

Биохимия ферментов

2

Механизм действия ферментов

Гомельский государственный
медицинский университет

Кафедра биохимии

Доцент кафедры, к. б. н. А. Н. Коваль

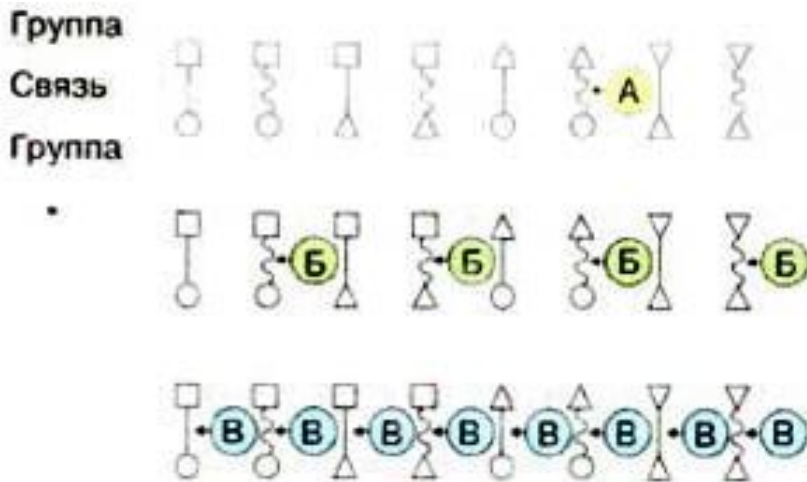
Содержание

- Свойства ферментов (термолабильность, специфичность и др.).
- Механизм действия ферментов. Этапы взаимодействия фермента и субстрата.
- Гипотезы Э. Фишера, Д. Кошланда и современные взгляды.
- Теория промежуточных соединений. Основы термодинамики катализа. Энергия активации. Энергетический барьер.
- Кинетика ферментативных реакций (факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций: природа фермента и субстрата, их концентрация, рН, температура, лекарственные препараты и др.). K_m – определение, физиологическое значение.
- Регуляция активности ферментов. Роль гормонов, цАМФ, активаторов, ингибиторов. Регуляция активности путем химической модификации ферментов (ограниченный протеолиз, фосфорилирование, метилирование и др.). Аллостерическая регуляция и свойства аллостерических ферментов.
- Виды ингибирования.

Свойства ферментов

- Термолабильность – скорость ферментативных реакций зависит от температуры.
- Каждый фермент имеет свой рН-оптимум.
- Активность фермента зависит от концентрации субстратов.
- Специфичность: абсолютная и относительная (групповая).

Действие большинства ферментов высокоспецифично



| | Реакционная специфичность | Субстратная специфичность |
|---|---------------------------|---------------------------|
| А | Высокая | Высокая |
| Б | Высокая | Низкая |
| В | Низкая | Низкая |

- Специфичность
 - к типам каталитических реакций (реакционная специфичность),
 - к природе соединений - субстратов (субстратная специфичность).
- **Высокоспецифичные ферменты (тип А)** катализируют расщепление только одного типа связи в субстратах определенной структуры.
- Ферменты типа Б обладают **ограниченной реакционной специфичностью**, но широкой субстратной специфичностью.
- Ферменты типа В (с **низкой реакционной и низкой субстратной специфичностями**) встречаются редко.

Механизм действия ферментов. Теории «ключ-замок», «рука-перчатка»

- Э. Фишер предложил для объяснения специфичности взаимодействия фермента и субстрата модель «ключа и замка».
 - Эта модель предполагала существование такого центра как особой структуры и без связи с субстратом.
- **Д. Кошленд** в 1959 г. предложил теорию **индуцированного соответствия** («рука-перчатка»): т. е. что субстрат навязывает активному центру свою форму, а активный центр в свою очередь подгоняет форму субстрата под свою собственную.
 - была подтверждена при помощи метода рентгеноструктурного анализа, позволившего построить пространственную модель фермента.

