

ЛИНЕЙНЫЕ  
ПРЕОБРАЗОВАНИЯ  
УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА  
- МЕНТЕН

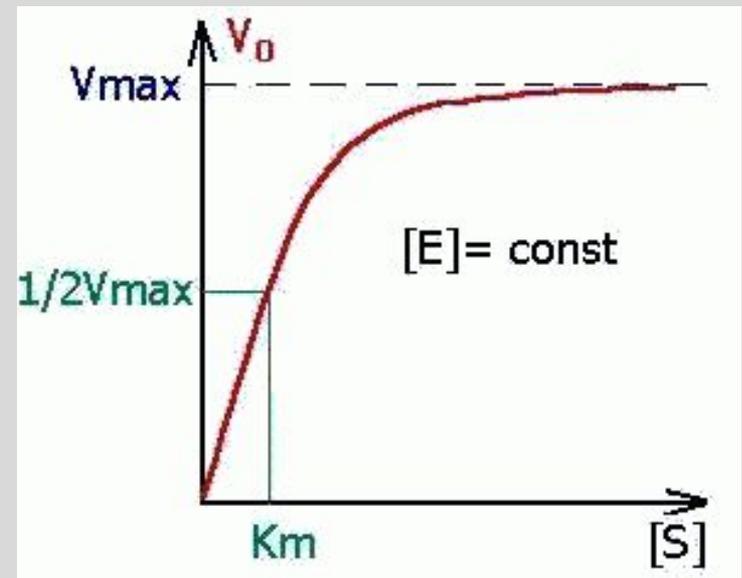
Константа Михаэлиса измеряется в молях на литр и колеблется от  $10^{-2}$  до  $10^{-7}$  моль/л.

Чем меньше  $K_M$ , тем активнее фермент.

При  $V=1/2V_{\max}$ , имеем  $K_M = [S]$ .

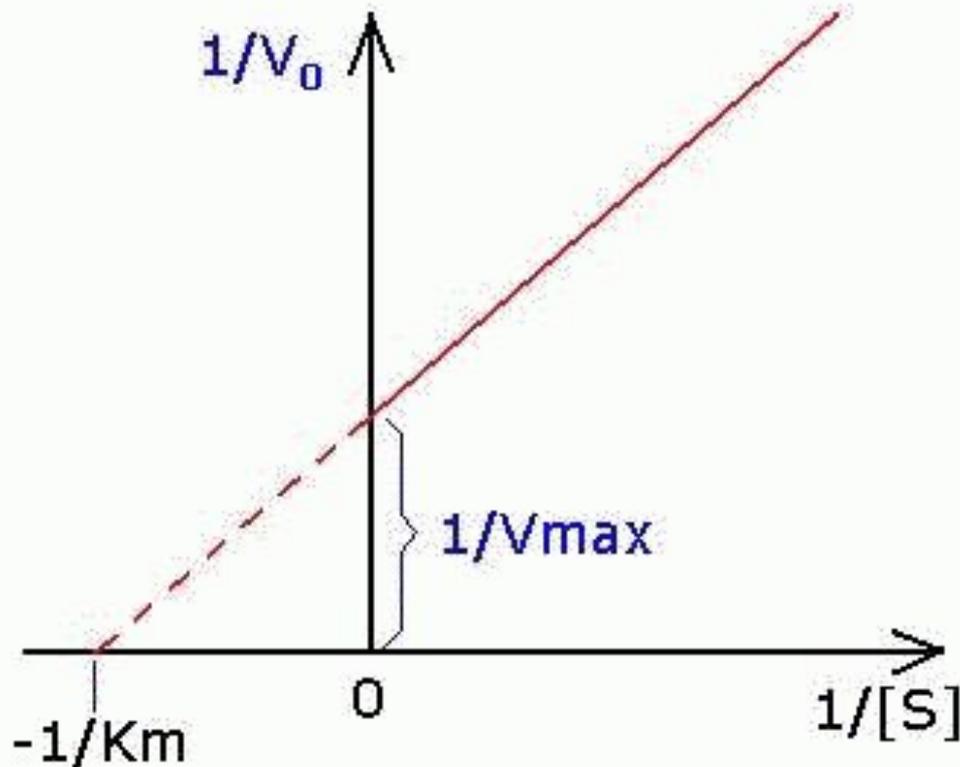
Однако определение  $V_{\max}$  и  $K_M$  затруднительно.

Для определения  $K_M$  и  $V_{\max}$  используют прием **линеаризации** уравнения Михаэлиса – Ментен.



# УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА - БЕРКА

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

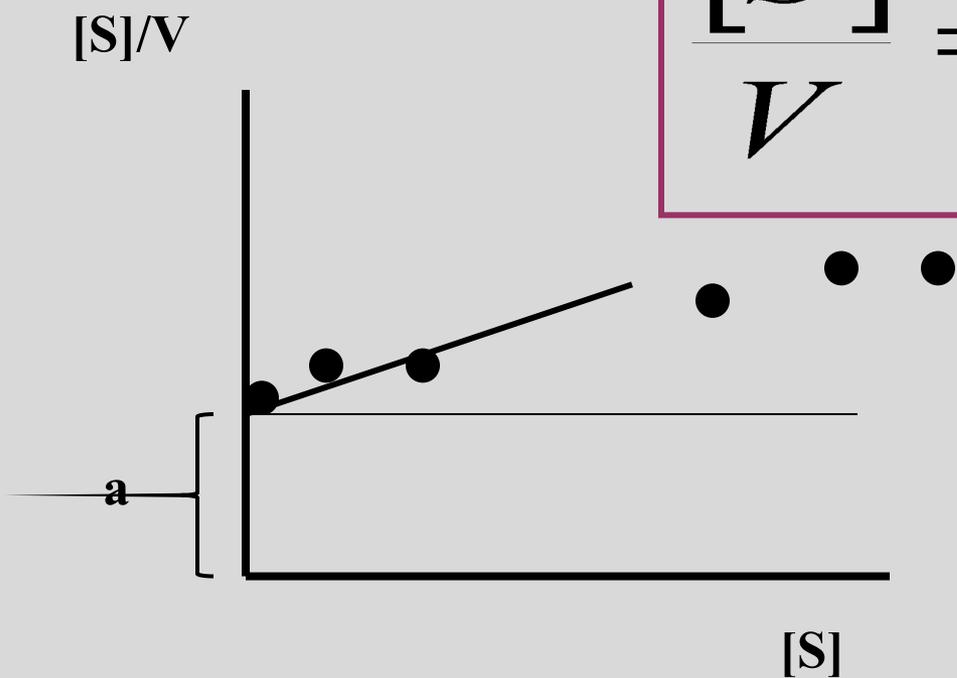


$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_M}{V_{\max}}$$

**УРАВНЕНИЕ ЛЭНГМЮРА** используется, если отклонения от линейности наблюдаются при высоких концентрациях субстрата

ПОЛУЧИМ, УМНОЖАЯ ОБЕ ЧАСТИ УРАВНЕНИЯ ЛАЙНУИВЕРА – БЕРКА НА [S]

