

ЛИНЕЙНЫЕ
ПРЕОБРАЗОВАНИЯ
УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА
- МЕНТЕН

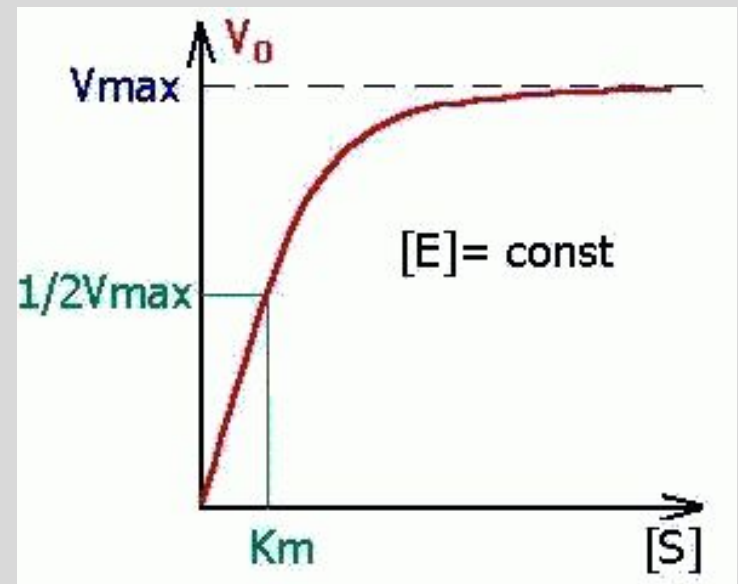
Константа Михаэлиса измеряется в молях на литр и колеблется от 10^{-2} до 10^{-7} моль/л.

Чем меньше K_M , тем активнее фермент.

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

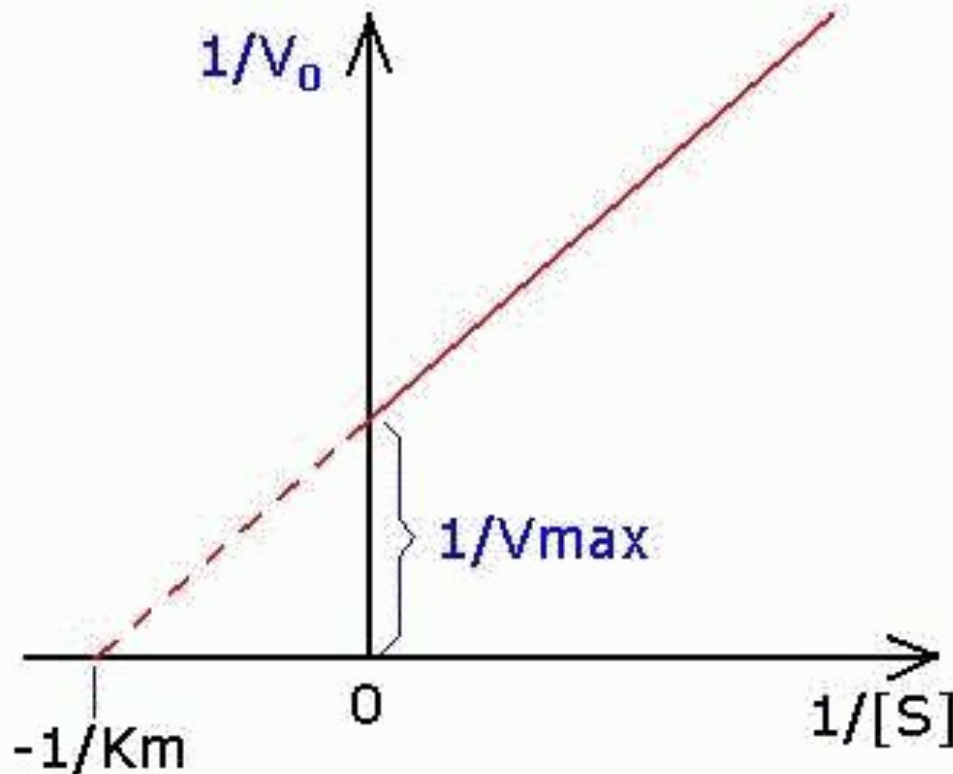
Однако определение V_{\max} и K_M затруднительно.