Механизм действия ферментов. Концепции «дыбы» и «лилипутов»

- В 1954 году была предложена гипотеза связывающая механизм ферментативного каталитического акта с деформацией и напряжением молекулы субстрата при ее сорбции в активном центра фермента.
- Эта гипотеза вошла в науку под названием концепции «**дыбы**» или «**лилипутов**».
 - Первое подчеркивало принудительный характер механической деформации гибкого субстрата жестким ферментом.
 - Второе название указывает на то, что слабые нековалентные взаимодействия субстрата и активного центра обеспечивают дестабилизацию субстрата и перевод его в высокоэнергетическое переходное состояние.

Механизм действия ферментов. Современные взгляды

- Современные концепции на механизм ферментативного катализа объединяются в теорию **ТОПОХИМИЧЕСКОГО СООТВЕТСТВИЯ** и объединяют все вышеперечисленные взгляды.

Теория промежуточных соединений

- Выдвинутая в 1913 году Л. Михаэлисом и М. Ментен общая теория ферментативного катализа постулировала, что фермент E сначала обратимо и относительно быстро связывается с со своим субстратом S в реакции:



- Образовавшийся при этом фермент-субстратный комплекс ES , не имеющий аналогий в органической химии и химическом катализе, затем распадается в второй более медленной (лимитирующей) стадии реакции:



Теория промежуточных соединений. Этапы взаимодействия фермента и субстрата

- 1 этап: происходит сближение и ориентация субстрата относительно субстратного центра фермента и его постепенное «причаливание» к «якорной» площадке.
- 2 этап: напряжение и деформация: индуцированное соответствие - происходит присоединение субстрата, которое вызывает конформационные изменения в молекуле фермента приводящие к напряжению структуры активного центра и деформации связанного субстрата.
- 3 этап: непосредственный катализ.

Теория промежуточных соединений.

- Имеется реакция:



- Представим эту реакцию в виде отдельных новых стадий:



подстадии:

1. $E + S = ES$
2. $ES = ES^*$
3. $ES^* = ES^{**}$
4. $ES^{**} = ES^{***}$
5. $ES^{***} = EP$
6. $EP = E + P$

S^* , S^{**} , S^{***} - новые модификации субстрата, обусловленные изменением энергетической плотности, заряда и т. д.

