

Ферменты-2

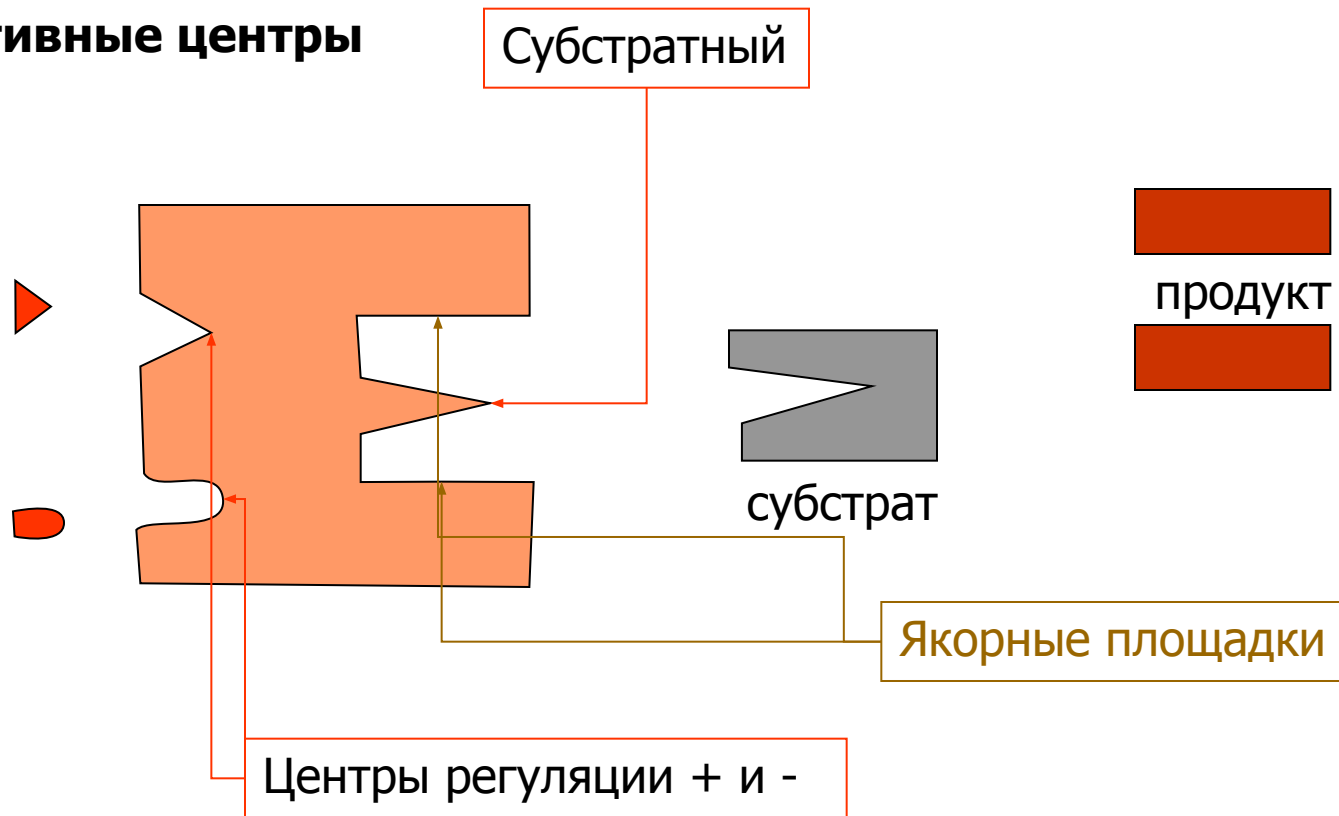
Содержание:

1. Механизм действия ферментов. Этапы ферментативного катализа.
2. Факторы, определяющие активность ферментов $[E]$, $[S]$, K_m .
3. Влияние pH , $[P]$, t° , ионной силы на активность ферментов.
4. Регуляция активности ферментов

- 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:
 - **$E + S = ES$**
 - 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:
 - **$ES = E + P$**

Структурно-функциональная организация ферментов. Схема

Активные центры



Структурно-функциональная организация ферментов.

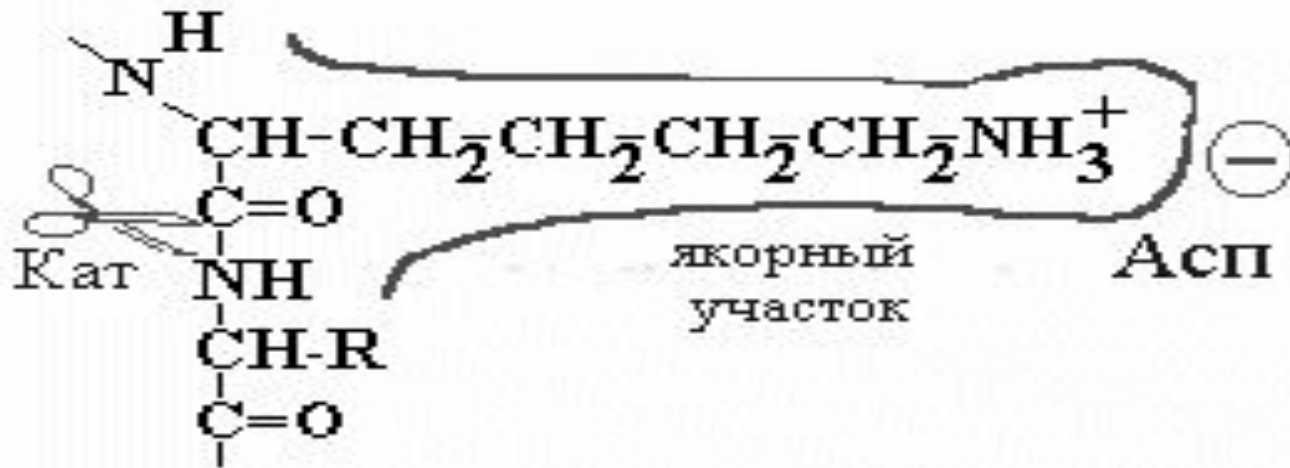
- **Активный (субстратный) центр** - это совокупность функциональных групп, расположенных в разных участках ПП цепи, но близко структурно и функционально ориентированных (в третичной структуре) и имеющих прямое отношение к катализу.
- Этот центр состоит из функциональных групп и радикалов: SH-(цистеина); -ОН(серина); COOH-(АСП); имидазольного кольца гистидина.

- **Активный центр включает в себя:**
 1. **Каталитический участок** или центр, непосредственно взаимодействующий с субстратом, осуществляющий катализ.
 2. **Контактная, или якорная площадка** - она обеспечивает специфическое сродство фермента к субстрату и является местом фиксации субстрата на поверхности фермента.
 3. **Вспомогательные участки** - карманы, щели и др.

- *1 этап:* постепенное «причаливание» S к «якорной» площадке F.
- *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.

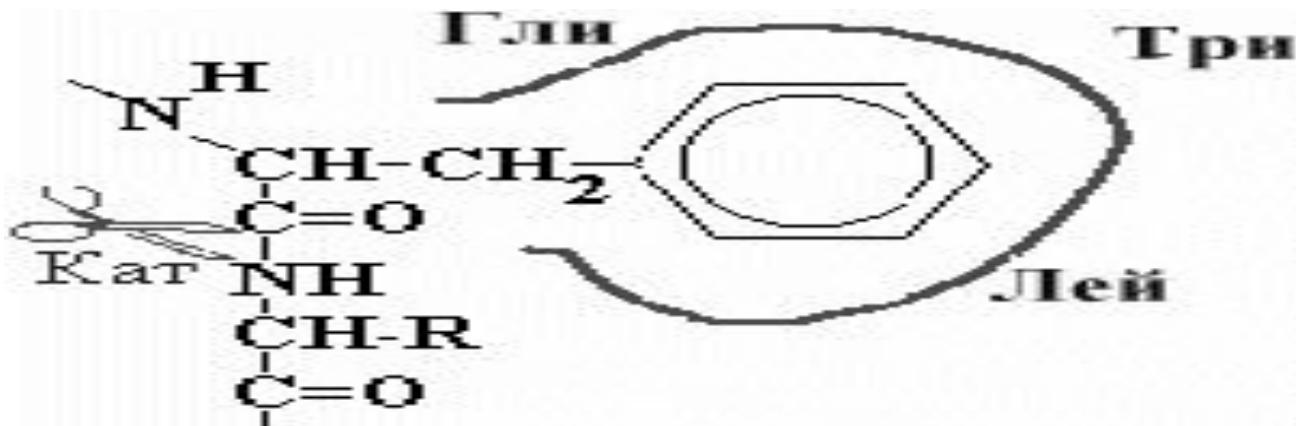
- Химические связи, действующие при этом:
- 1. Силы Ван дер Ваальса
- 2. Электростатическое взаимодействие
- 3. Водородные связи
- 4. Гидрофобные взаимодействия

- Якорный участок трипсина представлен длинным узким карманом с отрицательно заряженный Асп в глубине кармана. В этой карман легко проникают аминокислоты, имеющие длинную боковую цепь с положительным зарядом на конце; такими аминокислотами являются Лиз или Ар, которые хорошо связываются и распознаются, а гидролиз происходит на соседней пептидной связи.



- В гидрофобном кармане, образованном радикалами Гли, Три и Лей, химотрипсина располагается боковая цепь с ароматическим кольцом (Фен, Тир или Три)..

Пептидная связь образованная СООН группой ароматической аминокислоты устанавливается рядом с каталитическим участком химотрипсина



- **В основе химических реакций лежит образование и разрыв химических связей**
- По характеру разрыва ковалентных связей различают три типа реакций
- **1. Гетеролитический разрыв связи: 2. Гомолитический разрыв связи:**
- **Согласованные реакции отличаются от гомолитических и гетеролитических тем, что разрыв старых связей и образование новых происходит одновременно без образования новых радикалов и ионов.**

Биологически важными нуклеофилами являются -NH^2 , -OH , -SH , и имидазольные группы аминокислот. Нуклеофильные формы этих групп одновременно являются основаниями. Связываясь с H^+ , они как основания, реагируют с электрондефицитными центрами – т.к. они нуклеофилы.

- **Электрофильные реагенты :**

Наиболее известными электрофилами в биохимических реакциях являются H^+ , ионы Me , углерод карбонильной группы.