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



$$a = K_M/V_{\max}$$

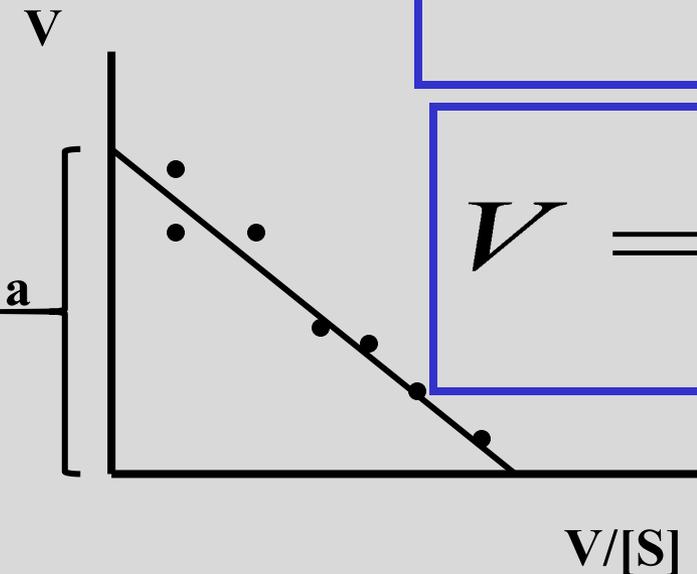
$$\text{tg}\alpha = 1/V_{\max}$$

# УРАВНЕНИЕ ИДИ - ХОФСТИ

ПОЛУЧИМ, УМНОЖАЯ ОБЕ ЧАСТИ УРАВНЕНИЯ  
ЛАЙНУИВЕРА – БЕРКА НА  $V \cdot V_{\max}$

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

$$V = V_{\max} - \frac{1}{[S]} K_M V$$

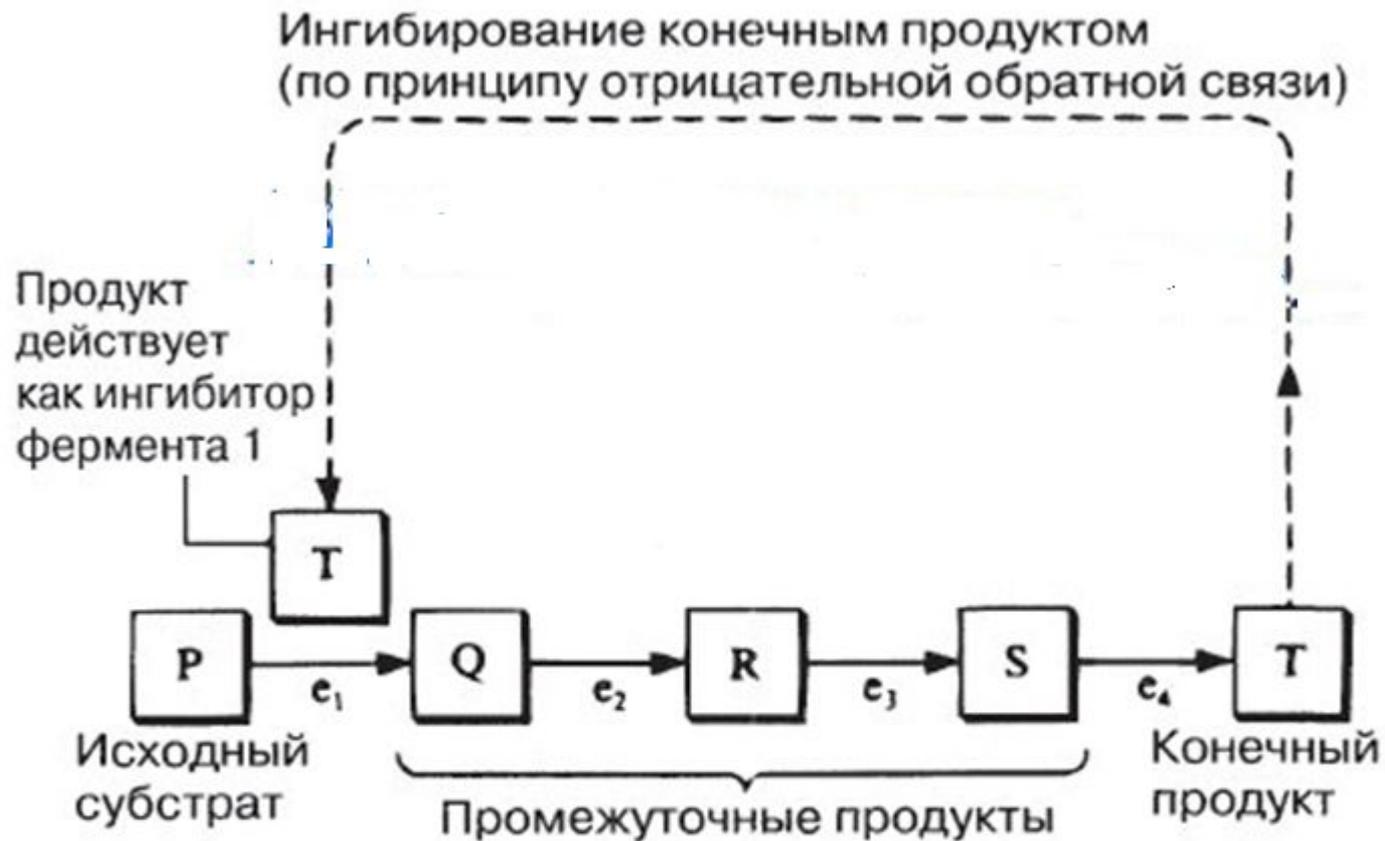


$$a = V_{\max}; \operatorname{tg} \alpha = -K_M$$

# АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

ДЛЯ МНОГИХ ФЕРМЕНТОВ,  
КАТАЛИЗИРУЮЩИХ КЛЮЧЕВЫЕ СТАДИИ  
МЕТАБОЛИЗМА, ХАРАКТЕРНА  
**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К МЕТАБОЛИТАМ,  
КОТОРЫЕ ОТЛИЧАЮТСЯ ПО ХИМИЧЕСКОЙ  
СТРУКТУРЕ ОТ СУБСТРАТОВ ЭТИХ  
ФЕРМЕНТОВ.**

**ПРИМЕР:** ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРВОГО  
ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПУТИ  
КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ РЕАКЦИИ



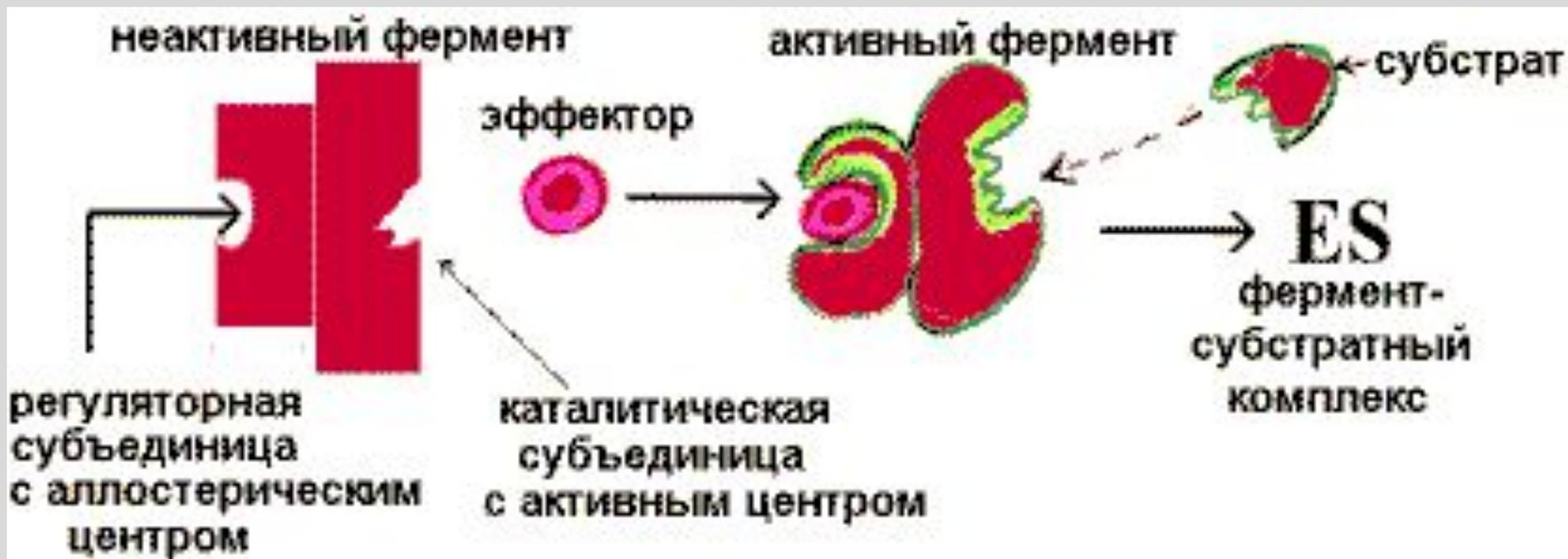
*Ингибирование конечным продуктом. Специфические ферменты, катализирующие отдельные этапы данного метаболического пути, обозначены буквами  $e_1$ — $e_4$ .*

ОПИСАННЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ  
ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПО ТИПУ **ОБРАТНОЙ  
СВЯЗИ.**

ЧТОБЫ ОТРАЗИТЬ РАЗЛИЧИЯ В  
ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ СУБСТРАТА И  
МЕТАБОЛИТА, РЕГУЛИРУЮЩЕГО  
ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПРОЦЕСС,  
ПОДОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ-РЕГУЛЯТОРЫ  
НАЗВАЛИ ***АЛЛОСТЕРИЧЕСКИМИ***

(ОТ ГРЕЧЕСКОГО «АЛЛОС» - ДРУГОЙ И «СТЕРЕО» -  
ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ)

# АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

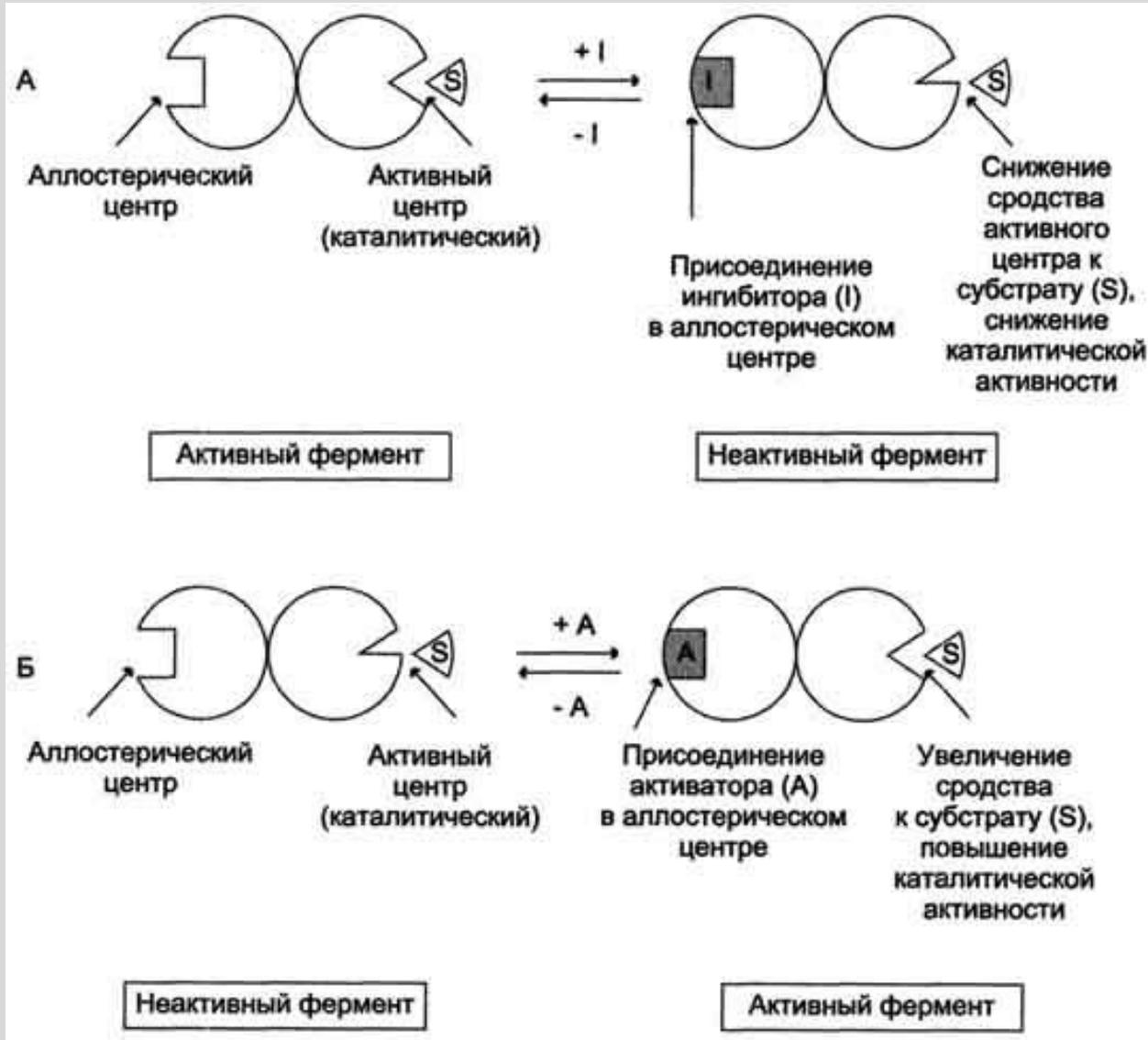


# ОСОБЕННОСТИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОРОВ

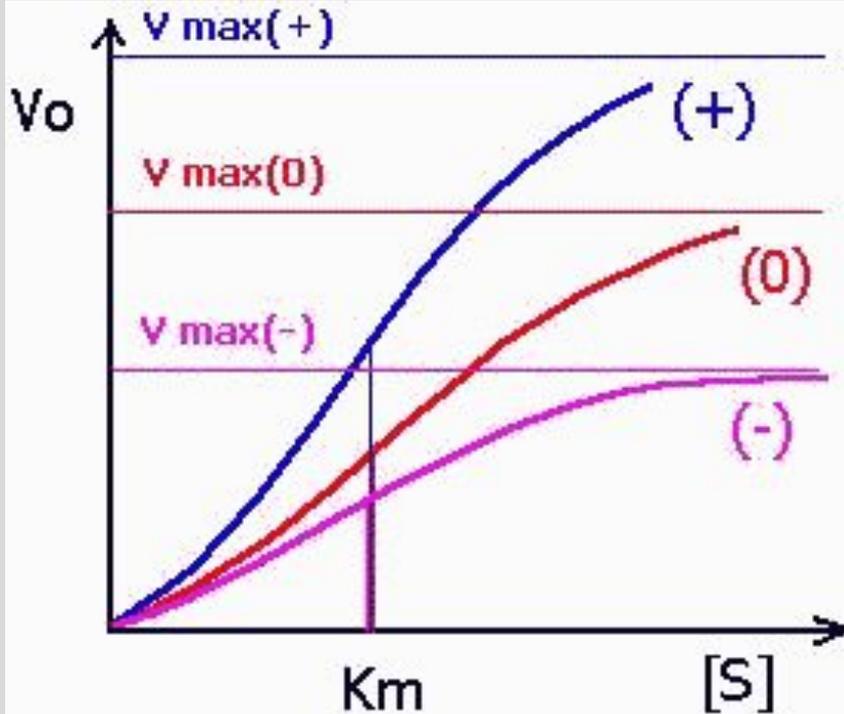
- РЕГУЛИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, **НЕ ЗАТРАГИВАЯ** АКТИВНОГО ЦЕНТРА.
- ПРИСОЕДИНЯЮТСЯ К МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА **ВНЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА.**
- ПРИСОЕДИНЕНИЕ СУБСТРАТА  
ЛИБО **ОБЛЕГЧАЕТСЯ** (АКТИВАТОРЫ),  
ЛИБО **СТАНОВИТСЯ НЕВОЗМОЖНЫМ**  
(ИНГИБИТОРЫ)

# Схема, поясняющая работу аллостерического фермента.

А - действие отрицательного эффектора (ингибитора); Б - действие положительного эффектора (активатора).



# Эффекторы V-типа изменяют значение $V_{max}$



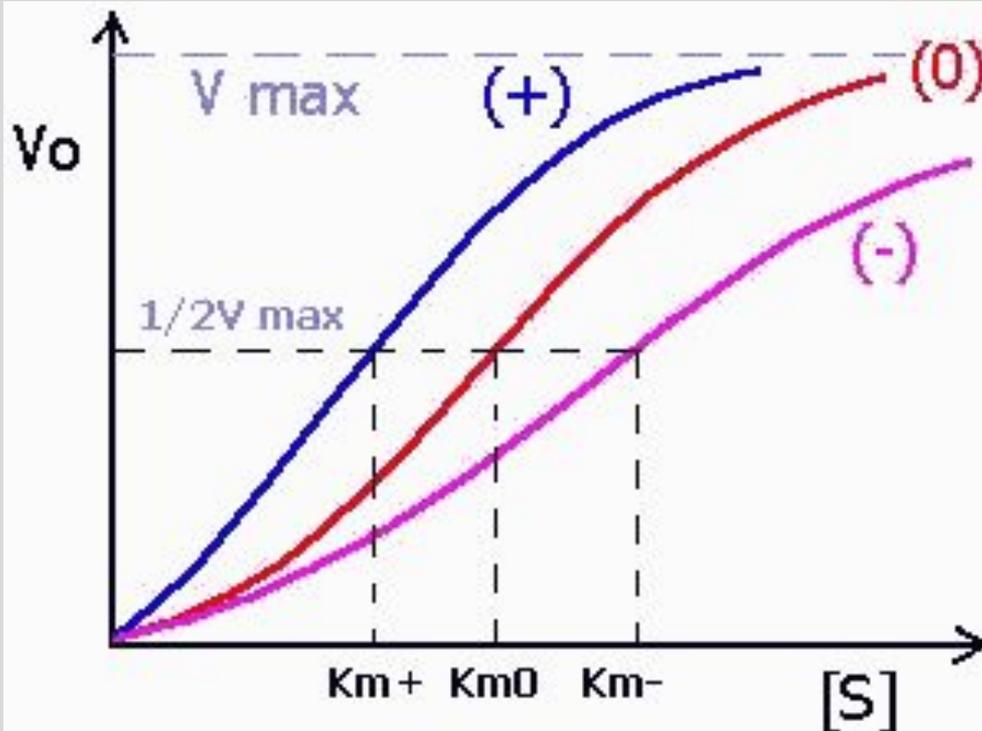
Влияние аллостерических  
эффекторов V-типа:

(+) активатор

(0) нет эффектора

(-) ингибитор

# Эффекторы **K**-типа изменяют значение $K_M$



влияние аллостерических  
эффекторов K-типа  
(-) эффектор (ингибитор)  
(+) эффектор (активатор)  
(0) нет эффектора

# ОСОБЕННОСТИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

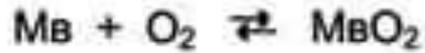
1. НАЛИЧИЕ **СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ**, ПРОСТРАНСТВЕННО УДАЛЕННЫХ ОТ КАТАЛИТИЧЕСКОГО (АКТИВНОГО) ЦЕНТРА
2. СОСТОЯТ ИЗ **НЕСКОЛЬКИХ СУБЪЕДИНИЦ**
3. ГРАФИК ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА ИМЕЕТ **S-ОБРАЗНУЮ ФОРМУ**, ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О КООПЕРАТИВНОСТИ ПРОЦЕССА

# УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА



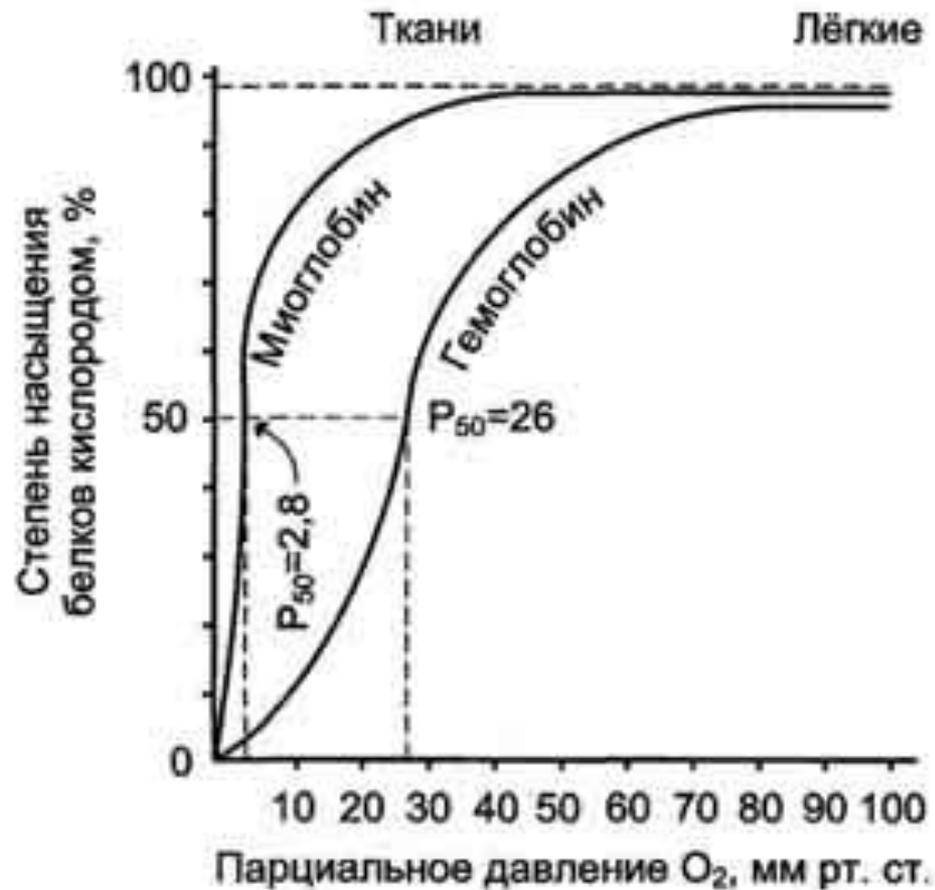
Арчибальд Хилл  
1886-1977

В 1909 ГОДУ **А. ХИЛЛ** ПРЕДЛОЖИЛ  
МОДЕЛЬ СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА С  
ГЕМОГЛОБИНОМ, КОТОРАЯ  
СООТВЕТСТВОВАЛА  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ.

