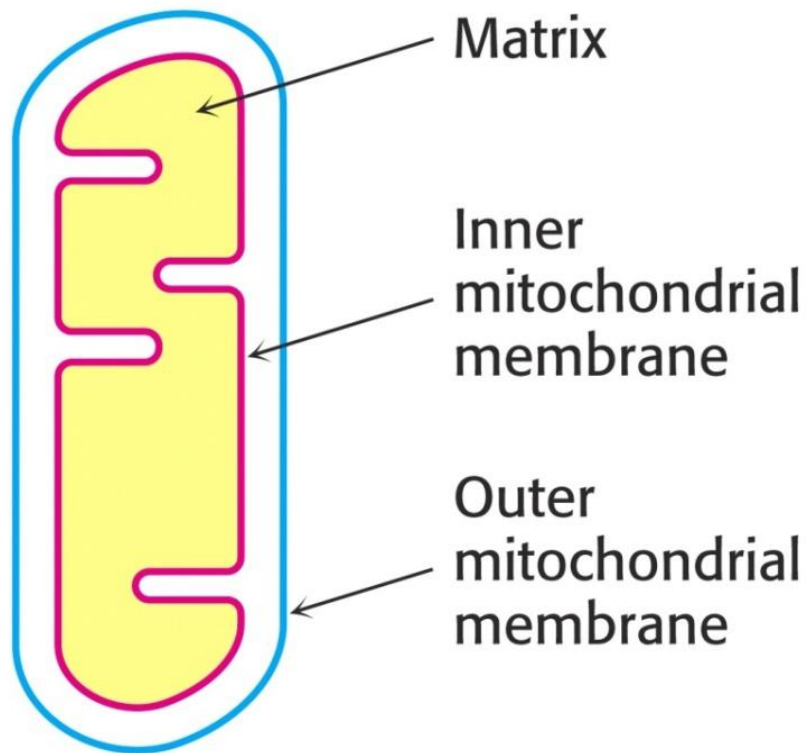
Названия:

Цикл трикарбоновых кислот

Цикл лимонной кислоты

Цикл Кребса

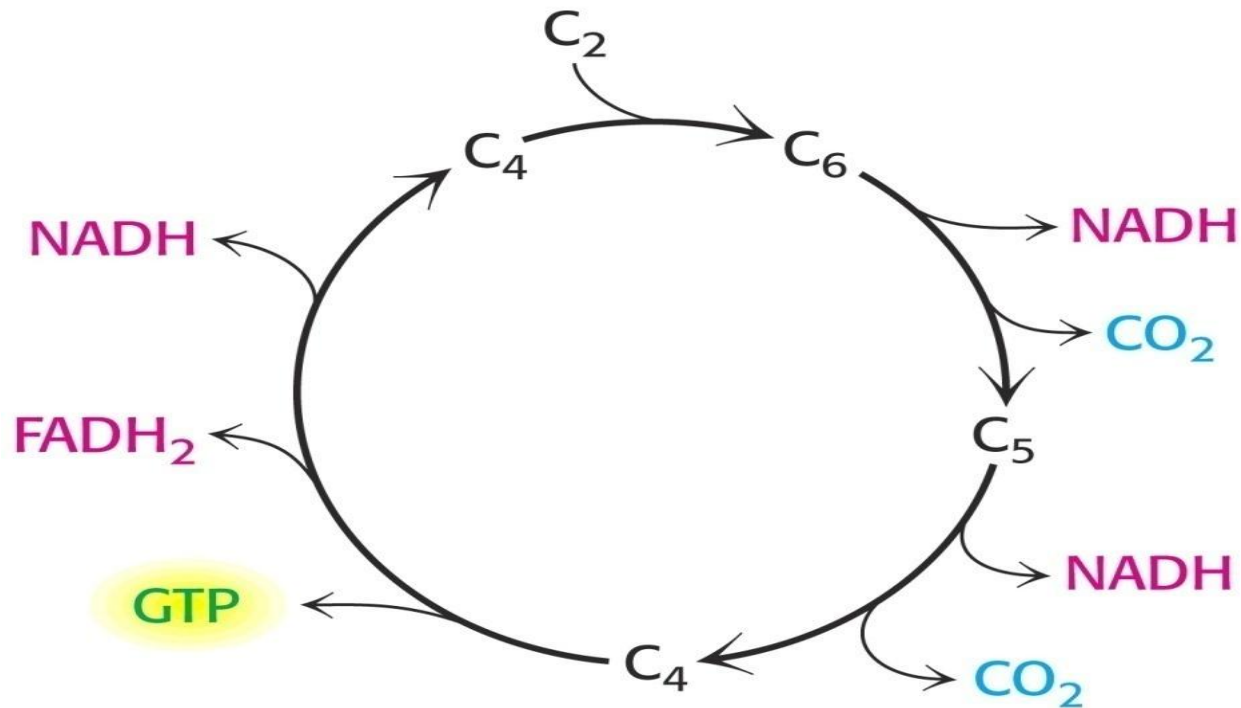
У эукариотов все реакции цикла Кребса проходят в матриксе митохондрий