- Группы радикалов аминокислот – плохие электрофилы

- По направлению реакций с учетом конечного результата можно выделить следующие типы реакций
- **1. Окислительно-восстановительные.**
Многие окислительно-восстановительные реакции в клетке включают разрыв C-H связи с отнятием у атома углерода двух электронов и переносе их на акцептор, роль которого могут выполнять коферменты. Конечный акцептор электронов у аэробных организмов кислород, представляющий бирадикал с двумя неспаренными электронами

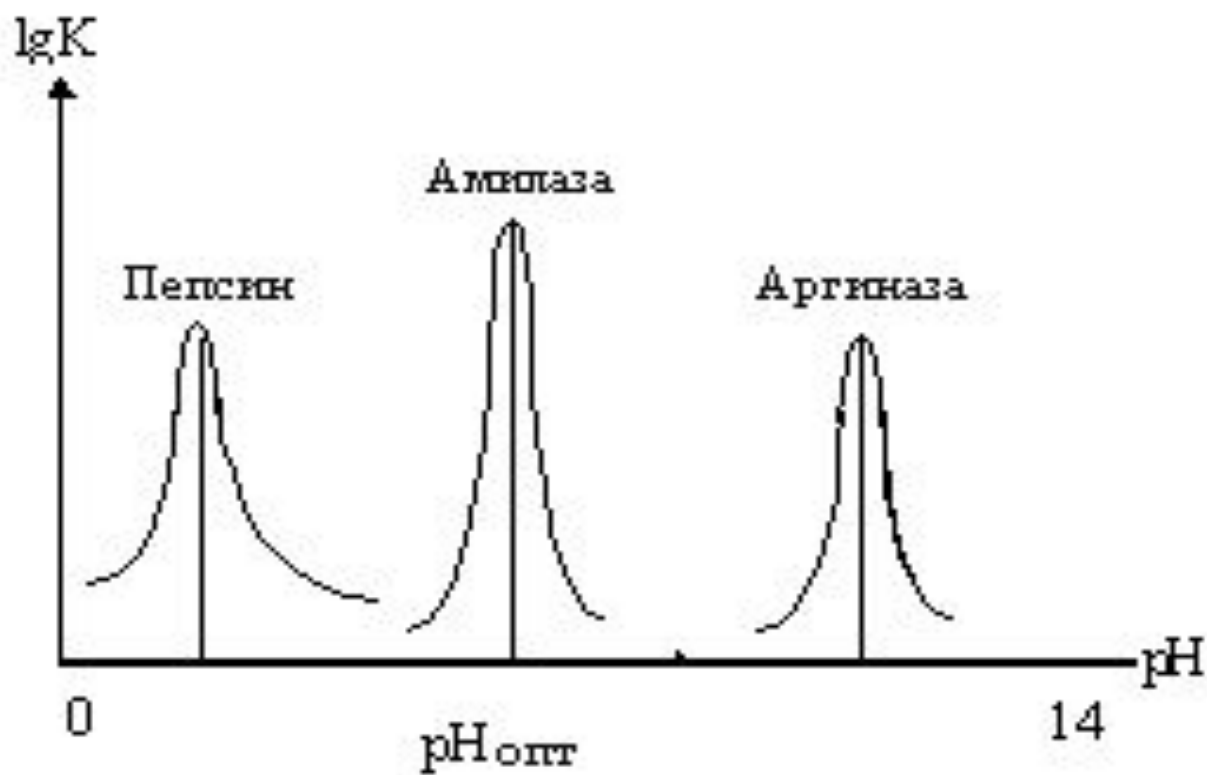
- **2. Реакции кислотно-основного взаимодействия**
- **3. Реакции замещения**
- **4. Реакции отщепления**
- **5. Реакции перегруппировки**
- **6. реакции, сопровождающиеся образованием двойной связи**

- Факторы, определяющие активность ферментов $[E]$, $[S]$, $[P]$, K_m .
- Влияние pH , $[P]$, t° , ионной силы на активность ферментов.

- Существенное влияние на активность ферментов оказывает реакция среды. Для проявления их оптимального действия чаще всего существует узкий диапазон измерения рН среды (рН-оптимум).

- В некоторых случаях сдвиг pH на единицу снижает активность фермента на 80%. Поэтому в экспериментальных условиях работы с ферментом очень важно поддерживать pH на постоянном уровне.

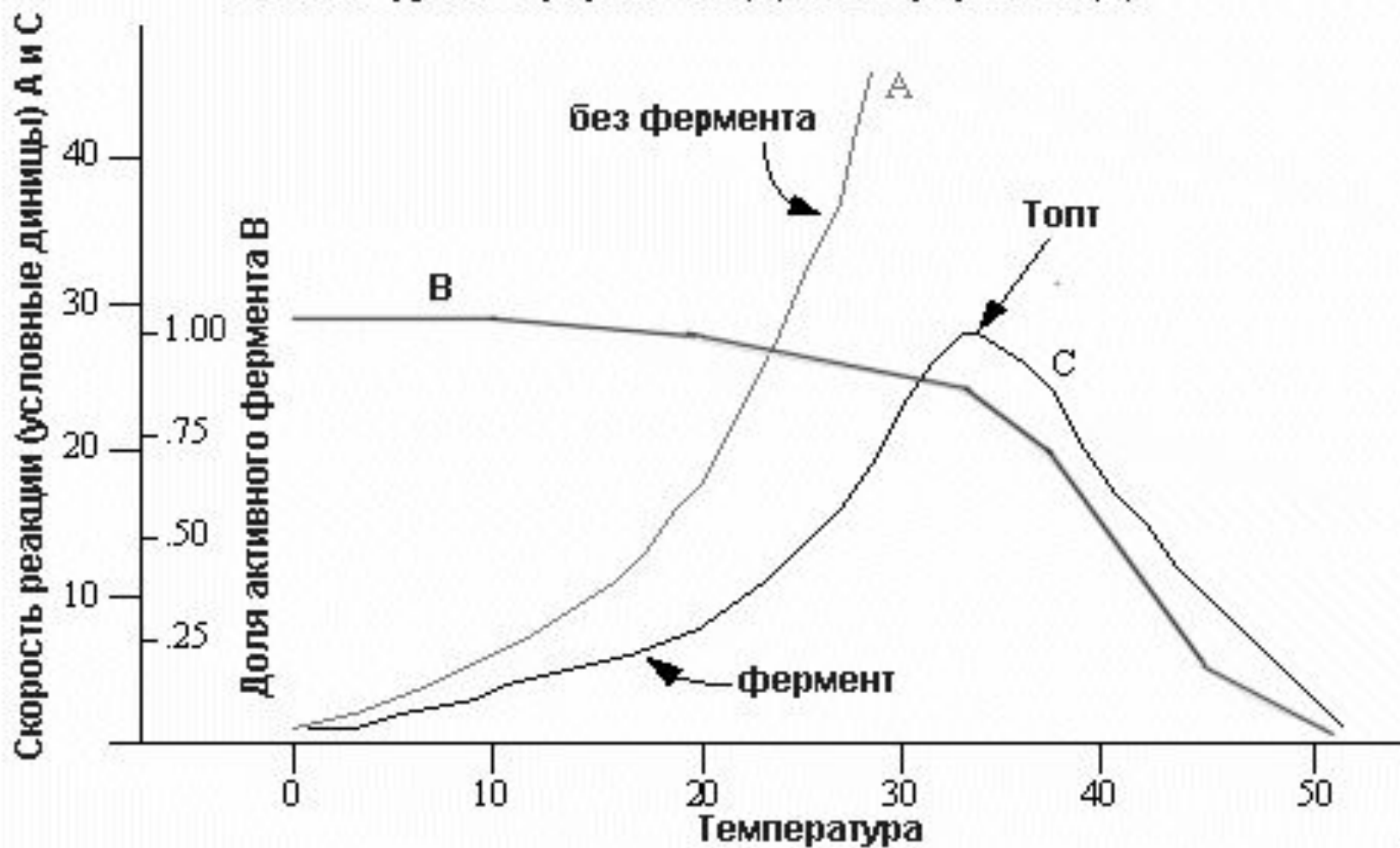
Оптимум рН



Фермент	pH
Липаза (подж.железа)	8.0
Липаза (желудок)	4.0-5.0
Липаза(касторовое масло)	4.7
Пепсин	1.5-1.6
Трипсин	7- 8
Уреаза	7.0
Инвертаза	4.5
Мальтаза	6.1-6.8
Амилаза (подж.железа)	6.7-7.0
Амилаза (солод)	4.6-5.2
Каталаза	7.0

Влияние температуры

Влияние температуры на скорость реакции катализируемой ферментом (С) и без фермента (А)



- Так как все ферменты являются белками, а белки при температуре выше $40-50^{\circ}\text{C}$ в большинстве своем необратимо изменяются, температурный интервал для работы ферментов ограничивается определенными пределами..

- Активность фермента повышается при повышении температуры. Начиная с определенной температуры, совпадающей с началом денатурации белка, активность фермента падает.

Специфичность ферментов

- Специфичность у разных ферментов может проявляться по-разному. Ферменты как белки, построены из L-аминокислот и эта особенность придает ферментам **стереохимическую специфичность**. Такие ферменты взаимодействуют и катализируют превращения только одного из стереических или оптических изомеров субстрата. Например, одни оксидазы аминокислот избирательно действуют на L-аминокислоты, а другие только на D-аминокислоты

- Правда, лишь небольшая часть ферментов обладает **абсолютной специфичностью**, т.е. катализирует превращение только одного субстрата. Чаще всего ферменты обладают **групповой специфичностью**. Это означает, что они действуют на группу субстратов, предъявляя требования к типу группы и типу связи— **абсолютная групповая** специфичность или только к типу связи — **относительная групповая** специфичность.

Регуляция активности ферментов

- Регуляция активности ферментов **бывает пассивная** (с помощью изменения условий среды) т. е. есть постоянные ферменты и непостоянные, которые появляются под действием каких-либо факторов среды. (Под действием температуры или с помощью ионной силы и рН, [S], [E]).

Активная регуляция:

- **изостерическая;**(изос- равный) регуляция с помощью субстрата (S)и продукта (P) реакции.
- **аллостерическая** регуляция(allos- другой) активности фермента с помощью веществ, отличных от S и P.

- **Регуляция путем изменения количества фермента.**
- У бактерий хорошо изучен феномен индуцированного синтеза ферментов при выращивании на средах с одним углеводом, например, глюкозой.

- Замена глюкозы на лактозу приводит к индуцированному синтезу фермента галактозидазы, расщепляющей лактозу на глюкозу и галактозу.

- В животных тканях подобный быстрый синтез ферментов наблюдается реже, однако при поступлении в организм некоторых ядов, канцерогенных веществ, алкалоидов наблюдается резкое увеличение количества (а значит и активности) гидроксилаз, окисляющих чужеродные вещества в нетоксичные продукты.

- С другой стороны, иногда под действием этих гидроксилаз чужеродные вещества превращаются в более токсичные продукты (летальный синтез)

- **Регуляция активности по принципу обратной связи.**

Допустим в клетке есть многоступенчатый биосинтетический процесс, каждая стадия которого катализируется собственным ферментом:

- E1 E2 E3 E4

- **A → X → B → V → Г ... Р**

Накопление продукта Р оказывает мощное ингибирующее действие на фермент E1.

Аллостерическая регуляция.

Аллостерические ферменты - это ферменты, располагающиеся в начале метаболического потока или на его узловых этапах и управляют этим метаболическим потоком.

Свойства аллостерических ферментов:

1. Являются олигомерами состоящими из протомеров.
2. Имеют как минимум два центра: активный центр и центр аллостерической регуляции.
3. Имеют ось симметрии.
4. Протомеры изменяют свою структуру в пределах олигомеров.
5. Изменение конформации олигомеров ограничено конформациями отдельных протомеров.

Существует 2 вида веществ (эфффекторы), которые оказывают на фермент двойное действие:

1) активаторы;

2) ингибиторы.

Аллостерический фермент имеет **2** центра аллостерической регуляции : -
центр аллостерической активации
- центр аллостерического ингибирования.

- При взаимодействии аллостерического фермента с аллостерическим активатором резко возрастает степень сродства фермента к субстрату, точнее возрастает степень сродства активного центра к субстрату.
- При взаимодействии аллостерического ингибитора с аллостерическим ферментом, резко понижается степень сродства фермента к субстрату.

- Кинетика ферментативных реакций

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.