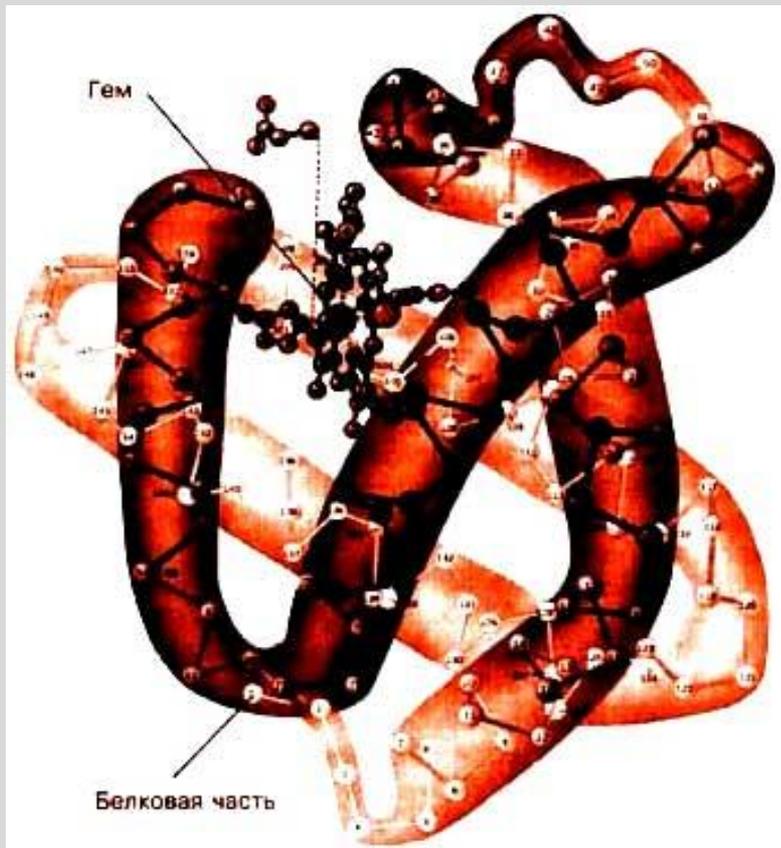


Дезоксиммиоглобин    Оксиммиоглобин

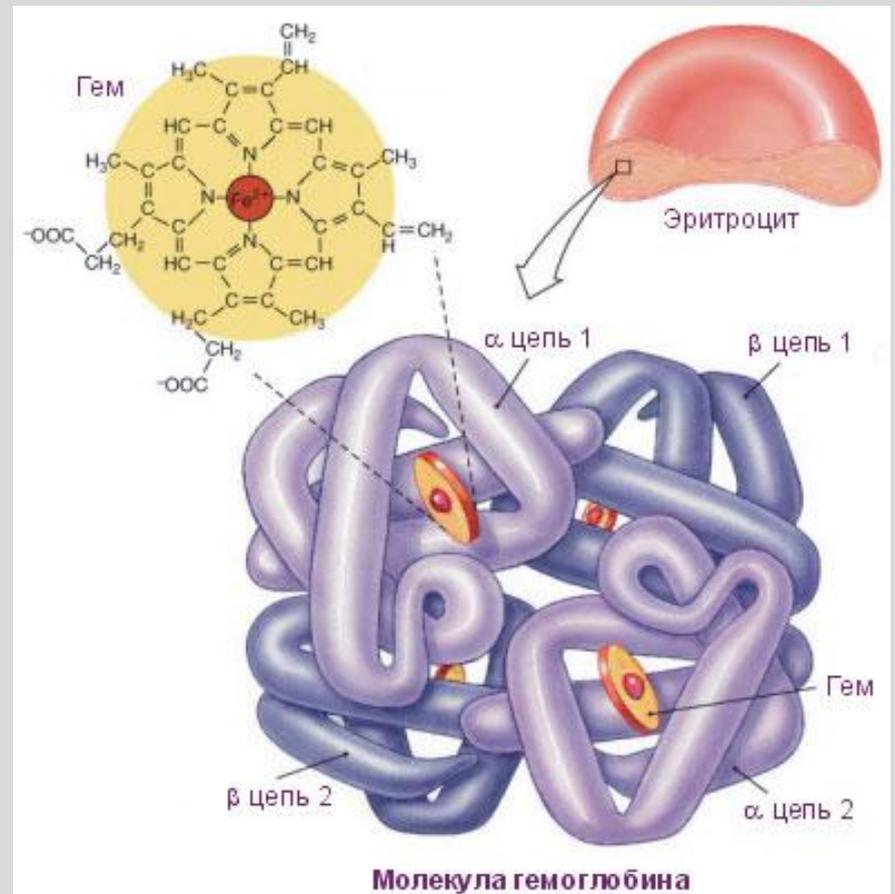
Схема



**Кривые ассоциации кислорода для миоглобина и гемоглобина в зависимости от парциального давления кислорода**

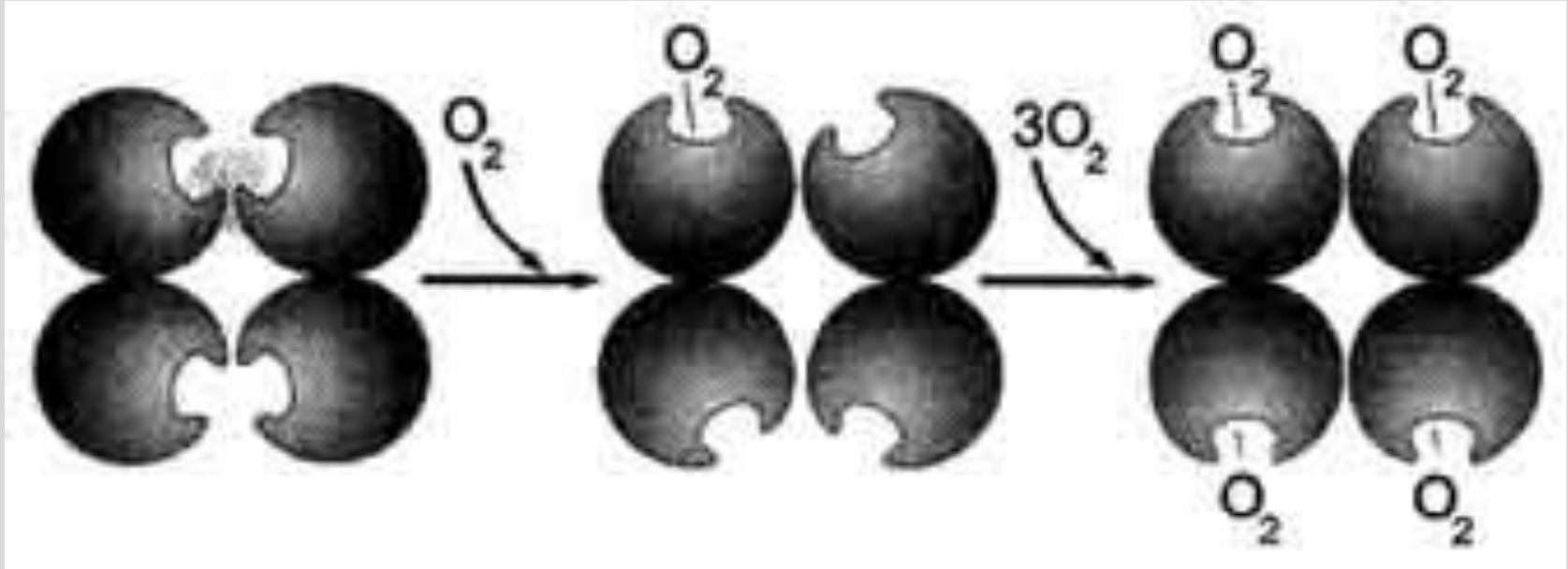


МИОГЛОБИН



гемоглобин

# Кооперативные изменения конформации протомеров гемоглобина при присоединении $O_2$ .



ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА НА МОЛЕКУЛАХ ГЕМОГЛОБИНА ЯВЛЯЮТСЯ **ЗАВИСИМЫМИ**: ПРИСОЕДИНЕНИЕ ОДНОЙ МОЛЕКУЛЫ КИСЛОРОДА К ОДНОМУ ЦЕНТРУ УВЕЛИЧИВАЕТ СРОДСТВО К КИСЛОРОДУ ДРУГИХ ЦЕНТРОВ.