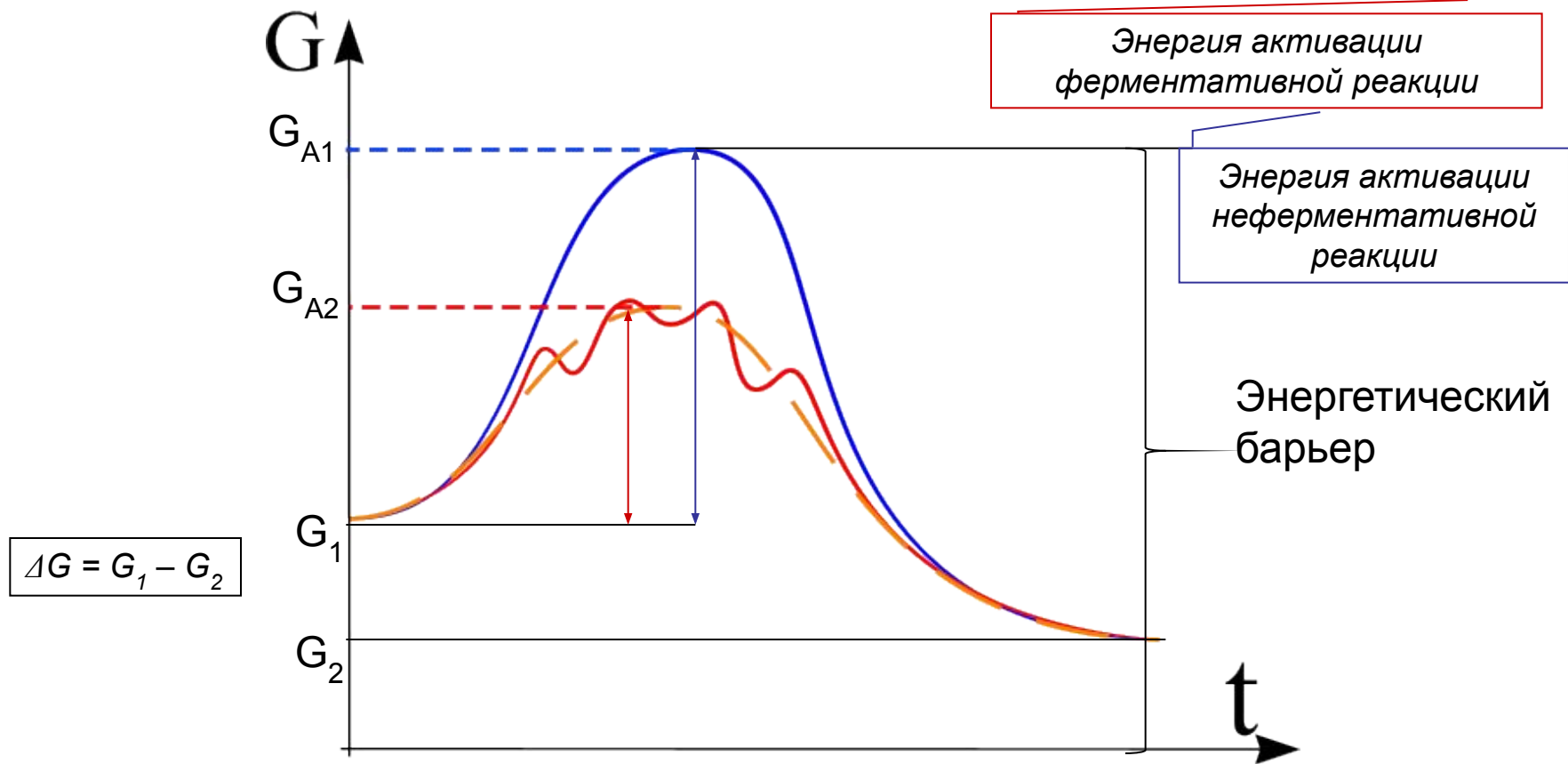
Основы термодинамики катализа

- Из недостаточности чисто статических взаимоотношений в духе «замка и ключа» для объяснения многостадийного каталитического процесса, Д. Кошланд предположил, что с термодинамической точки зрения ферменты ускоряют химические реакции за счет **снижения энергии активации.**