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



УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА - БЕРКА

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

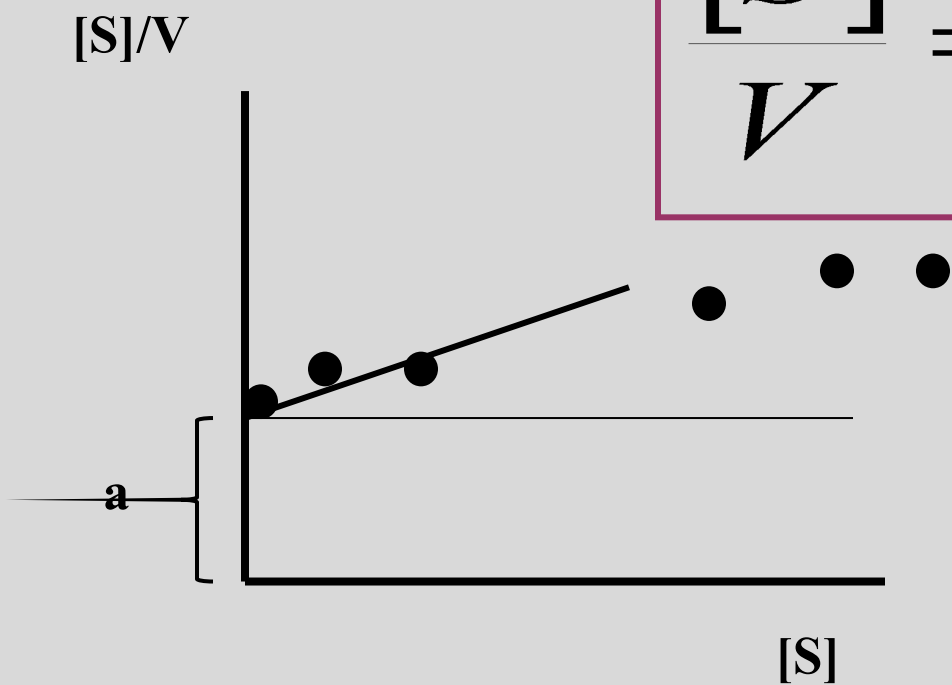


$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_M}{V_{\max}}$$

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

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

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



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

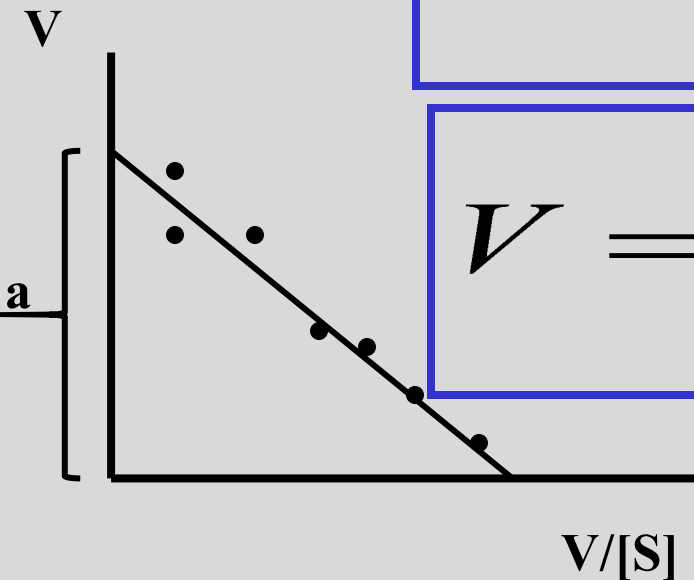
$$\text{tg}\alpha = 1/V_{\max}$$