# ***КООПЕРАТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ***

КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ИДЕНТИЧНЫХ ЦЕНТРОВ  
ИЗМЕНЯЮТСЯ ПО МЕРЕ ИХ ЗАПОЛНЕНИЯ,

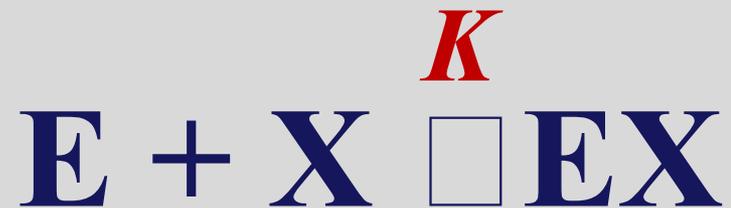
## **А. ХИЛЛ** РАССМОТРЕЛ МОДЕЛЬ **МАКСИМАЛЬНОЙ** **КООПЕРАТИВНОСТИ**

В **РАВНОВЕСНОМ** РАСТВОРЕ ЛИГАНДА **X** И  
МАКРОМОЛЕКУЛ ПРИСУТСТВУЮТ

□ ЛИБО МАКРОМОЛЕКУЛЫ С **НЕЗАНЯТЫМИ**  
**ЦЕНТРАМИ,**

□ ЛИБО КОМПЛЕКСЫ ЛИГАНДА С МАКРОМОЛЕКУЛАМИ,  
У КОТОРЫХ **ВСЕ ЦЕНТРЫ ЗАНЯТЫ.**

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА **EX** МОЖНО  
РАССМАТРИВАТЬ КАК КИНЕТИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ,  
КОНСТАНТА КОТОРОЙ РАВНА ***K***



# УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА

$K$



$K$  – КОНСТАНТА  
СВЯЗЫВАНИЯ

$$K = \frac{[EX]}{[E][X]}$$

ОТСЮДА

$$[EX] = K [E][X]$$

$$Y = \frac{[EX]}{[E] + [EX]}$$

Y – СТЕПЕНЬ  
НАСЫЩЕНИЯ  
БЕЛКА ЛИГАНДОМ

$$Y = \frac{K[E][X]}{[E] + K[E][X]} = \frac{K[X]}{1 + K[X]}$$

$$Y = \frac{K_h [X]^h}{1 + K_h [X]^h}$$

**УРАВНЕНИЕ  
ХИЛЛА**

ПРЕОБРАЗУЕМ ЭТО УРАВНЕНИЕ (ЗАПИШЕМ В  
ОБРАТНОЙ ФОРМЕ)

$$\frac{1}{Y} = \frac{1 + K_h [X]^h}{K_h [X]^h} = 1 + \frac{1}{K_h [X]^h}$$

$$\frac{1}{Y} - 1 = \frac{1}{K_h [X]^h}$$

$$\frac{1 - Y}{Y} = \frac{1}{K_h [X]^h}$$

ПЕРЕПИШЕМ ЭТО УРАВНЕНИЕ В ОБРАТНОЙ  
ФОРМЕ И ЗАТЕМ ПРОЛОГАРИФМИРУЕМ

$$\frac{Y}{1 - Y} = K_h [X]^h$$

$$\lg \left[ \frac{Y}{1 - Y} \right] = \lg K_h + h \lg [X]$$

НА ОСНОВАНИИ ЭТОГО УРАВНЕНИЯ СТРОИМ  
ГРАФИК ХИЛЛА

$\lg[Y/1-Y]$

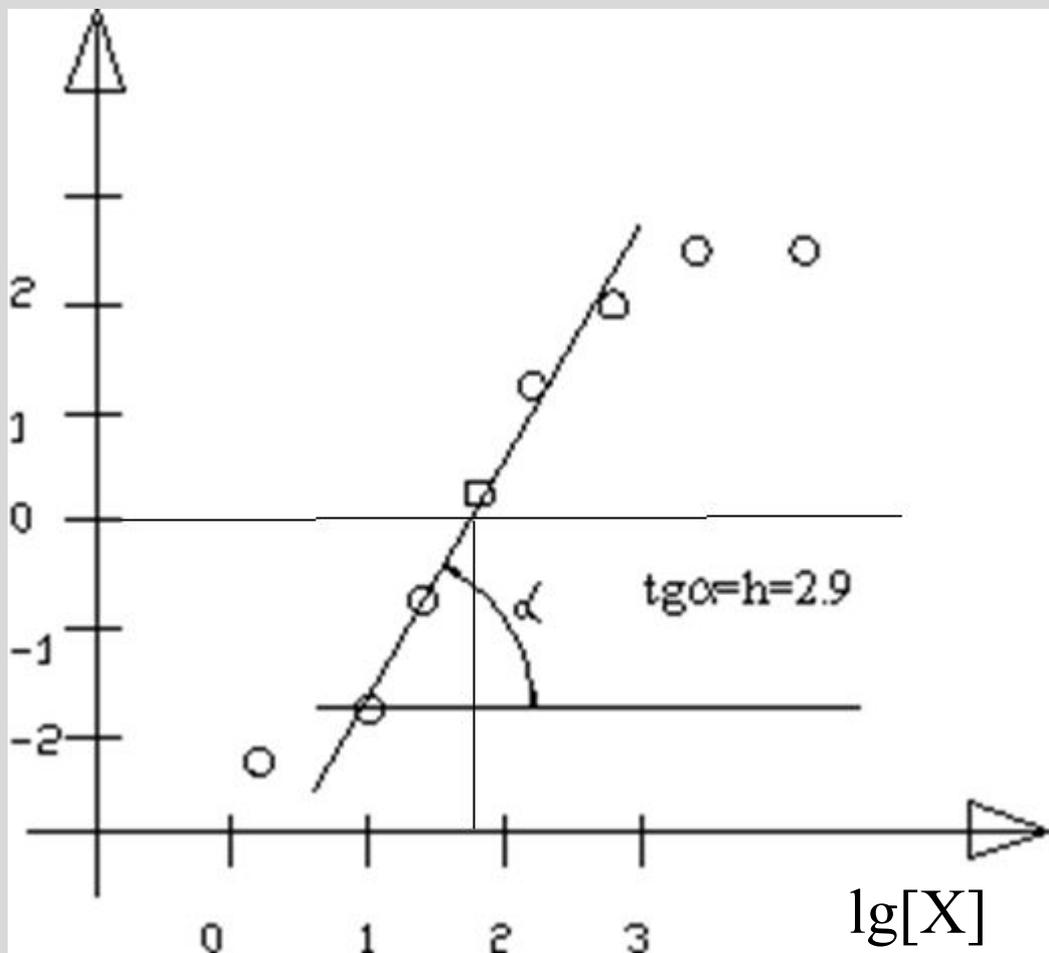


График Хилла для насыщенного кислородом гемоглобина

Уравнение Хилла удовлетворительно описывает связывание лигандов аллостерическими белками в интервале от 10 до 90% насыщения.

За пределами этого интервала экспериментальная кривая отклоняется от прямой.

НА ЭТОМ ГРАФИКЕ МОЖНО НАЙТИ КОНСТАНТУ СВЯЗЫВАНИЯ  $K_h$  И КОЭФФИЦИЕНТ Хилла  $h$  ( $tg\alpha$ ), КОТОРЫЙ ХАРАКТЕРИЗУЕТ СТЕПЕНЬ КООПЕРАТИВНОСТИ

ЕСЛИ  $h=1$ , ТО КООПЕРАТИВНОСТЬ ОТСУТСТВУЕТ

МАКСИМАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ  $h$  РАВНО ЧИСЛУ ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ.

ЕСЛИ  $h > 1$ , ТО ИМЕЕТ МЕСТО **ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ**  
**КООПЕРАТИВНОСТЬ.**

Присоединение одной молекулы лиганда к активному центру фермента **увеличивает сродство** к лиганду остальных активных центров

ЕСЛИ  $h < 1$ , ТО ИМЕЕТ МЕСТО **ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ**  
**КООПЕРАТИВНОСТЬ.**

Присоединение одной молекулы лиганда к активному центру фермента **уменьшает сродство** к лиганду остальных активных центров.

## Физиологическое значение кооперативного связывания:

положительная кооперативность обеспечивает резкое изменение **степени сродства** в очень узком диапазоне концентраций лиганда.

# МОДЕЛИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

СУБЪЕДИНИЦЫ ФЕРМЕНТА МОГУТ НАХОДИТЬСЯ В ДВУХ КОНФОРМАЦИЯХ:

**R** (relaxed – расслабленное состояние)

**T** (tense – напряженное состояние).

КОНФОРМАЦИЯ **R** ИМЕЕТ **ВЫСОКОЕ СРОДСТВО** К СУБСТРАТУ

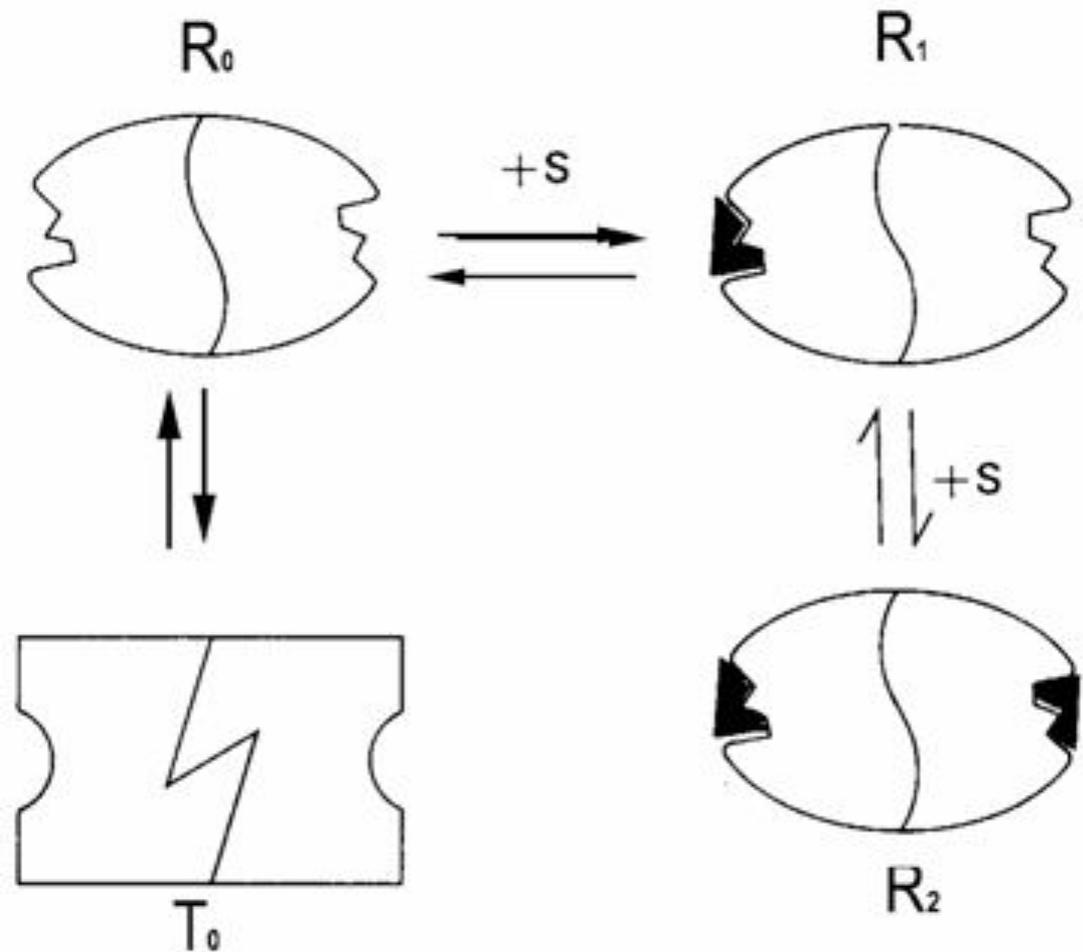
КОНФОРМАЦИЯ **T** ИМЕЕТ **НИЗКОЕ СРОДСТВО** К СУБСТРАТУ



Жак  
Моно

# Модель согласованного механизма (симметричная модель)

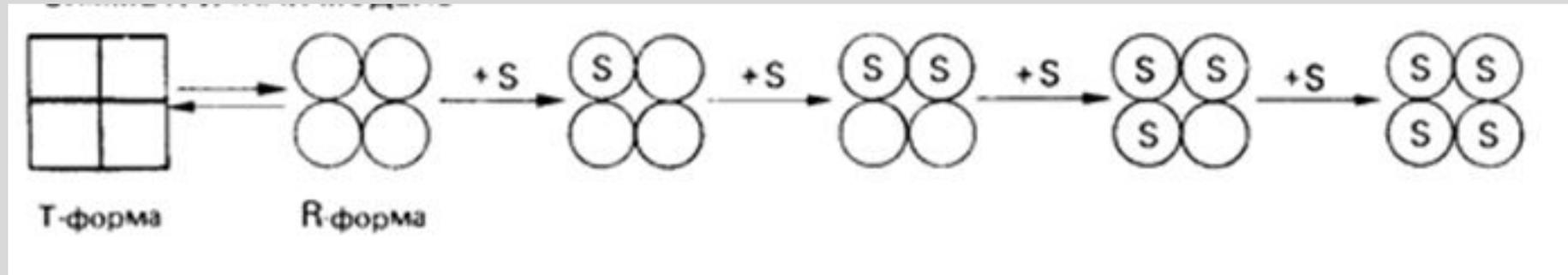
1965 г., Жак Моно, Джеффри Уайман и  
Жан-Пьер Шанже

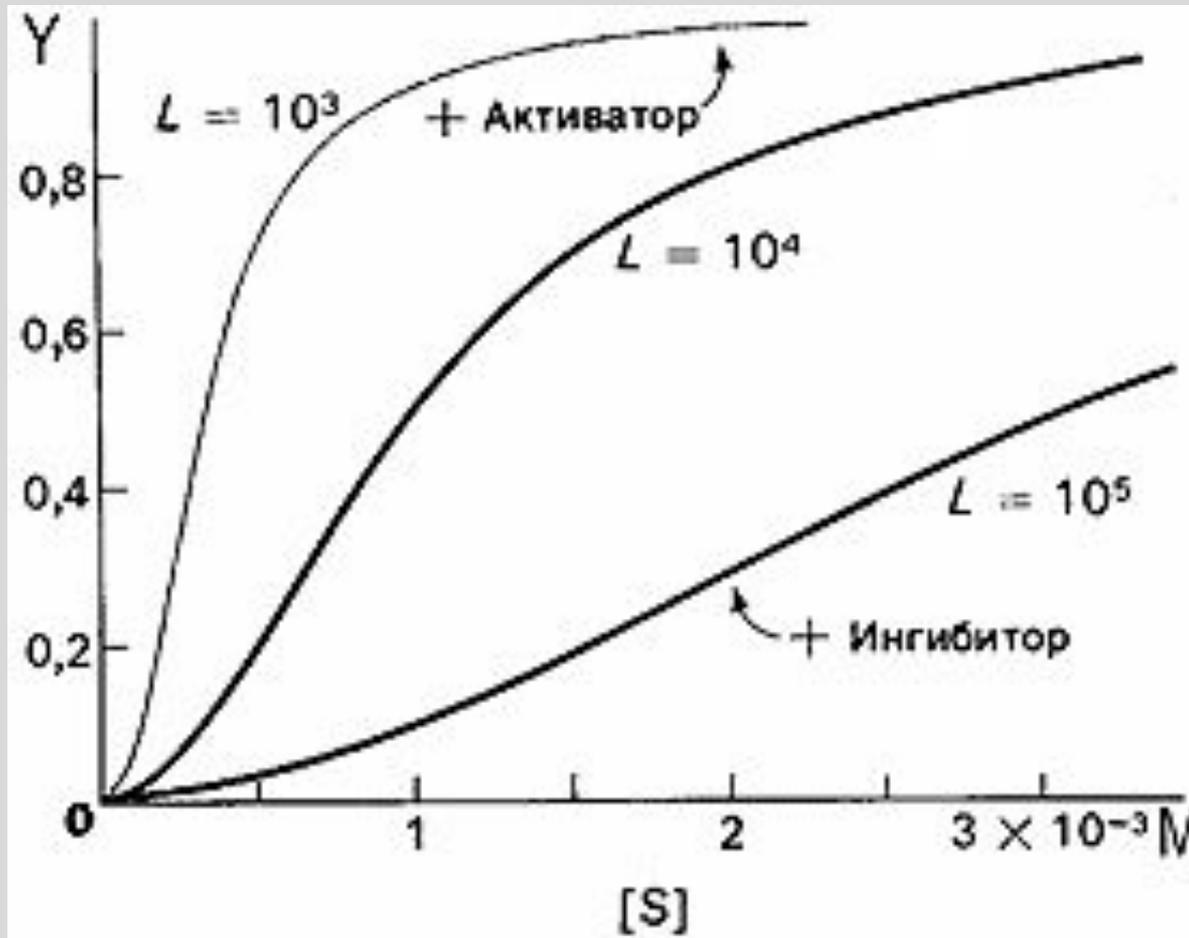


Присоединение **первой** молекулы субстрата сопровождается переходом **ТТ-формы** с низким сродством к субстрату **в RR-форму** с высоким сродством.

ФОРМЫ **R** и **T** МОГУТ ПЕРЕХОДИТЬ ДРУГ В ДРУГА, НО СУЩЕСТВОВАНИЕ ФОРМЫ **RT** ЗАПРЕЩЕНО

Фермент представлен только двумя конформационными состояниями, находящимися в динамическом равновесии. При этом все субъединицы данной молекулы фермента находятся в одной и той же конформации; промежуточных состояний нет, существуют только симметричные олигомеры





$L$  – константа аллостерического равновесия

$$L = T/R$$

Зависимость степени насыщения  $Y$  активных центров фермента от концентрации субстрата  $[S]$  в соответствии с моделью согласованного механизма  $K_R = 10^{-5} \text{ M}$ .



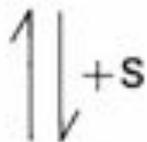
# Модель последовательного механизма

**Дэниел Кошланд**  
(1920–2007)

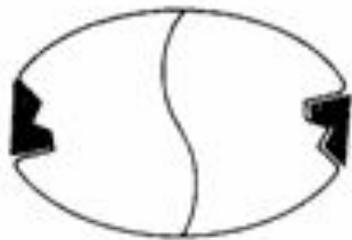
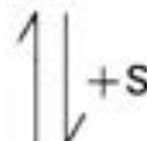
Автор: Даниэль Кошланд



TT



RT

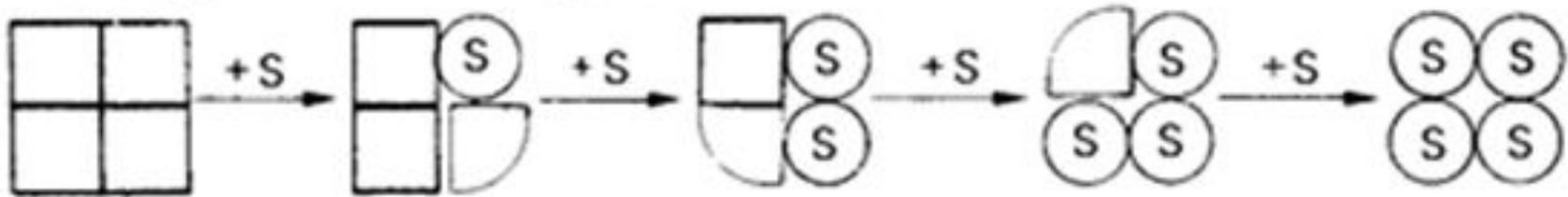


RR

ВОЗМОЖНО СУЩЕСТВОВАНИЕ  
ФОРМЫ **RT**

1. Каждая *субъединица* может существовать в одном из двух возможных конформационных состояний (R или T).
2. Связывание субстрата изменяет форму той субъединицы, к которой он присоединяется. Конформация другой субъединицы при этом существенно **не меняется**.
- 3 Конформационные изменения, вызванные связыванием субстрата на одной субъединице, могут **увеличивать** или **уменьшать** сродство к субстрату другой субъединицы той же молекулы фермента.