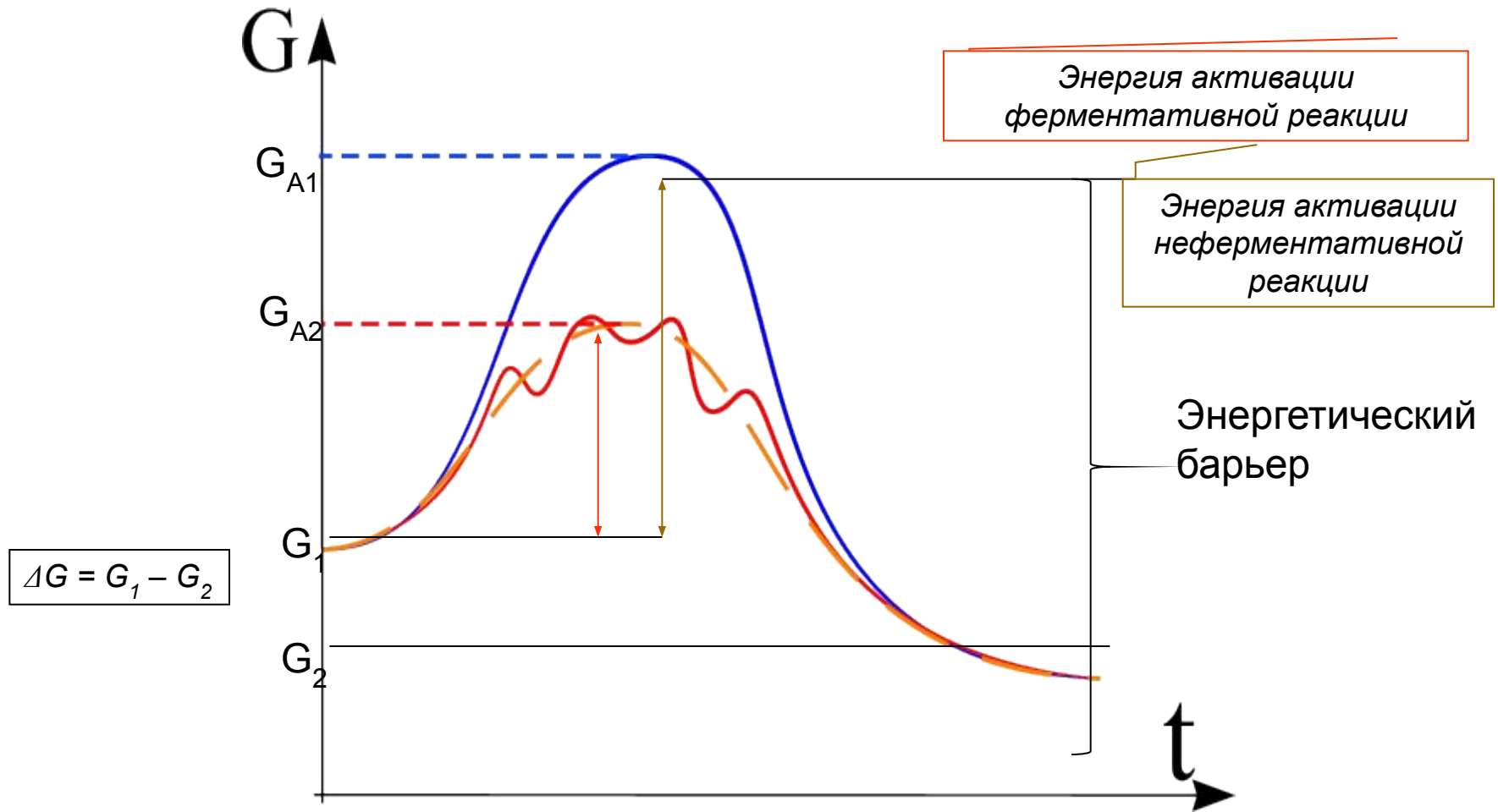
Основы термодинамики катализа

- Д. Кошланд предположил, что с термодинамической точки зрения ферменты ускоряют химические реакции за счет **снижения энергии активации.**

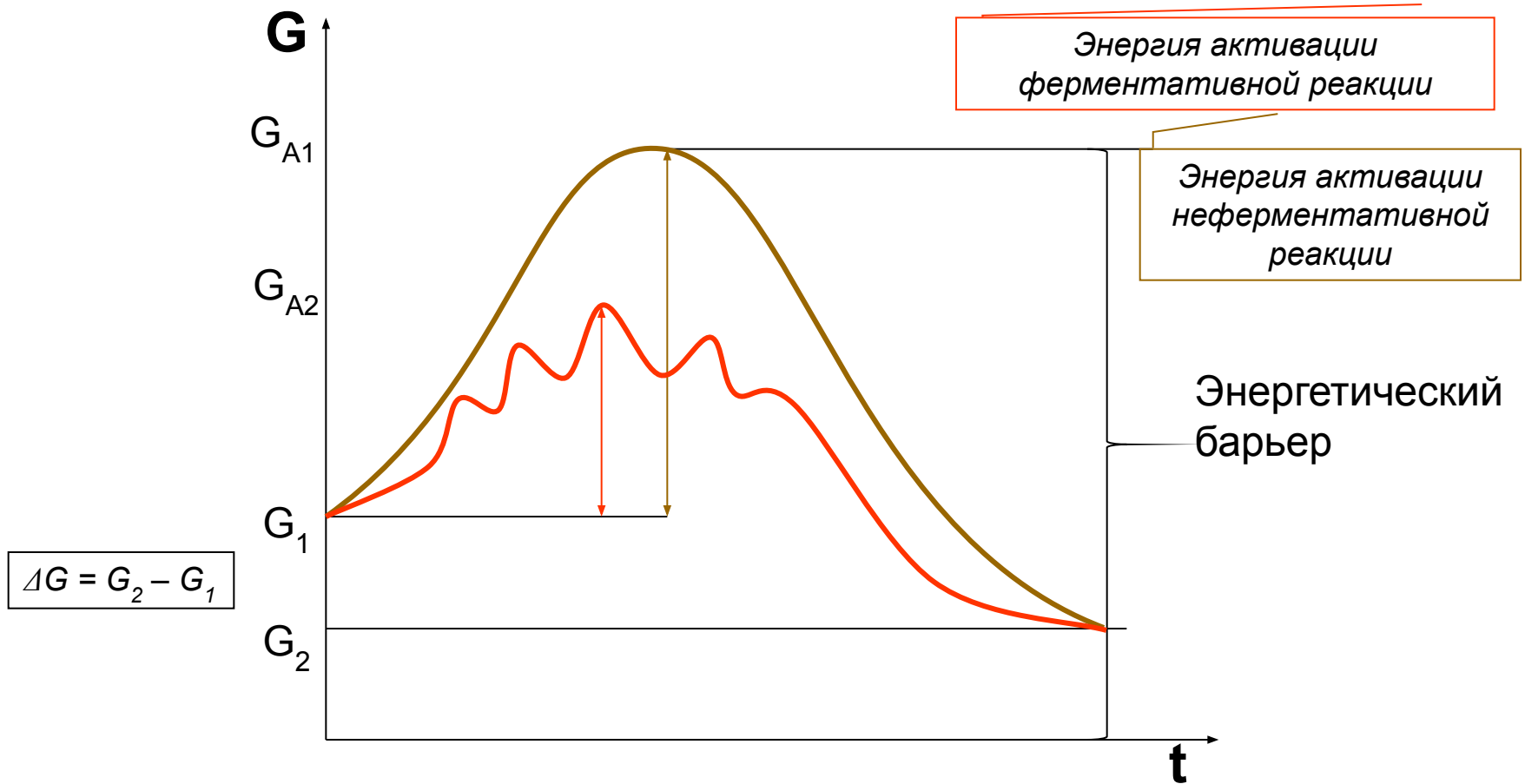
Энергия активации

- **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.

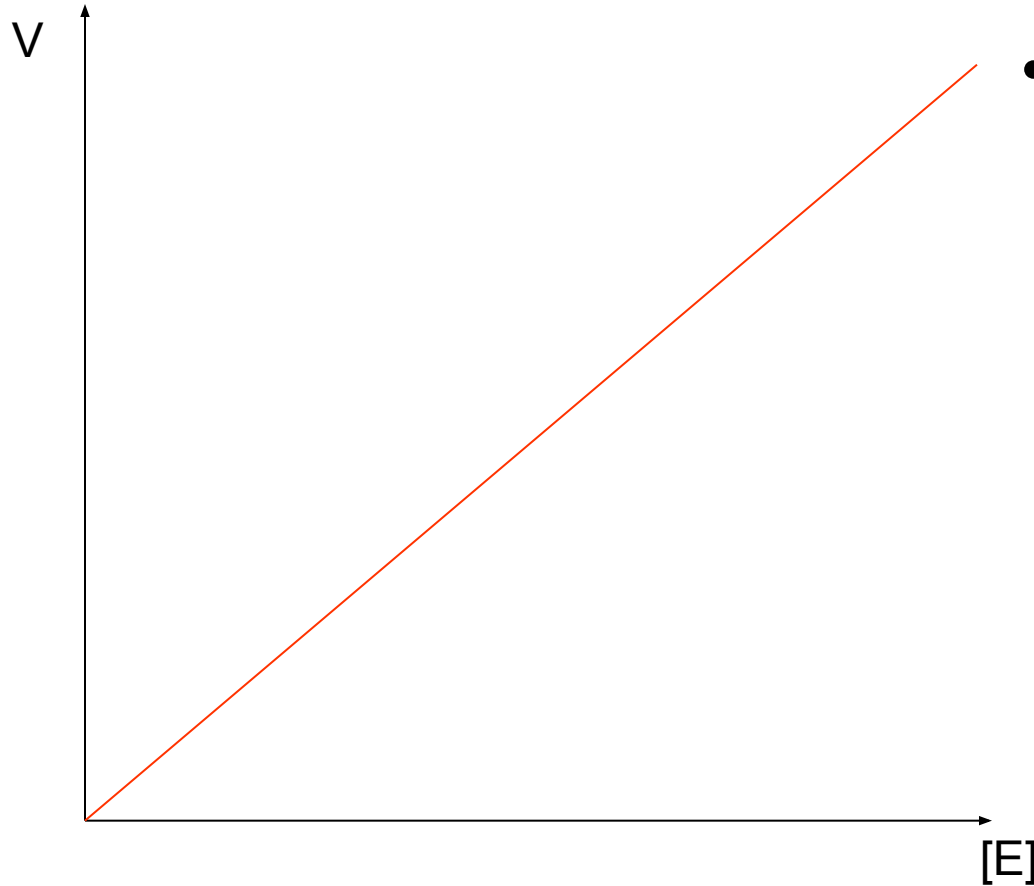
Термодинамика ферментативных реакций



Термодинамика ферментативных реакций

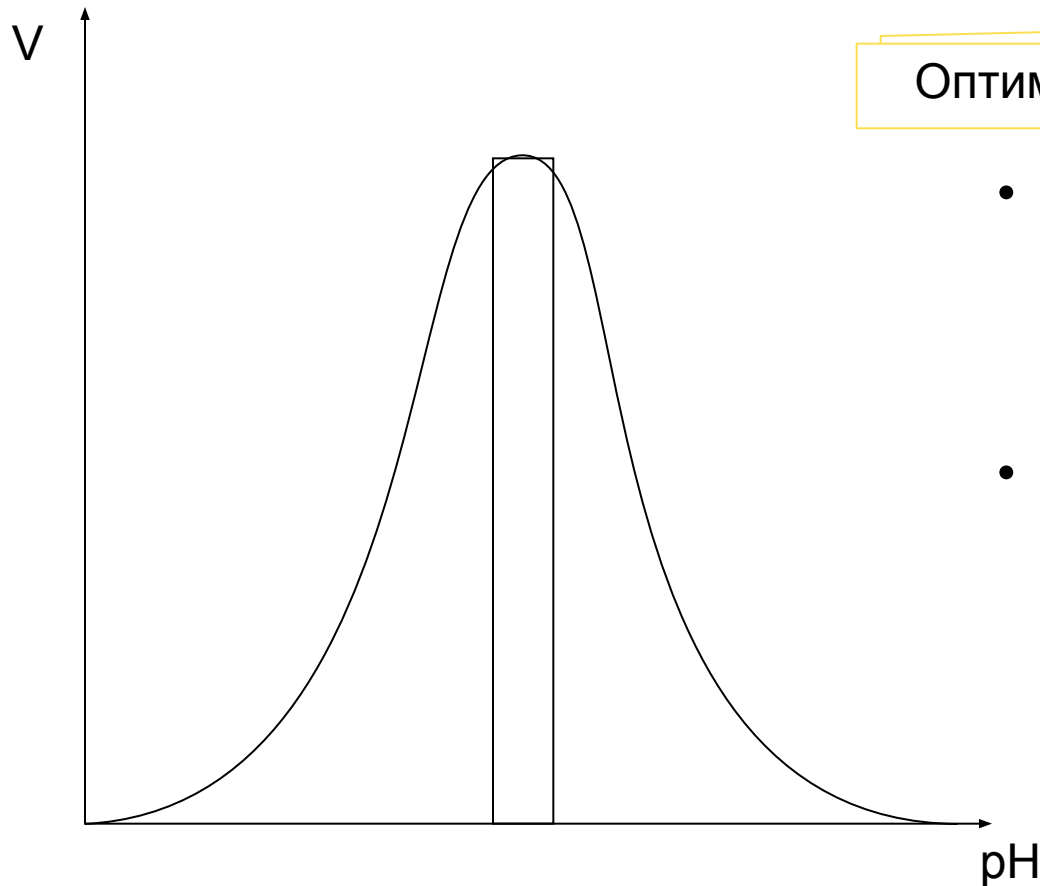


Кинетика ферментативных реакций. Концентрация фермента.