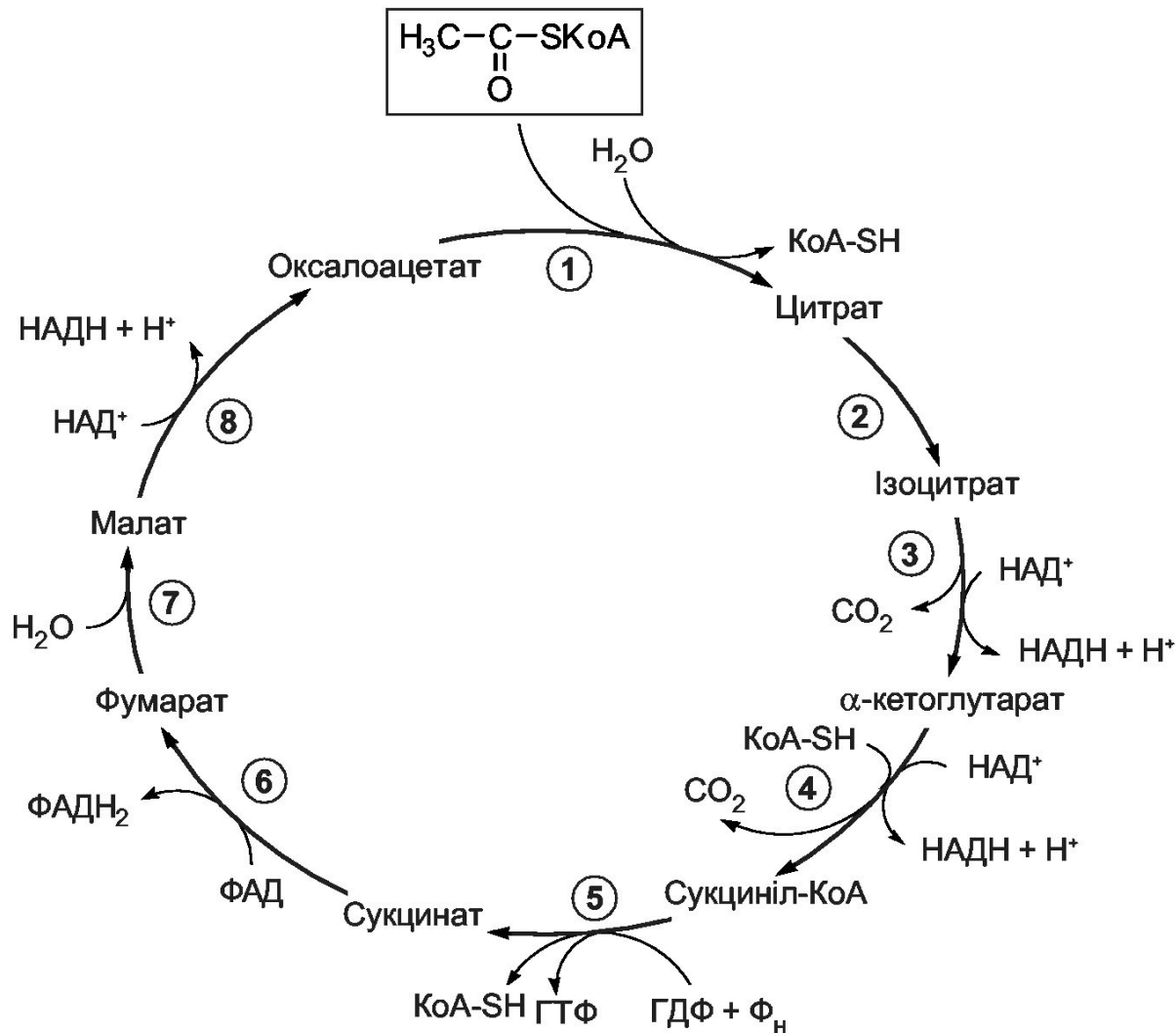


Общие представления о цикле Кребса



Acetyl CoA





Цикл лимонной кислоты.

Ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 — аконитаза; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; 5 — сукцинаттиокиназа; 6 — сукцинатдегидрогеназа; 7 — фумаратгидратаза; 8 — маламдегидрогеназа.

Функции цикла трикарбоновых кислот

- Интеграция метаболизма.
- Цикл является амфиболичным (катаболическим и анаболическим одновременно).
- Образование энергии в форме ГТФ (АТФ).
- Образование восстановительных эквивалентов в форме НАДН и ФАДН₂