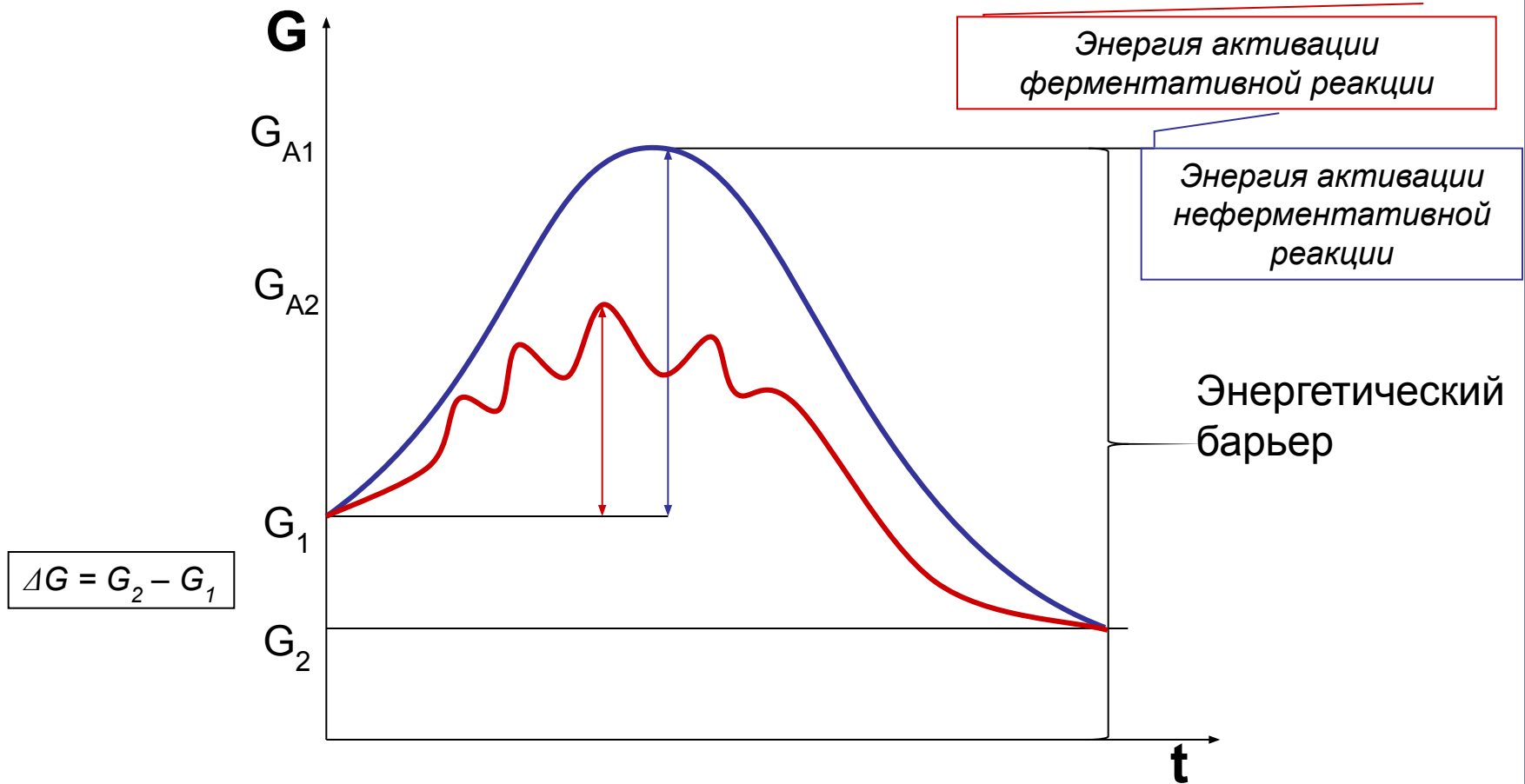
Энергия активации.

- **Энергия активации** - энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активное состояние при данной температуре, т. е. это та энергия, которая необходима молекуле, чтобы преодолеть **энергетический барьер**.
 - Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционно-способными на более низком энергетическом уровне, т. е. снижается и энергетический барьер.