- Чем выше концентрация E , тем выше скорость реакции.

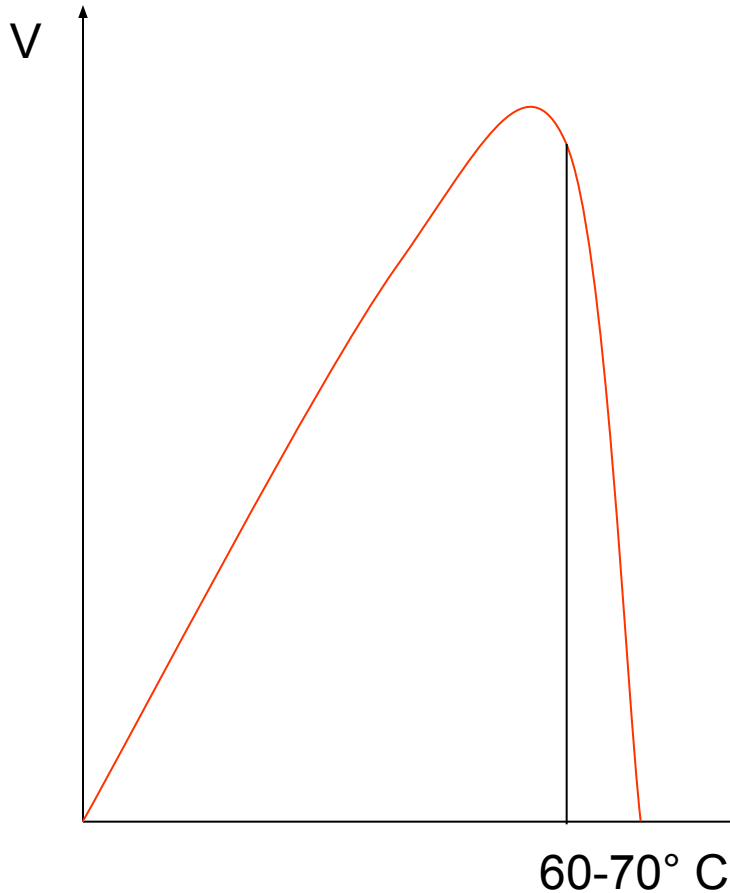
Кинетика ферментативных реакций. рН



Оптимум 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

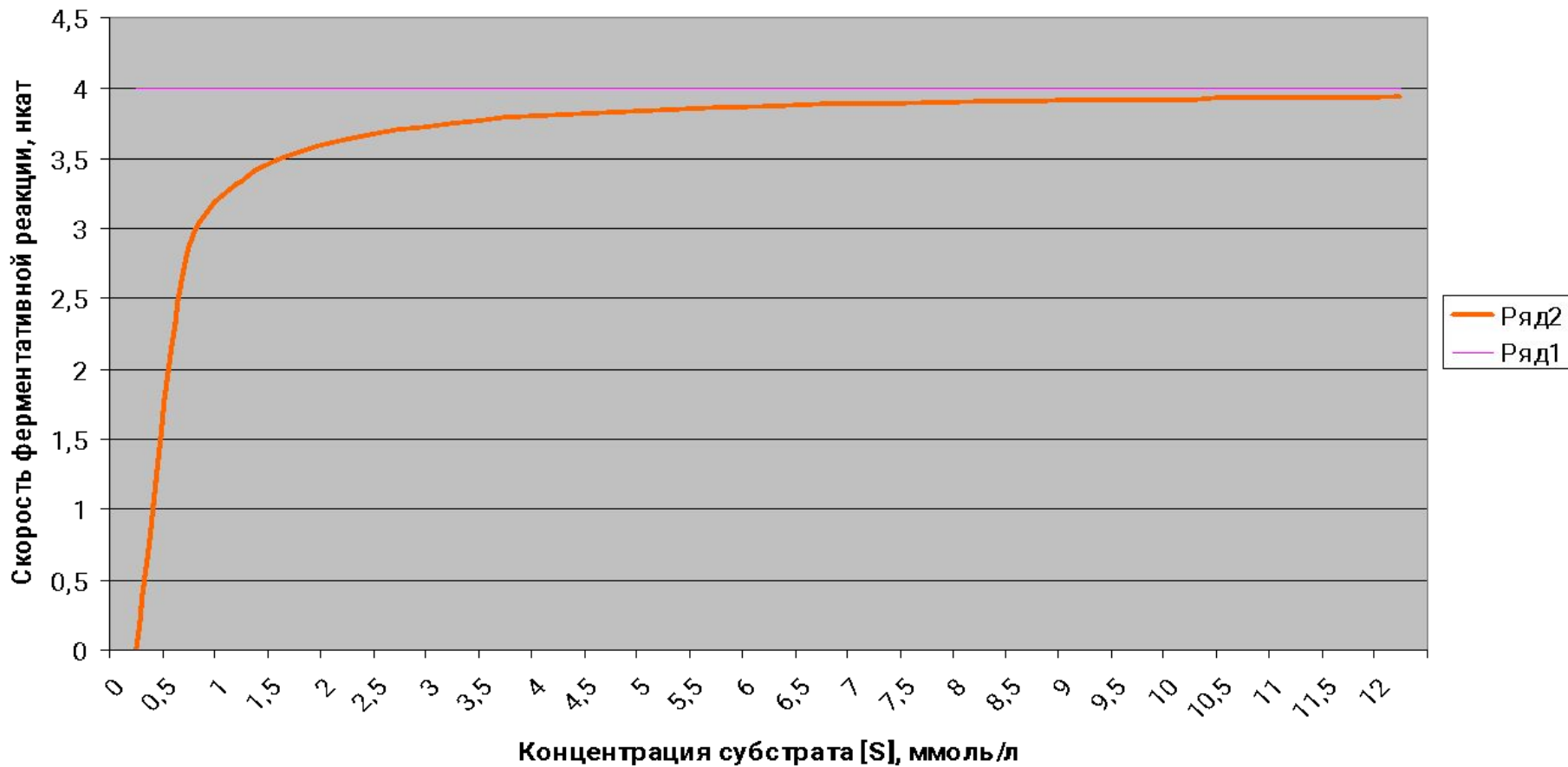


- С увеличением температуры на 10°C скорость реакции возрастает в 2 раза (правило **Вант-Гоффа**).
- После $60-70^{\circ}\text{C}$ происходит денатурация фермента с потерей его каталитической активности.

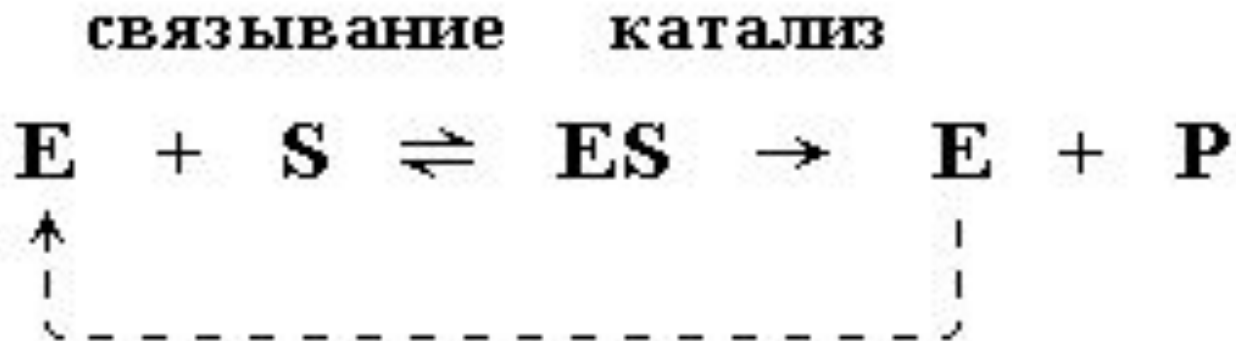
- **Активность фермента зависит от концентрации субстратов.**
- Исследование зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации реагирующих веществ стало одним из главных путей изучения механизма действия ферментов. В 1905 году французский исследователь Генри впервые высказал ряд предположений,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

Кинетика ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций



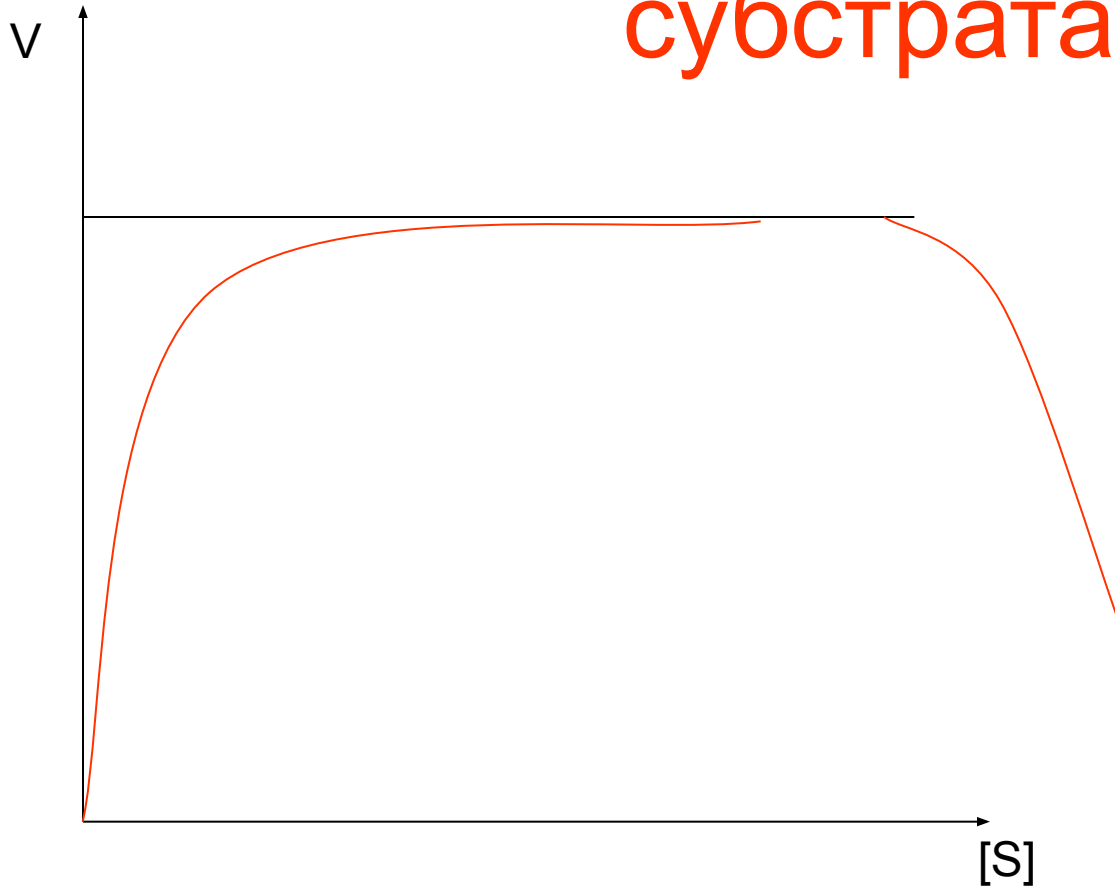
- Если концентрация субстрата $[S]$ очень низкая, ограничивающим скорость реакции становится этап образования комплекса ES (связывание) и реакция проявляет свойства реакции первого порядка



- Если концентрация субстрата $[S]$ высокая, количество образующегося комплекса ES зависит от количества доступного фермента, и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата (реакция нулевого порядка).