## "ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ"



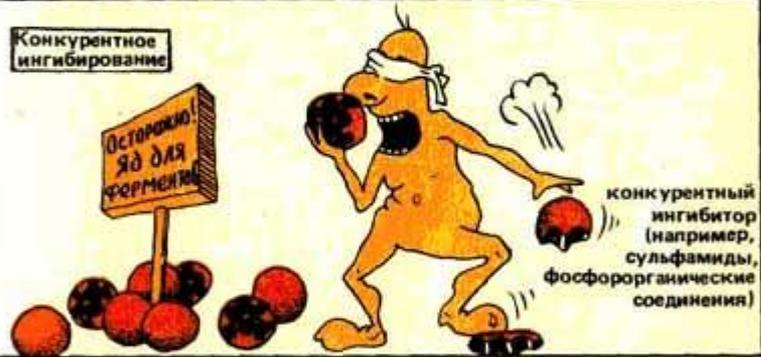
Фермент приобретает каталитически активную конформацию только в результате взаимодействия с субстратом. Если фермент состоит из нескольких субъединиц, то конформационное изменение одной из них, вызванное субстратом, последовательно передается другим субъединицам и облегчает им связывание добавочных молекул субстрата.

# ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Реакция в отсутствие ингибитора



Конкурентное ингибирование

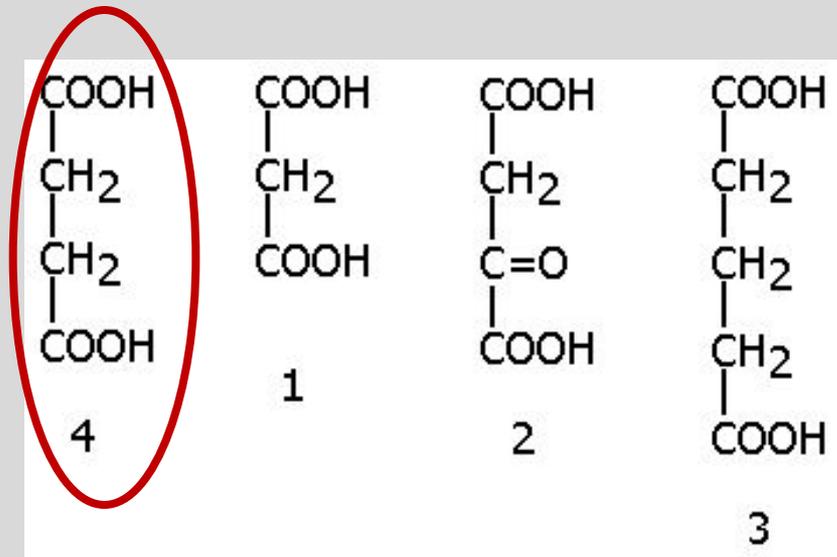


Неконкурентное ингибирование

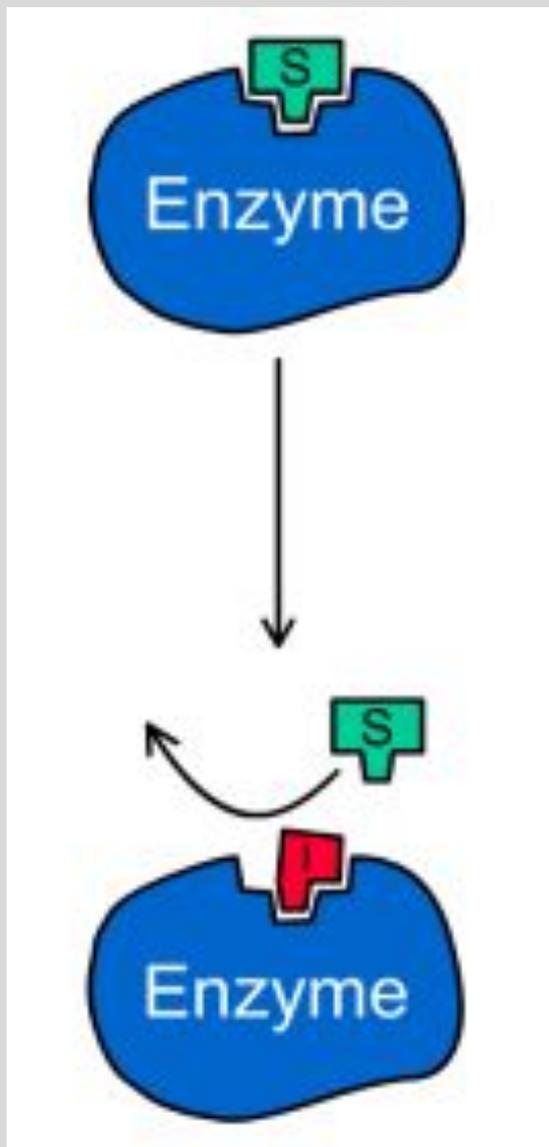


# КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

За активный центр фермента вместе с субстратом конкурирует ИНГИБИТОР



Так, малоновая (1), щавелевоуксусная (2) и глутаровая (3) кислоты ингибируют фермент СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗУ, субстратом которой является **янтарная кислота** (4) (СУКЦИНАТ), так как они сходны по строению с субстратом

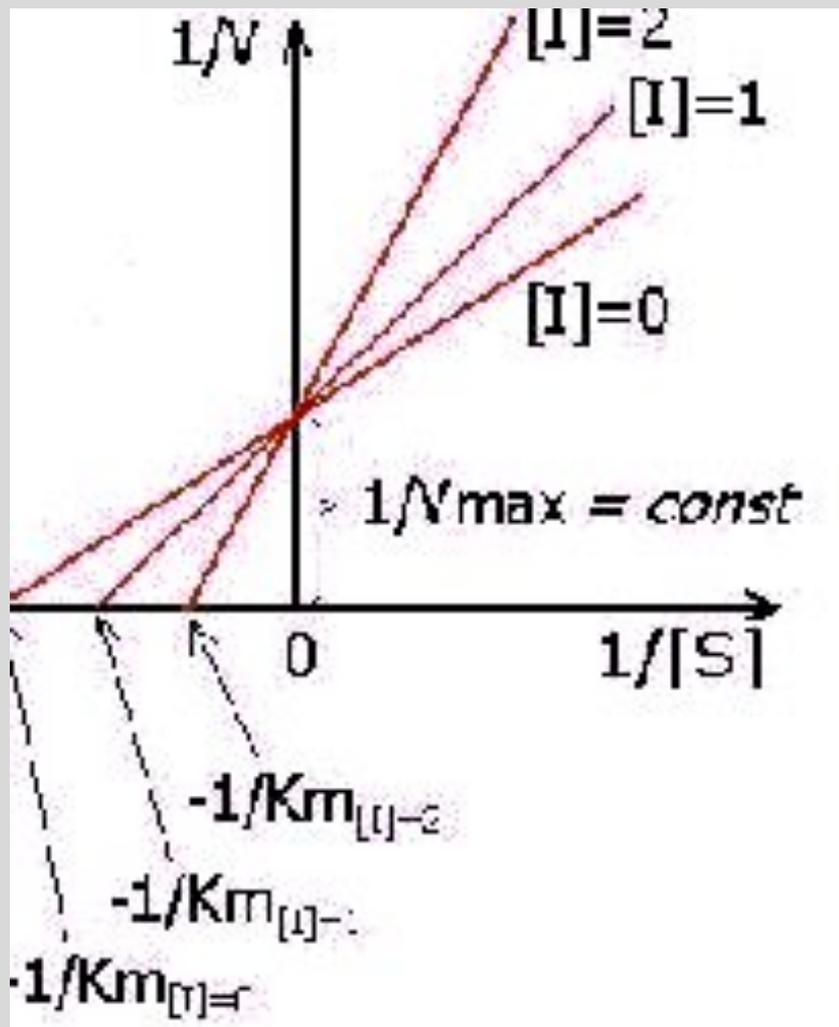


Ингибитор связывается в **АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФЕРМЕНТА** и конкурирует за него с субстратом.



УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА – БЕРКА для **КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ**

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



ИЗМЕНЕНИЕ  
 ГРАФИКА  
 ЛАЙНУИВЕРА –  
 БЕРКА В СЛУЧАЕ  
 КОНКУРЕНТНОГО  
 ИНГИБИРОВАНИЯ

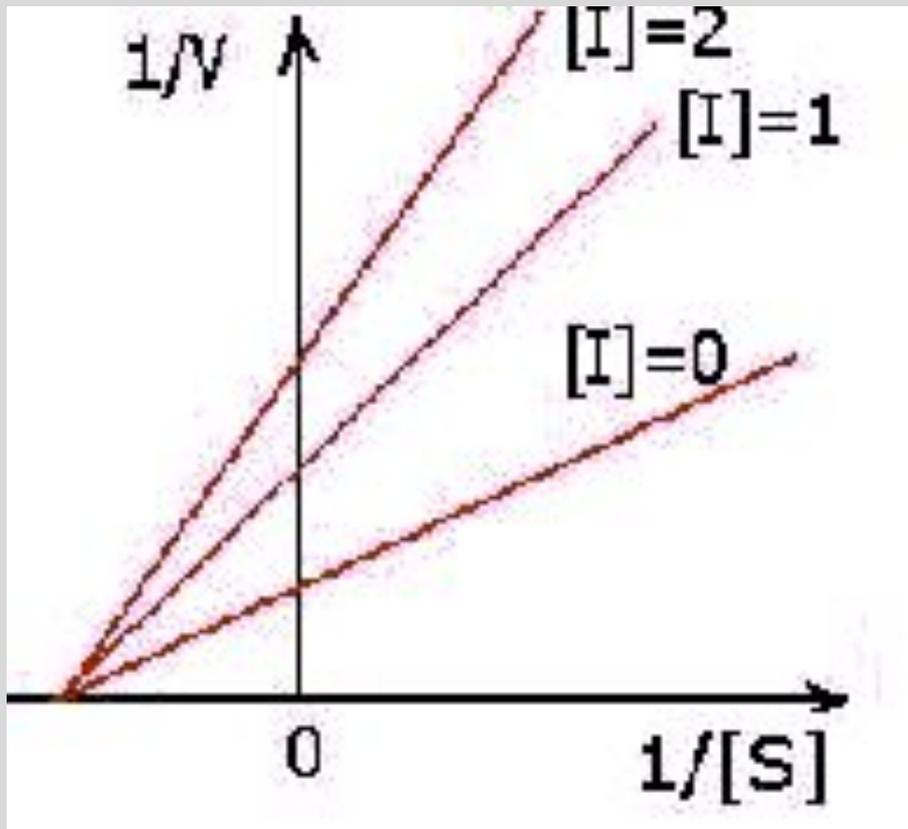
Максимальная скорость реакции  $V_{max}$   
 не меняется, а константа Михаэлиса  
 увеличивается в  $(1 + [I]/K_i)$  раз

# НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

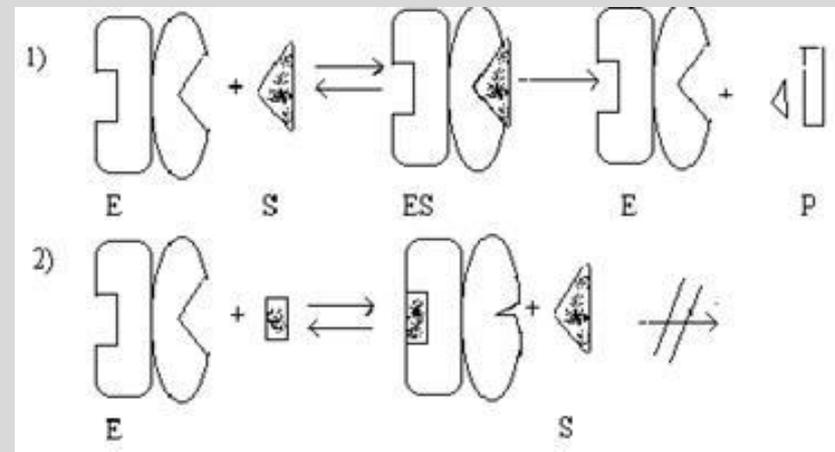
ИНГИБИТОР связывается с ФЕРМЕНТОМ **ВНЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА**, но при этом меняется структура активного центра и связь с субстратом становится невозможной  
ОБРАЗУЕТСЯ НЕАКТИВНЫЙ КОМПЛЕКС **ESI**

УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА – БЕРКА для НЕКОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

$$\frac{1}{V} = \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \left( \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \right)$$

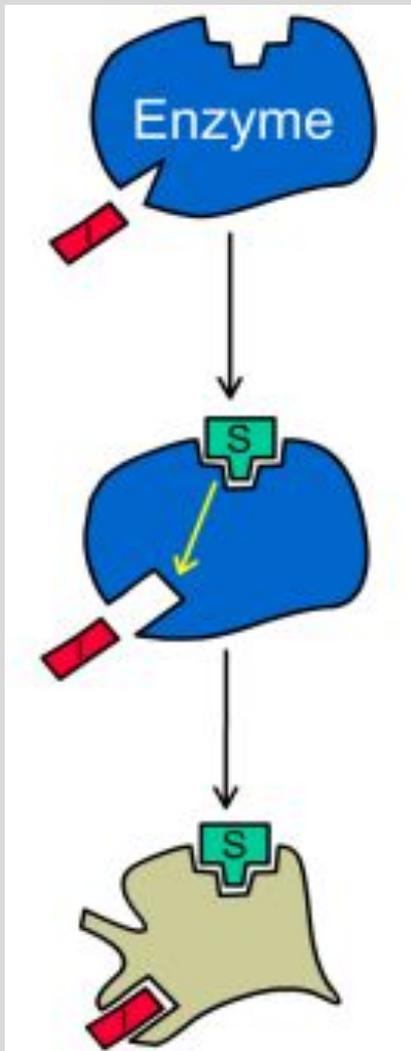


ИЗМЕНЕНИЕ  
ГРАФИКА  
ЛАЙНУИВЕРА –  
БЕРКА В СЛУЧАЕ  
НЕКОНКУРЕНТНОГО  
ИНГИБИРОВАНИЯ



Константа Михаэлиса не изменяется, а максимальная скорость реакции уменьшается в  $(1 + [I]/K_i)$  раз

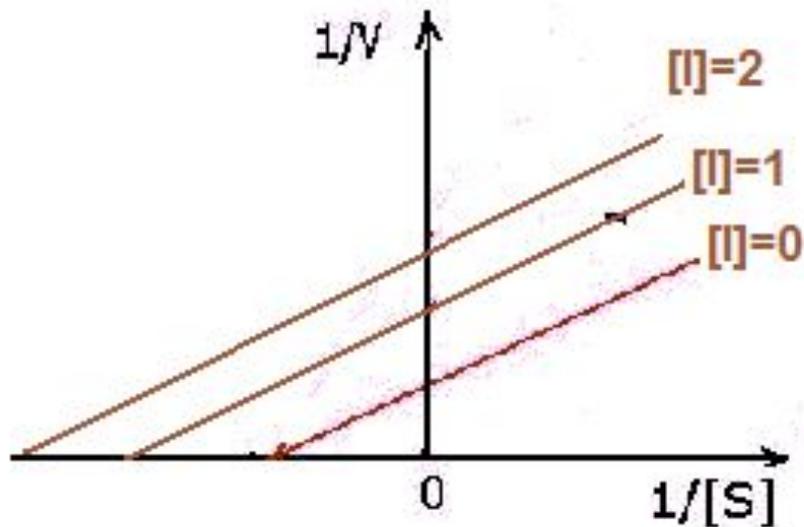
# БЕСКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ



Ингибитор связывается только с **фермент-субстратным комплексом**, но не со свободным ферментом.

Субстрат, связываясь с ферментом, изменяет его конформацию, что делает возможным связывание с ингибитором. Ингибитор, в свою очередь, так меняет конформацию фермента, что катализ становится невозможным.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{V_{\max}}$$



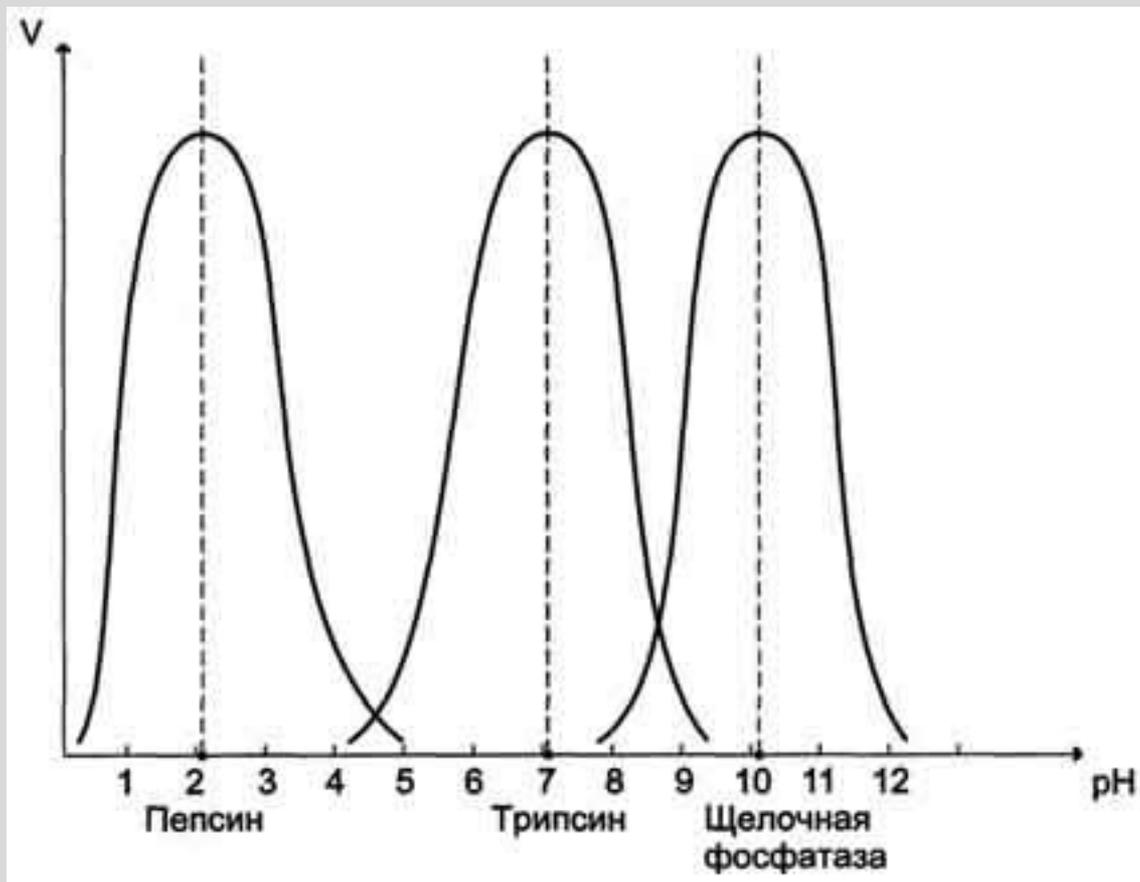
ИЗМЕНЕНИЕ ГРАФИКА  
Лайнуивера – Берка  
В СЛУЧАЕ  
**БЕСКОНКУРЕНТНОГО**  
ИНГИБИРОВАНИЯ

Максимальная скорость реакции и константа  
Михаэлиса уменьшаются в одинаковое число раз.

## Зависимость скорости ферментативной реакции ( $V$ ) от температуры



## Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от pH среды.



# Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимальное значение pH
Пепсин	1,5-2
Пируват-карбоксилаза	4,8
Каталаза	6,8-7
Фумараза	6,5
Уреаза	6,8-7,2
Кабоксипептидаза	7,5
Трипсин	6,5-7,5
Аргиназа	9,5-9,9