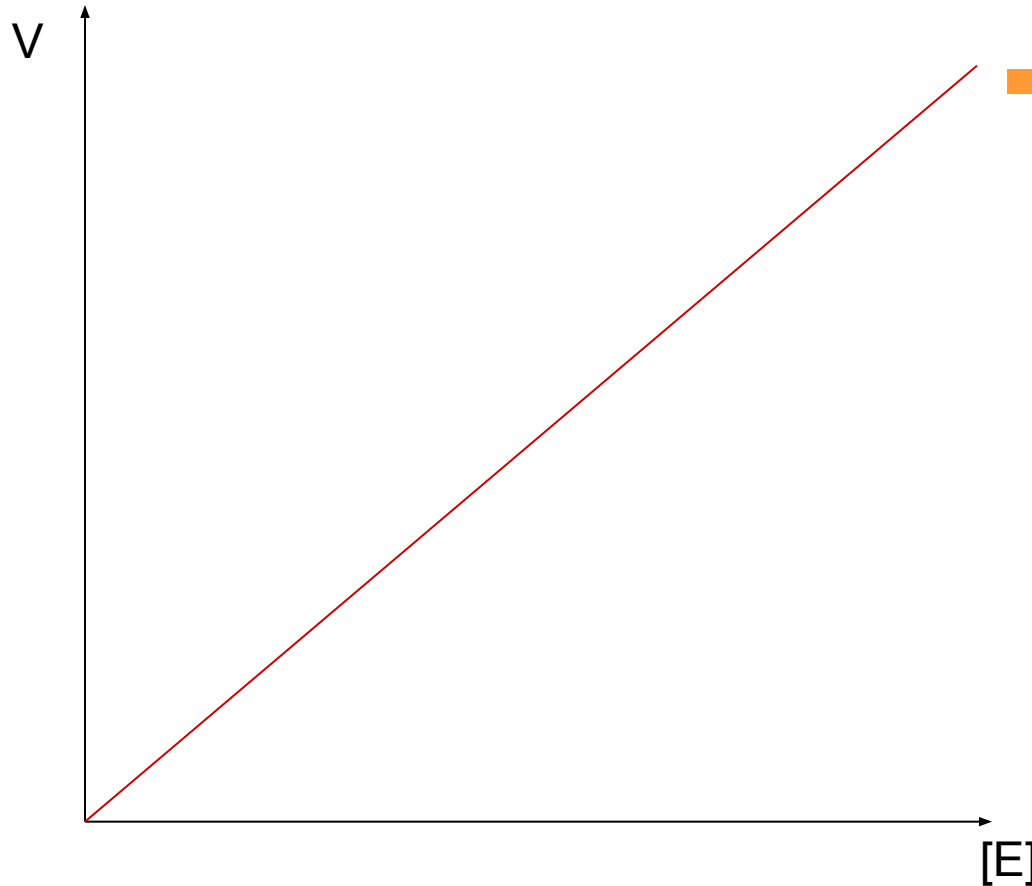
Термодинамика ферментативных реакций



Термодинамика ферментативных реакций

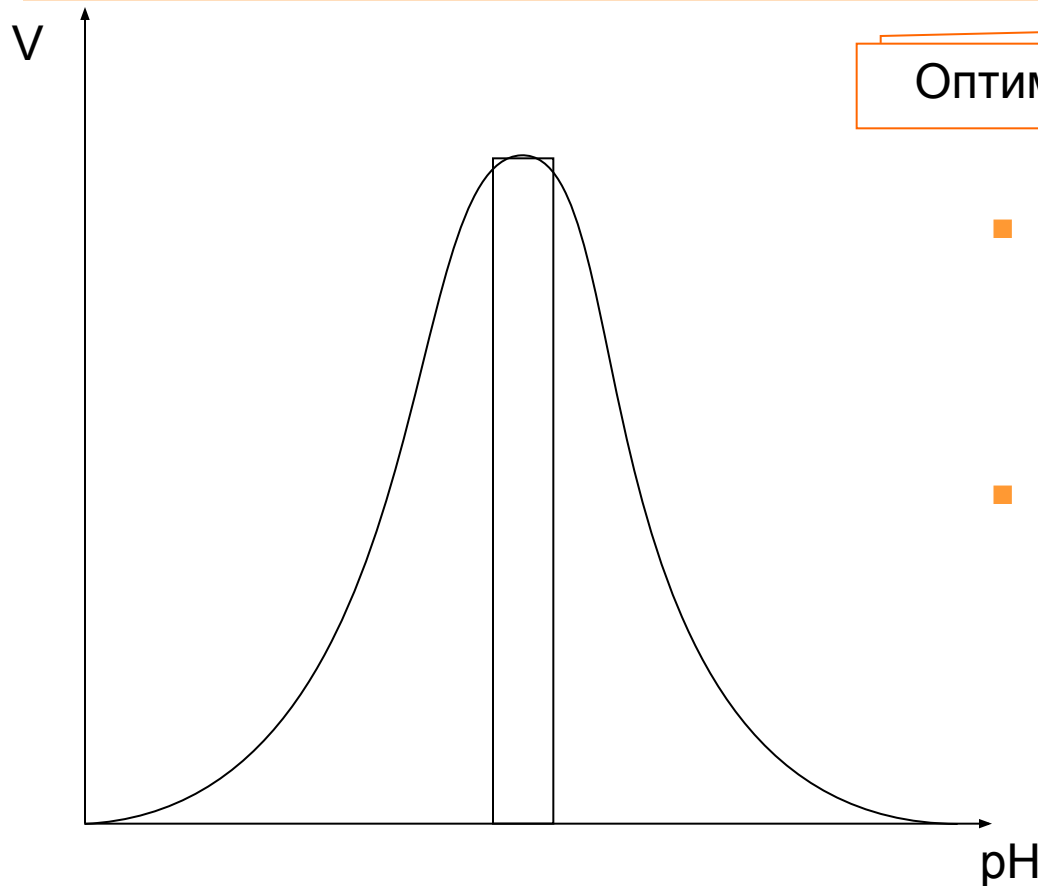