- Ограничивающим скорость реакции становится этап образования продукта (катализ). В реакции, катализируемой ферментом имеется верхний предел скорости реакции, зависящий от максимально возможной концентрации образующегося комплекса ES

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

- $[ES]_{\text{max}} = [E]_{\text{общ}}$
- Общее количество фермента в системе, равно сумме $[E]$ (концентрация свободного фермента), и $[ES]$ (концентрация фермента, связанного в данный момент времени с субстратом). Ограничение в скорости наступает, когда весь фермент занят.
- $[E]_{\text{общ}} = [E] + [ES]$
 количество = свободный + связанный

- Важным для правильной оценки результатов исследования зависимости скорости реакции от концентрации является измерение начальной скорости реакции.
- В 1926 году англичане Бриггс и Холдейн ввели понятие динамического равновесия или стационарного состояния.

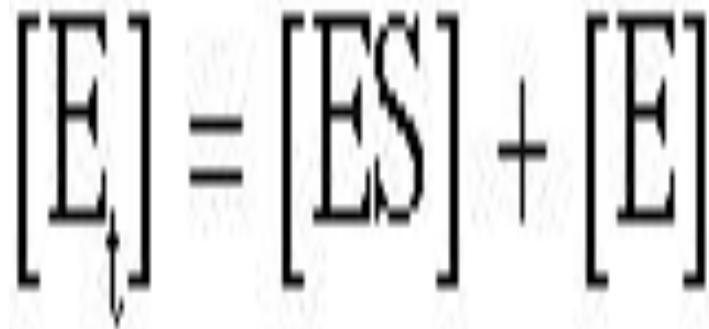
- При взаимодействии фермента и субстрата очень быстро наступает равновесие между скоростью образования и скоростью распада фермент-субстратного комплекса. Это предположение дополняло представления Генри, Михаэлиса и Ментен и позволяло более полно охарактеризовать кинетику ферментативных реакций.

- В реакции, катализируемой ферментом можно выделить четыре реакции, каждая из которых характеризуется собственной константой скорости. Однако, учитывая, что используются данные только о начальных скоростях реакции, когда продукт еще не успевает повлиять на ход реакции ($[P] = 0$) значение k_4 можно исключить из расчетов.

- Важной качественной характеристикой фермента является константа Михаэлиса
- Воспользовавшись предположениями, высказанными Генри, Михаэлисом и Ментен, а также Бриггсом и Холдейном, выведем уравнение, характеризующее реакции, катализируемые ферментом



- **Основная гипотеза: этапом, ограничивающим скорость ферментативной реакции является $(ES \rightarrow E + P)$**
отсюда начальная скорость реакции $v_0 = k_3 [ES]$;
- однако $[ES]$ трудно измерить экспериментально. Принимаем
- **Основная гипотеза: этапом, ограничивающим скорость ферментативной реакции является $(ES \rightarrow E + P)$**
отсюда начальная скорость реакции $v_0 = k_3 [ES]$;
- однако $[ES]$ трудно измерить экспериментально. Принимаем
-



$[E_t]$ общее количество фермента
 $[ES]$ связанный фермент
 $[E]$ свободный фермент

- тогда, количество свободного фермента: $[E_t] - [ES]$
- так как $[S] \gg [E_t]$, $[S]_{\text{связ}} \ll [S]_{\text{свобод}}$
- [этап 1] скорость образования $ES = k_1$
 $([E_t] - [ES]) [S]$ (1)
скорость распада
 $ES = k_2 [ES] + k_3 [ES]$
(2)

• [этап 2] гипотеза: **Образование фермент-субстратного комплекса самая быстрая реакция, результатом которой является возникновение динамического равновесия между образованием и распадом комплекса, благодаря чему $[ES] = const$, и следовательно (1) = (2)**

• $k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$

- [Этап 3] $k_1 [Et] [S] - k_1 [ES] [S] = [ES] (k_2 + k_3)$

$$k_1 [Et] [S] = (k_1 [S] + k_2 + k_3) [ES]$$

$$[ES] = k_1 [Et] [S] / (k_1 [S] + k_2 + k_3) = [Et] [S] / \{[S] + (k_2 + k_3) / k_1\}$$

$$= [Et][S] / \{[S] + K_M\} \quad [$$

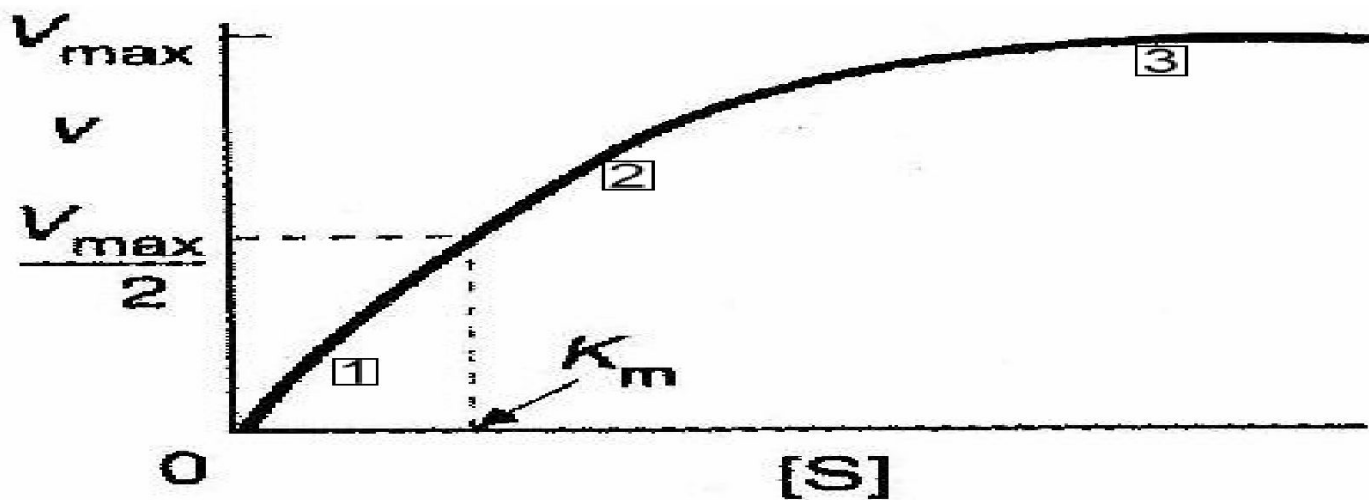
где $K_m = (k_2 + k_3) / k_1 = \text{константа Михаэлиса}]$

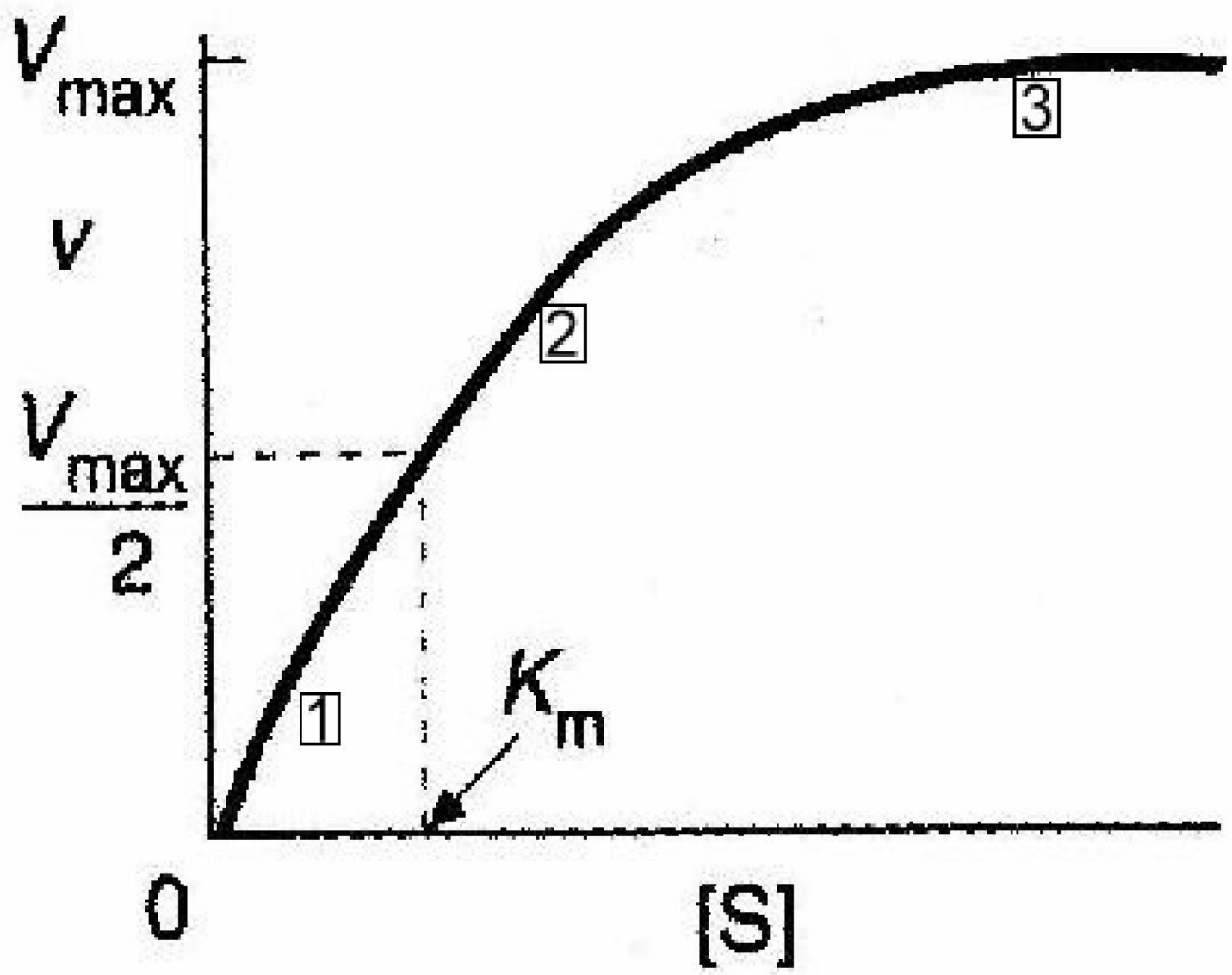
при условии $[ES] = [Et]$ скорость реакции становится максимальной
 $V_{\max} = k_3 [ES] = k_3 [Et]$

- отсюда $v_0 = k_3 [ES] = k_3 \{ [Et] [S] / \{ [S] + K_m \} \} = V_{\max} [S] / \{ [S] + K_m \}$
- **(уравнение Михаэлиса -Ментен)**

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

- Уравнение Михаэлиса и Ментен графически – прямоугольная гипербола
- Если мы построим график зависимости скорости реакции V от концентрации субстрата $[S]$ мы получим кривую типа





- Каково физическое значение K_m ?
Уравнение Михаэлиса-Ментен можно преобразовать к такому виду

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

- Из этого уравнения легко показать, что
- при $[S] = 10 K_m v/V_{max} = 0.91$ при $[S] = K_m v/V_{max} = 0.50$ при $[S] = 0.1 K_m v/V_{max} = 0.09$ Т.е, $K_m = [S]$, если скорость реакции равна половине от максимальной скорости и, значит, выражается в единицах концентрации.