Кинетика ферментативных реакций. Концентрация фермента.



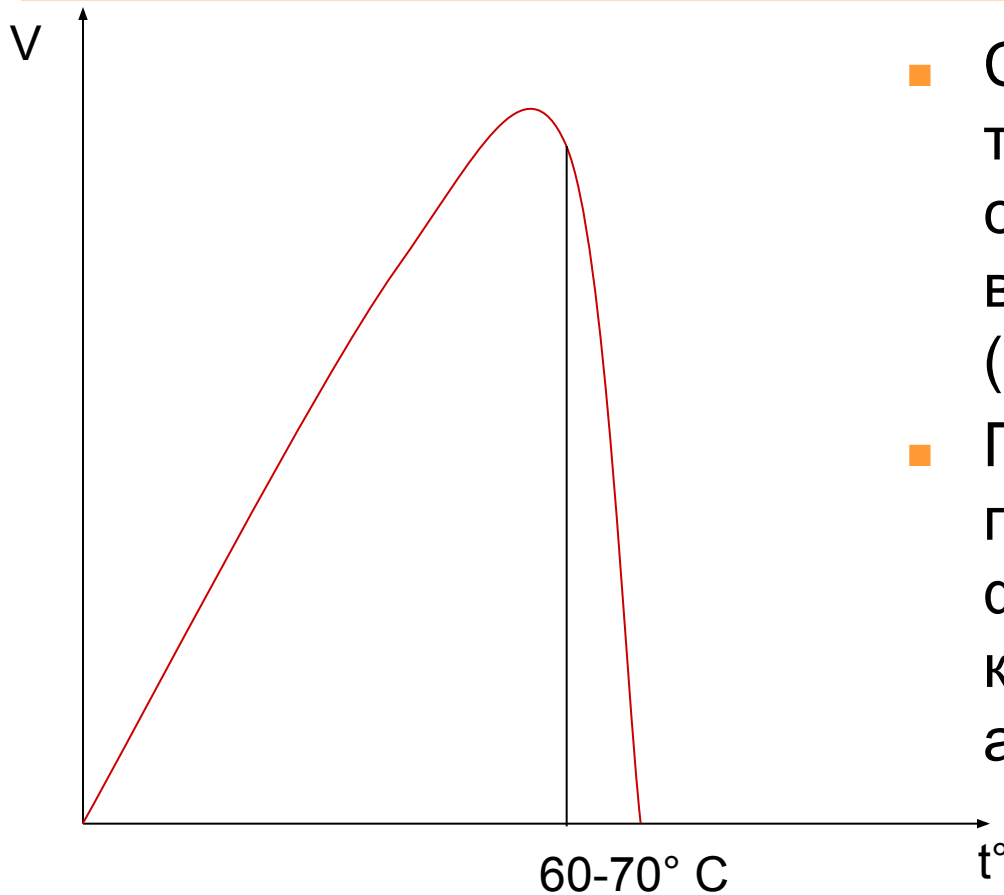
- Чем выше концентрация E , тем выше скорость реакции.