- При условии, что $k_3 \ll k_2$, константа Михаэлиса становится хорошим показателем сродства фермента к субстрату. Чем выше значение K_m , т.е., чем выше должна быть концентрация субстрата для достижения состояния FS.

- Значение K_m дает также некоторые представления относительно эффективности катализа и регуляции. Если $[S] \gg 10 K_m$, реакция является эффективной («работают» все молекулы фермента), но реакция утрачивает способность к регуляции количеством субстрата.

- Если $[S] \ll 0.1 K_m$, эффективность реакции низка, но имеется хорошее управление скоростью реакции путем изменения концентрации субстрата.

- Наиболее удобное сочетание эффективности и контроля соблюдается при условии, если концентрация субстрата одного порядка со значениями K_m . Эти выводы имеют важное прикладное значение. Если Вы исследуете активность фермента в лаборатории, то следует насыщать F субстратом.

- Знание K_m позволит Вам оценивать концентрацию субстрата, необходимую для гарантии насыщения. Эта концентрация должна быть равна по крайней мере двум K_m .

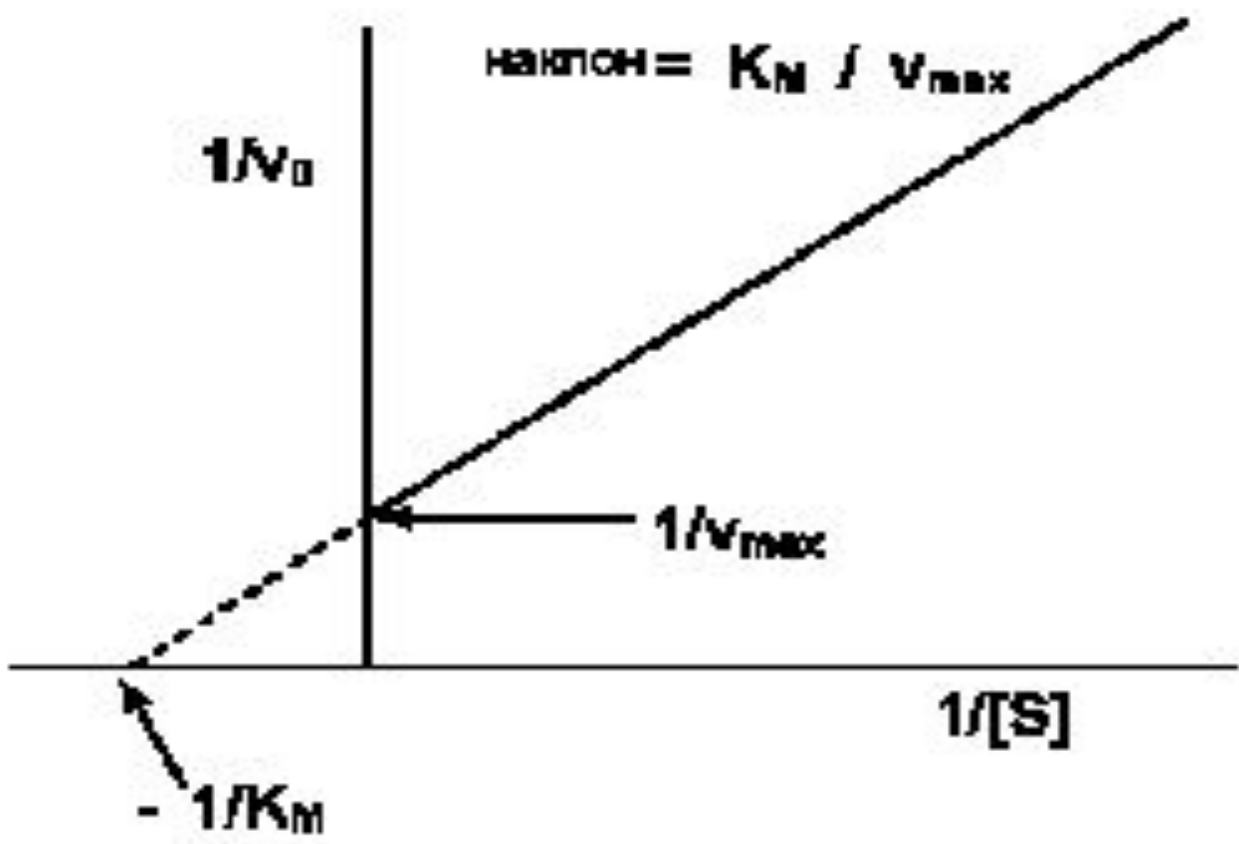
- В физиологических условиях, для эффективной работы, концентрация субстрата должна быть на уровне K_m этого фермента, но если важно управление концентрацией субстрата, концентрация субстрата должна быть в диапазоне ниже $5 K_m$.

- Практически рассчитать значения K_m и V_{max} , пользуясь кривой, описываемой уравнением Михаэлис и Ментен сложно. Более удобно оказалось определять эти параметры в координатах “двойных обратных величин”. Формула уравнения Михаэлиса в этом случае приобретает следующий вид
- а зависимость - вид прямой линии (график Лайнуивера-Берка).
-

- Такой способ выражения позволяет более точно рассчитать значения K_m и V . Пересечение линии с осью $1/[S]$ позволяет вычислить значение K_m , а пересечение с осью $1/V$ – значение максимальной скорости.

-

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



Примеры использования данных кинетических исследований ферментов в медицине

- Некоторые люди обладают повышенной чувствительностью к этиловому спирту. После приема даже небольших количеств этилового спирта у них развивается тахикардия и покраснение лица. Этиловый спирт под влиянием алкогольдегидрогеназы превращается в уксусный альдегид, который в свою очередь затем окисляется под влиянием альдегиддегидрогеназы в уксусную кислоту.

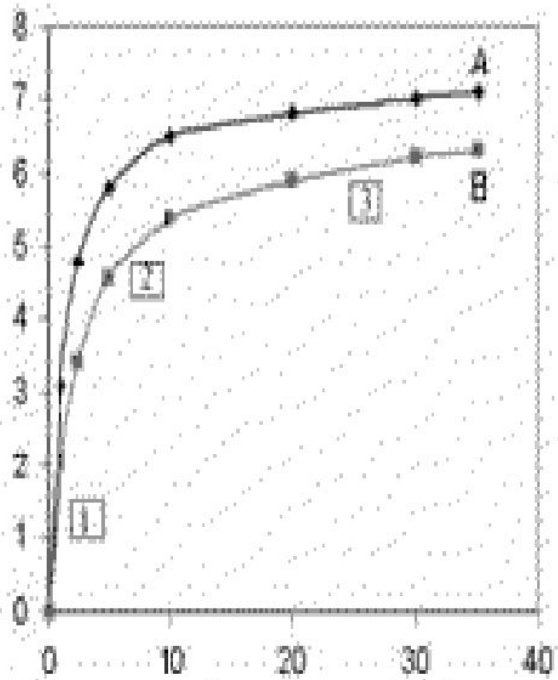
- Альдегиддегидрогеназа обычно существует в двух формах, с высоким сродством (низкие значения K_m) к альдегиду и с низким сродством (высокие значения K_m) к альдегиду. У людей, чувствительных к этиловому спирту отмечен недостаток формы с высоким сродством и уксусный альдегид, накапливаясь, вызывает у них вазодилатацию и покраснение лица.

- Семейная пара с генетической предрасположенностью к болезни Неймана-Пика ожидает ребенка. Им известно, что их будущий малыш имеет высокую вероятность наследования генетического дефекта, который приводит к этой болезни. При этом заболевании синтезируется дефектный белок - фермент, катализирующий распад сфингомиэлина. Сфингомиэлин - нормальный компонент мембран глиальных клеток, которые обеспечивают функции нейронов.

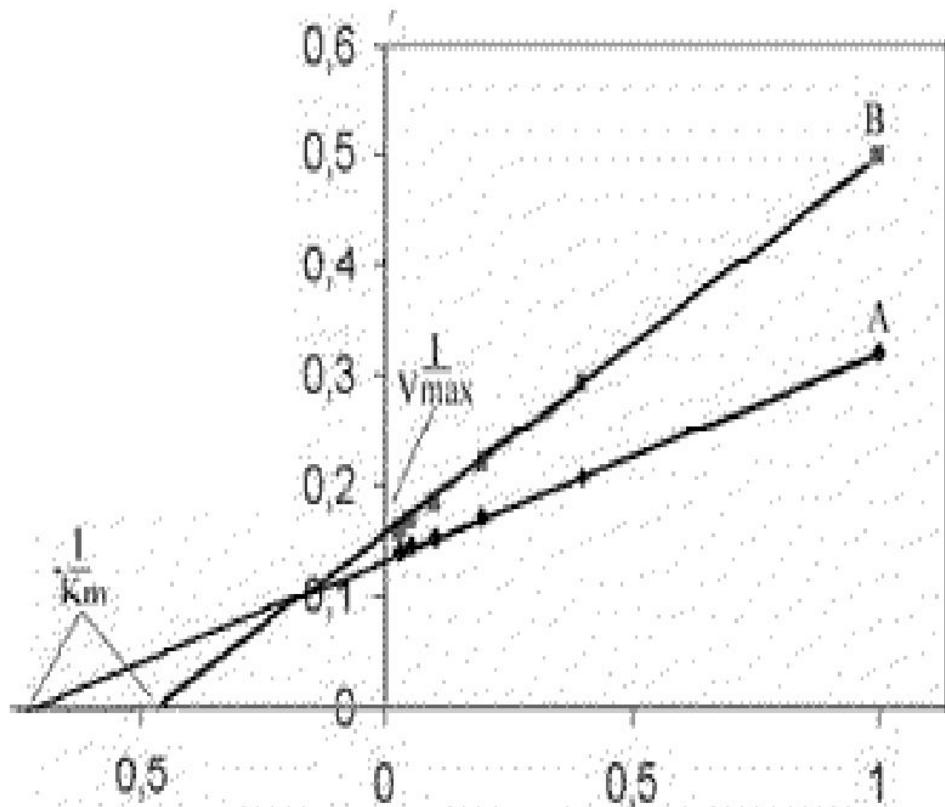
- Если сфингомиэлин не распадается должным образом, нарушается нейронная передача. Физиологические последствия болезни Наймана-Пика - олигофрения и ранняя смерть. Выяснение качественных характеристик фермента с последующими рекомендациями по продолжению беременности- это только один из примеров широкого использования знаний о ферментах в медицинской практике.

- Семейная пара с генетической предрасположенностью к болезни Неймана-Пика ожидает ребенка. Им известно, что их будущий малыш имеет высокую вероятность наследования генетического дефекта, который приводит к этой болезни. При этом заболевании синтезируется дефектный белок - фермент, катализирующий распад сфингомиэлина. Сфингомиэлин - нормальный компонент мембран глиальных клеток, которые обеспечивают функции нейронов.

- У беременной были получены клетки плода (путем амниоцентеза) и размножены методом тканевой культуры. Экстракт клеток был использован в качестве источника фермента. Результаты приведены на графиках.



a

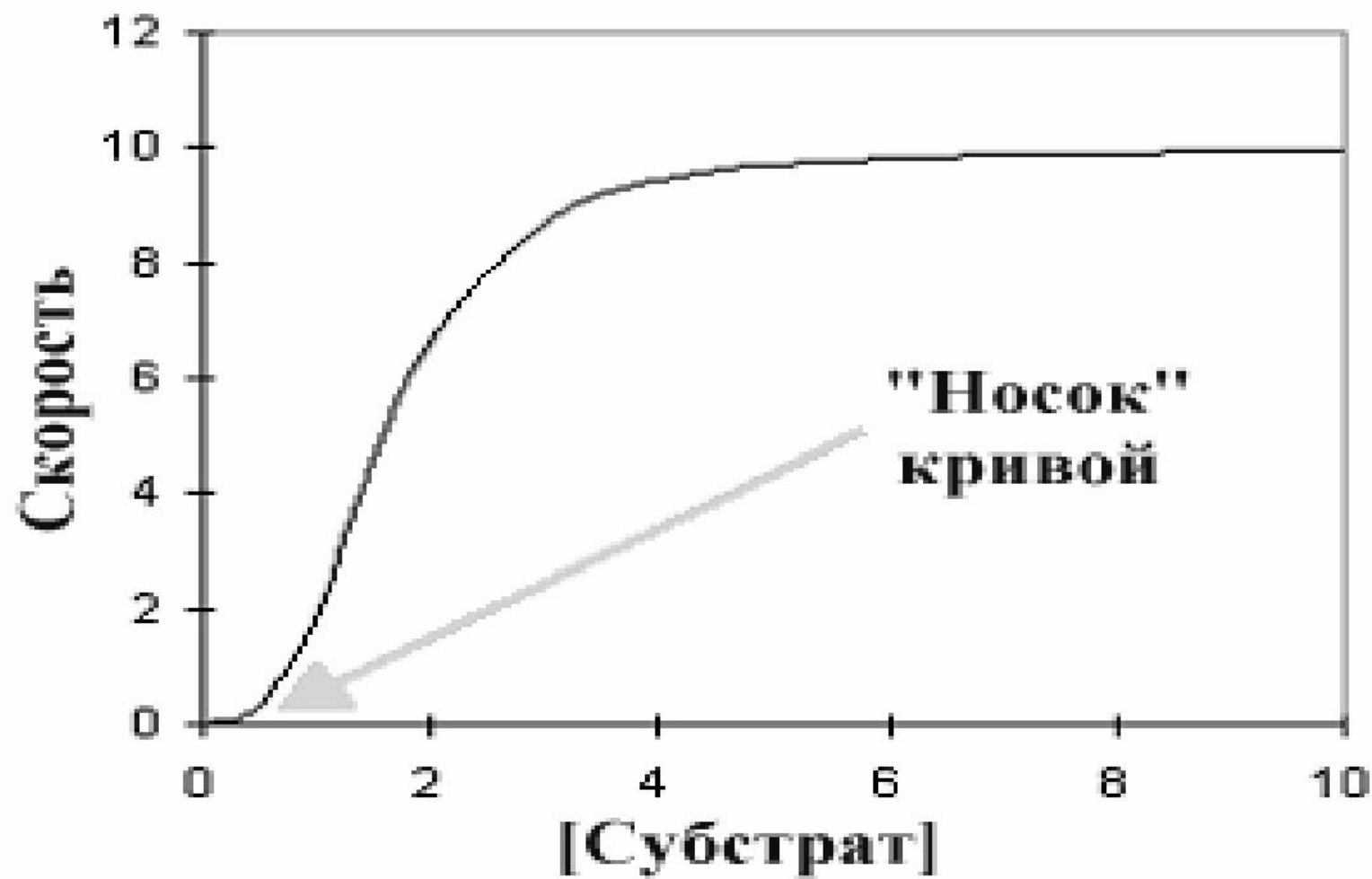


b

- При знакомстве с материалом по кинетике ферментов могло сложиться впечатление, что кинетика всех ферментов основана на принципах Михаэлиса и Ментен.
- **Кинетика многих ферментов не подчиняется принципам кинетики Михаэлиса и Ментен**

- У ферментов, подчиняющихся принципам кинетики Михаэлиса и Ментен с позиций процессов, протекающих в клетке, имеется ряд недостатков. Для обеспечения нормальной жизнеспособности клетки требуется тонкая регуляция концентрации большинства метаболитов. Существует довольно узкий диапазон допустимых концентраций субстратов в клетке, способных для удовлетворения потребности, быстро реагировать изменениями скоростей реакции в широких пределах в ответ на постоянно меняющееся функциональное состояние клетки.

- Таким образом, природа вынуждена обратиться к "кооперативным" системам, в которых маленькие изменения в одном параметре, например концентрации ингибитора, вызывают большие изменения в скорости. Графически результат работы такой кооперативной системы (график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата) выражается не гиперболой, а S-образной сигмоидной кривой (сигмоидальные кривые всегда сдвинуты вправо в сравнении с гиперболой). Существует большое семейство ферментов, которые представляют такие кооперативные системы. Это аллостерические ферменты.



- Аллостерический белок определяется как белок, содержащий два или больше топологически различающихся центра связывания лигандов (субстраты, ингибиторы и т.д), которые функционально взаимодействуют друг с другом. Связывание лиганда, с одним центром изменяет свойства другого (их).
- Большая часть аллостерических белков – аллостерические ферменты, но некоторые белки, типа гемоглобина, выполняют и другие функции.

- Кооперативность - модификация константы связывания лиганда белком предшествующим связыванием другого лиганда. Константы связывания - подобны K_s для субстрата или K_i для ингибитора, являются в основном константами диссоциации белка и лиганда и указывает силу связывания, или сродство белка и лиганда

- K_m обычно принимается как константа связывания субстрата, поскольку ее проще измерять, чем K_s . Понятие кооперативность означает, что связывание одного лиганда к белку или увеличит или уменьшит способность белка, связывать вторую молекулу лиганда. Если модификация увеличивает способность связывания (или сродство), это называют положительной кооперативностью. Если способность связывания снижается - это отрицательная кооперативность.

Значения V_{max} и K_m определяются при экстраполяции линий до пересечения с осью абсцисс и ординат. Как видно исследуемый фермент отличается по значению K_m от K_m контрольного фермента более высокими значениями, что может свидетельствовать о более низком сродстве этого фермента к субстрату и возможном дефекте фермента

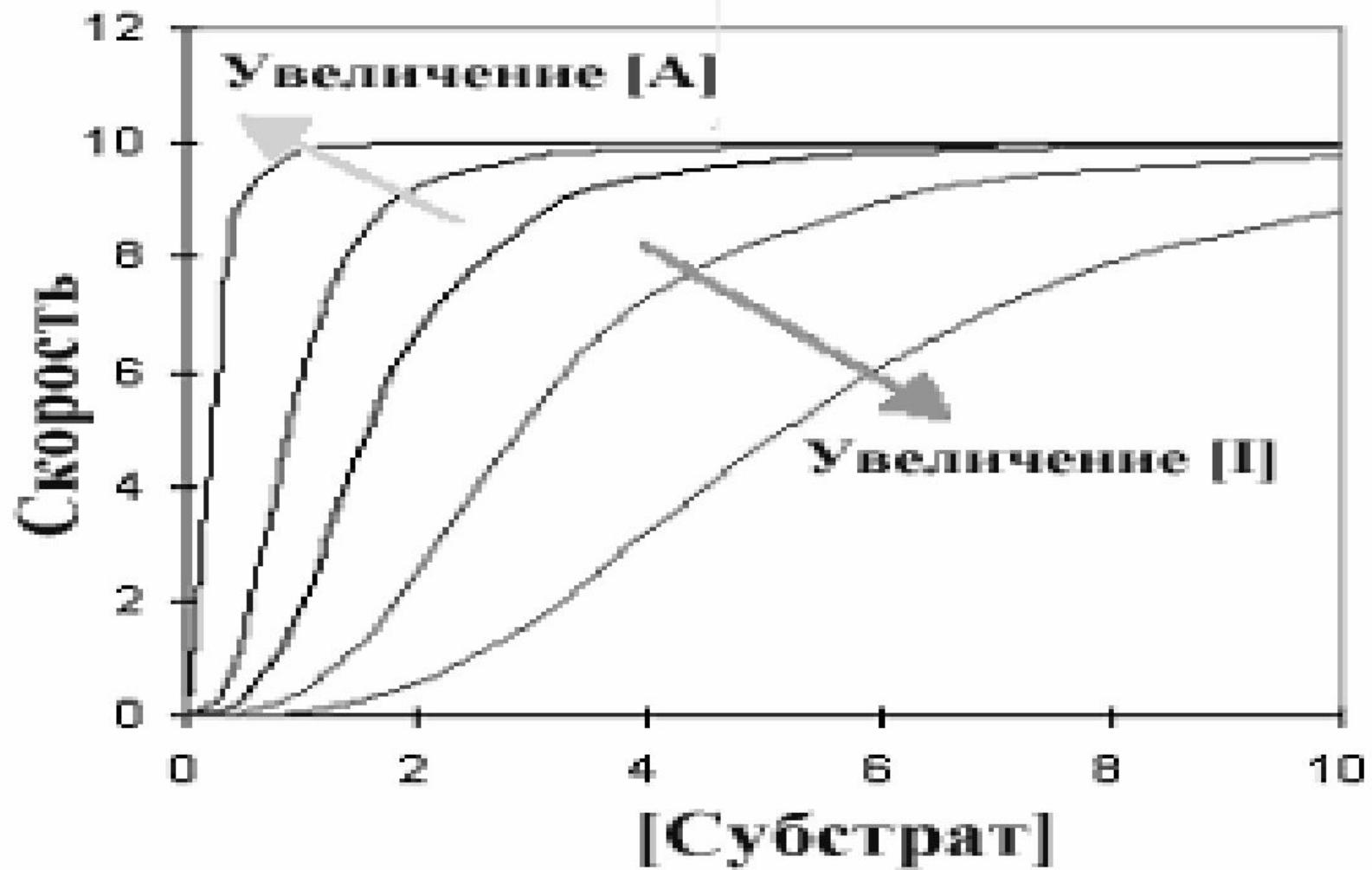
- Два лиганда один из которых влияет на связывание другого, могут быть химически идентичны, например, одна молекула субстрата, изменяет связывание другой молекулы субстрата. Такое взаимодействие называют гомотропным эффектом. Если они химически различаются, например, влияние ингибитора на связывание субстрата, тогда это - гетеротропный эффект.

У аллостерических ферментов особые свойства

- Полимерная структура
- Сигмоидная (в отличие от гиперболической для не аллостерических) форма кривой зависимости скорости реакции от концентрация субстрата
- Существование эффекторов
- Двухфазный ответ на конкурентные ингибиторы
- Потеря аллостерических свойств при денатурации

- Аллостерический фермент содержит ряд активных центров, в самом простом случае по одному на субъединицу, каждый из которых может связываться с лигандом. Взаимодействие между этими центрами и является основой кооперативности. Так, в типичном аллостерическом ферменте связывание молекулы лиганда к одному из активных центров инициирует изменение конформации,

- которое увеличит способность других активных центров связывать лиганды (положительная кооперативность. $K_2 \ll K_1$) или понизит их сродство к лиганду (отрицательная кооперативность $K_1 \ll K_2$). При отсутствии кооперативного взаимодействия $K_1 = K_2$.

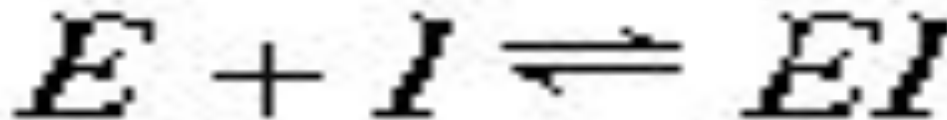


- Центральная линия графика - типичная сигмовидная кривая в отсутствии любого эффектора. В присутствии активатора (А) скорость реакции повышается при любой данной концентрации субстрата, в то время как ингибитор уменьшает скорость реакции. Интересны и изменения общей формы кривой по сравнению с центральной линией. Ингибитор увеличил сигмовидную форму, удлиняя «носик» кривой, в то время как активатор оказывал противоположный эффект. При более высокой концентрации активатора график в целом приобретает характер гиперболы. Это указывает на то, что аллостерический ингибитор увеличивает уровень субстратной кооперативности, в то время как активатор уменьшает его.