Кинетика ферментативных реакций. рН



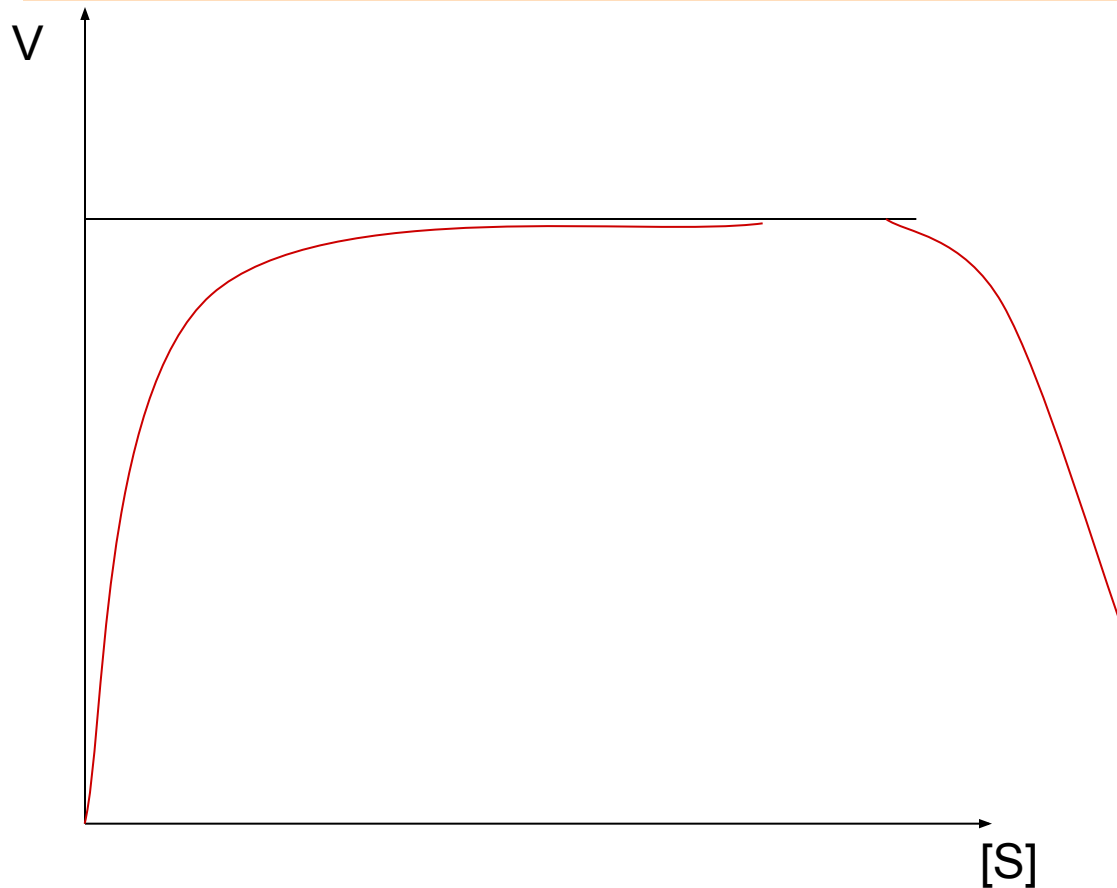
- Для каждого фермента существует оптимальная область рН (6,9 – 7,0 для большинства ферментов).
- Сдвиг рН приводит к изменению
 - Поверхностного заряда фермента
 - Степень ионизации активного центра и субстрата.

Кинетика ферментативных реакций. Температура



- С увеличением температуры на 10°C скорость реакции возрастает в 2 раза (правило **Вант-Гоффа**).
- После $60-70^\circ \text{C}$ происходит денатурация фермента с потерей его каталитической активности.

Кинетика ферментативных реакций. Концентрация субстрата



- Для простых ферментов график имеет вид гиперболы и описывается уравнением **Михаэлиса-Ментен**.
- При очень высоких концентрациях субстрата наступает субстратное ингибирование

Кинетика ферментативных реакций

- Исследование зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации реагирующих веществ стало одним из главных путей изучения механизма действия ферментов.
- В 1905 году французский исследователь Генри впервые высказал ряд предположений, которые были экспериментально подтверждены в 1913 году Леонором Михаэлисом и Мод Ментен (США, Канада).