- Денатурация – нарушение пространственной структуры фермента с последующей потерей активности фермента. Денатурация вызывается рядом факторов, включая высокую температуру, экстремальные значения рН и химические денатурирующие реактивы типа мочевины.

Ингибиторы бывают разные: обратимые и необратимые

- Вещества со свойствами ингибиторов ферментов можно грубо разделить на обратимые и необратимые. Обратимые ингибиторы связываются с ферментом, используя слабые связи, подобные тем, которые используются ферментом в связывании субстрата. Эти связи формируются быстро, но также быстро и легко разрушаются. Следствием такого связывания обратимого ингибитора является эффективное мгновенное действие, но после удаления ингибитора фермент сохраняет свою активность. Ингибитор находится в равновесии с ферментом, формируя комплекс ингибитора фермента:





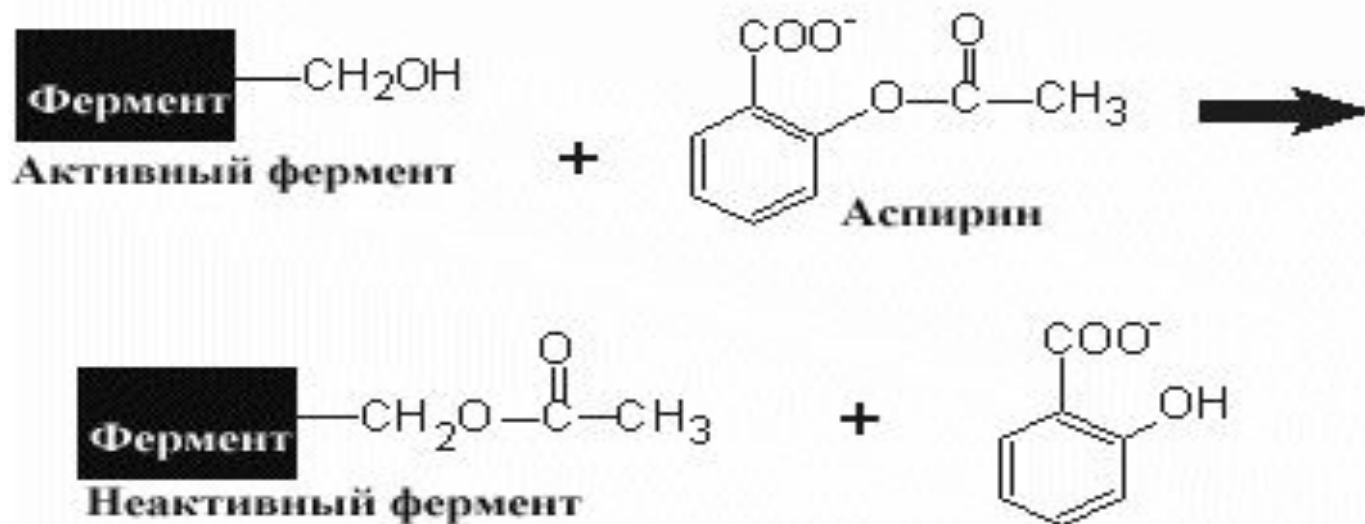
Необратимые ингибиторы известны также как инактиваторы фермента. Они связываются с ферментом, формируя прочные, обычно ковалентные связи:

Необратимые ингибиторы известны также как инактиваторы фермента. Они связываются с ферментом, формируя прочные, обычно ковалентные связи:



- Среди примеров необратимо действующих ингибиторов можно назвать диизопропилфторфосфат (ДИПФФ). Это соединение вошло в историю энзимологии как соединение использовавшееся для исследования роли химических групп в в структуре активного центра. ДИПФФ ковалентно связывается с гидроксильной группой серина и если эта группа важна в катализе реакции, фермент терял свою активность. Эти исследования позволило выявить группу ферментов, в активном центре которых активную роль играет серин (сериновые протеазы)

- Ацетилсалициловая кислота (известный всем аспирин) является необратимым ингибитором циклооксигеназы-фермента участвующего в синтезе простагландинов.



- Ингибитором синтеза протеогликанов стенки бактерий является пенициллин, структура которого напоминает D-аланин, встраиваемый в структуру протеогликанов. Связываясь с активным центром фермента бактерии благодаря своей схожести с переходным состоянием промежуточного продукта в активном центре, пенициллин образует ковалентную связь и тормозит работу фермента

- Предшествующее связывание субстрата к активному центру в свою очередь, вызывает изменения конформации центра связывания ингибитора, которое предотвращает связывание ингибитора. И субстрат и ингибитор не могут одновременно связаться с ферментом. В этом виде конкурентного торможения ингибитор может иметь любую химическую структуру, поскольку они связываются с различными участками фермента.

Различают два механизма конкурентного торможения.

- 1. Конкурентное торможение путем связывания активного центра.**
- 2. Конкурентное торможение путем изменения конформации фермента.**

Конкурентные ингибиторы не влияют на V_{max} , они понижают K_m .

- Оказывая эффект на:
- K_m
- Эффект на V_{max}
- Наиболее часто приводимый пример конкурентного ингибирования - это использование малоновой кислоты для торможения дегидрогеназы янтарной кислоты. Наиболее близким структурным аналогом сукцината является малоновая кислота.

- Малоновая кислота тормозит активность дегидрогеназы янтарной кислоты, занимая активный центр на ферменте. Учитывая обратимость реакции, избыток янтарной кислоты снимет действие малоновой кислоты.

Конкурентное торможение путем изменения конформации фермента.

- В отличие от классического варианта, ингибитор связывается не с активным центром, а со специальным центром, связывающим ингибитор, который расположен вдали от активного центра. Связывание ингибитора вызывает изменение пространственной структуры (изменение конформации) в области активного центра, которое не позволяет присоединиться субстрату.

- **Регуляция активности ферментов путем химической модификации: Реакции ограниченного протеолиза, аденилирования, рибозилирования, ацетилирования, фосфорилирования (роль гормонов, АЦ-комплекса, цАМФ, цГМФ, ионов Са).**

- Активность фермента можно изменить путем ковалентной модификации его структуры.
- Ковалентная модификация структуры ферментов может быть обратимой и необратимой.

Регуляция активности ферментов

- Гормональная регуляция осуществляется на генетическом уровне путем обратного фосфорилирования. Например под действием адреналина и глюкагона происходит активация процесса распада гликогена, в ходе этого процесса образуется небелковое соединение - цАМФ, цАМФ - внутриклеточный гормон (вторичный посредник) яв-ся аллостерическим регулятором большого числа протеинкиназ. цАМФ образуется из АТФ под действием аденилатциклазы

- Гормон, циркулирующий в крови, попадает в межклеточную жидкость и контактирует с поверхностью клетки, где расположены рецепторы (R_s и R_i), белки узнающие и связывающие гормон.
- Гормональный сигнал поступает на АЦ через белки посредники (G_s и G_i), которые активируются в условиях присоединения ГТФ

- Уровень, образовавшийся под действием АЦ, цАМФ определяется не только активностью АЦ, но и активностью фосфодиэстераз, которые циклизируют цАМФ до АМФ.
- Кроме цАМФ, существуют цГМФ, цУМФ, цЦМФ. Наибольшее значение имеет цГМФ. Она образуется под действием гуанилатциклазы, расположенной как в наружной мембране, так и внутри клетки, цГМФ единственный фермент, который реагирует на концентрацию H_2O_2 и активируется под действием продуктов перекисного окисления.

- цГМФ оказывает эффекты противоположные цАМФ.
- цАМФ находится в тесном контакте с ионами Ca^{2+} : высокая концентрация цАМФ в возбудимых тканях приводит к высокой $[Ca^{2+}]$ и стимуляции клетки. И наоборот, резкое уменьшение $[Ca^{2+}]$ тормозит АЦ и снижает уровень цАМФ.

Изоферменты, их природа, биологическая роль, строение ЛДГ.

- **Изоферменты** - это группа родственных ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию. Они происходят из одного предшественника за счет дупликации гена с последующей мутацией образуемых аллелей. Они отличаются между собой:

- 1) скоростью катализа;
- 2) направлением катализируемой реакции;
- 3) условиями протекания реакции;
- 4) чувствительностью к регуляторам, факторам среды. (Более или менее устойчивы к ингибиторам);
- 5) сродством к субстрату;
- 6) особенностями структуры молекулы, ее ИЭТ, Mr, размерами и зарядом.

- Изоферменты имеют адаптивное значение, т. е. придают специфику метаболизма.
- Изоферменты обеспечивают межорганную связь, например, в процессе мышечной деятельности.
- В миокарде и печени существуют различные изоферменты ЛДГ, которые обеспечивают метаболизм лактата:

- **ЛДГ4,5**
- в печени: ПВК -----> лактат
- **ЛДГ1,2**
- в сердце: лактат -----> ПВК
- ЛДГ - олигомерный фермент, состоящий из 4-х субъединиц 2 типов.
- Н (heart) и М (muscle).

- Существует 5 изоферментных форм:
- **НННН НННМ ННММ НМММ ММММ**
- Н4 Н3М Н2М2 НМ3 М4
- ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4, ЛДГ5.
- Поскольку Н-протомеры несут более выраженный отрицательный заряд, то изофермент Н4 (ЛДГ1) будет мигрировать при электрофорезе с наибольшей скоростью к аноду.
- С наименьшей скоростью к аноду будет двигаться М4.

- Остальные изоферменты занимают промежуточное положение.
- Изоферменты ЛДГ локализованы в различных тканях:
- ЛДГ1,2 ----> мозг, аэробные ткани (миокард).
- ЛДГ3 ----> лейкозные клетки.
- ЛДГ4,5 ----> анаэробные ткани: мышечная, скелетная.
- Изоферменты появляются на различных этапах онтогенеза и реализуют программу индивидуального развития.
- Изоферментный профиль меняется в процессе развития.
- При патологиях имеется существенный изоферментный сдвиг.

Изменение активности ферментов в онтогенезе.

Онтогенез человека развивается по определенной генетической программе, которая записана на уровне ткани, всего организма в гипоталамусе.

1. Внутриутробный период.

Характеризуется высокой активностью ферментов синтеза белка, липидов, происходит увеличение массы организма. Плод находится в анаэробных условиях и для метаболизма характерно анаэробная направленность.

Основной источник энергии - жирные кислоты, поступающие из организма матери; ЖК также выполняют строительную функцию (фосфолипиды мембран).

Глюкоза утилизируется анаэробным путем (анаэробный гликолиз), т. к. ткани плода не способны к ГНГ, и идет на развитие ЦНС.

2. Пренатальный период.

Характеризуется изменением активности ферментов, происходит подготовка организма к пребыванию в аэробной среде. Изменяется спектр гемоглобина, уменьшается его сродство к кислороду, изменяется активность митохондриальных ферментов

3. Грудной

Потребность в глюкозе резко возрастает, она начинает утилизироваться аэробно, но примерно до двух лет основным источником энергии является все же липиды, причиной чего является соматотропин. (Гормон роста).

4. Ранний дошкольный период.

С 3-х до 5-и лет. В этот период клетки начинают питаться углеводами. Происходит стабилизация обмена и интенсивная миелинизация нервных волокон.

5. Школьный и пубертантный период.

Обмен веществ модулируется под действием половых гормонов

6. Зрелый.

Происходит стабилизация массы тела, репродуктивного гомеостаза. После 35-40 лет основным источником энергии являются опять липиды, что связано с ослаблением чувствительности тканей к Гл и изменение гормонального фона: гиперстресс (увеличивается уровень гормонов) заставляет клетку работать на пределе, т. е. использовать в качестве энергии жиры.