УРАВНЕНИЕ **ИДИ** - **ХОФСТИ**

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

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

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

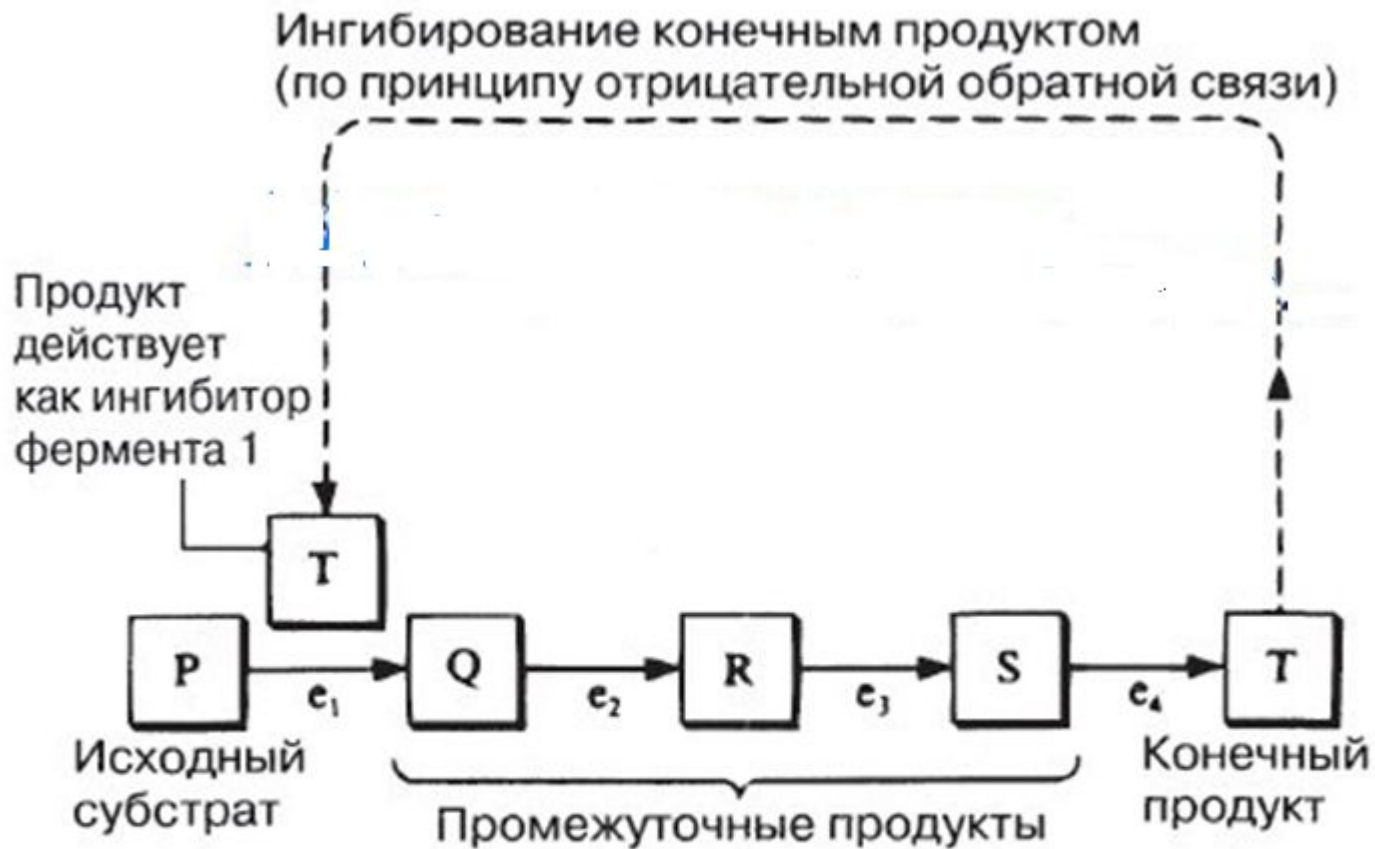


$$a = V_{\max}; \operatorname{tg} \alpha = -K_M$$

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



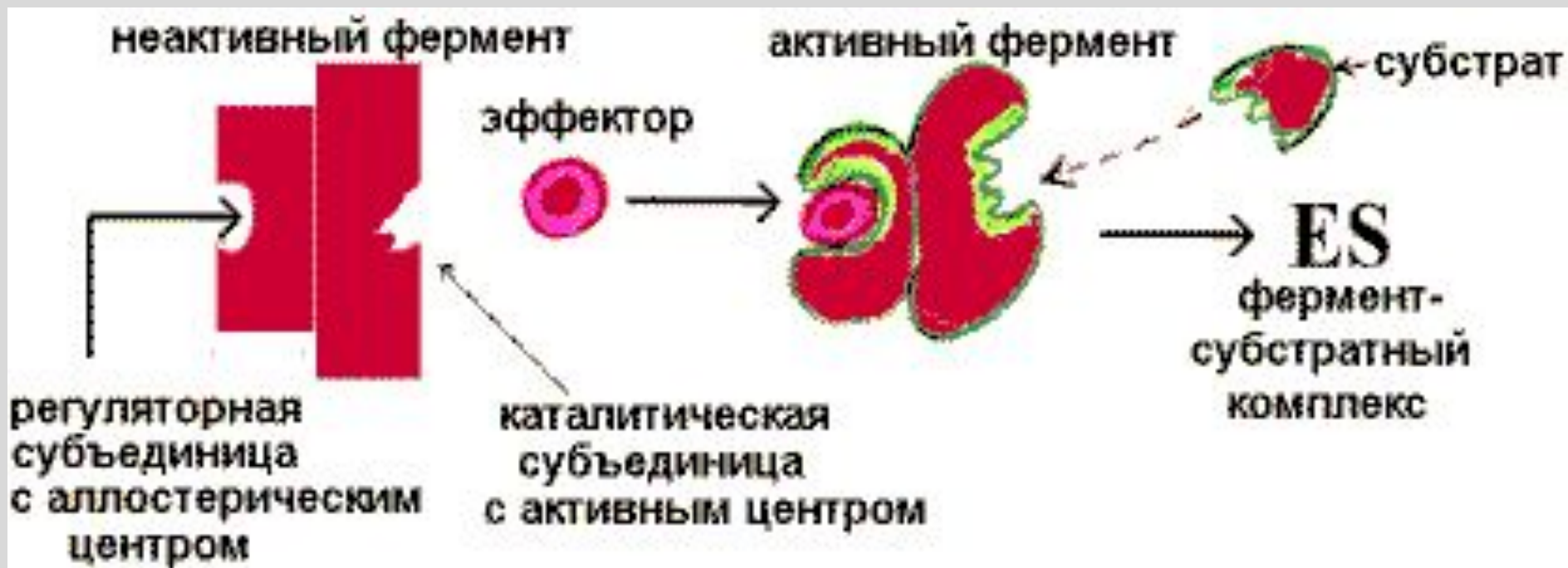
Ингибирование конечным продуктом. Специфические ферменты, катализирующие отдельные этапы данного метаболического пути, обозначены буквами $e_1 - e_4$.

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

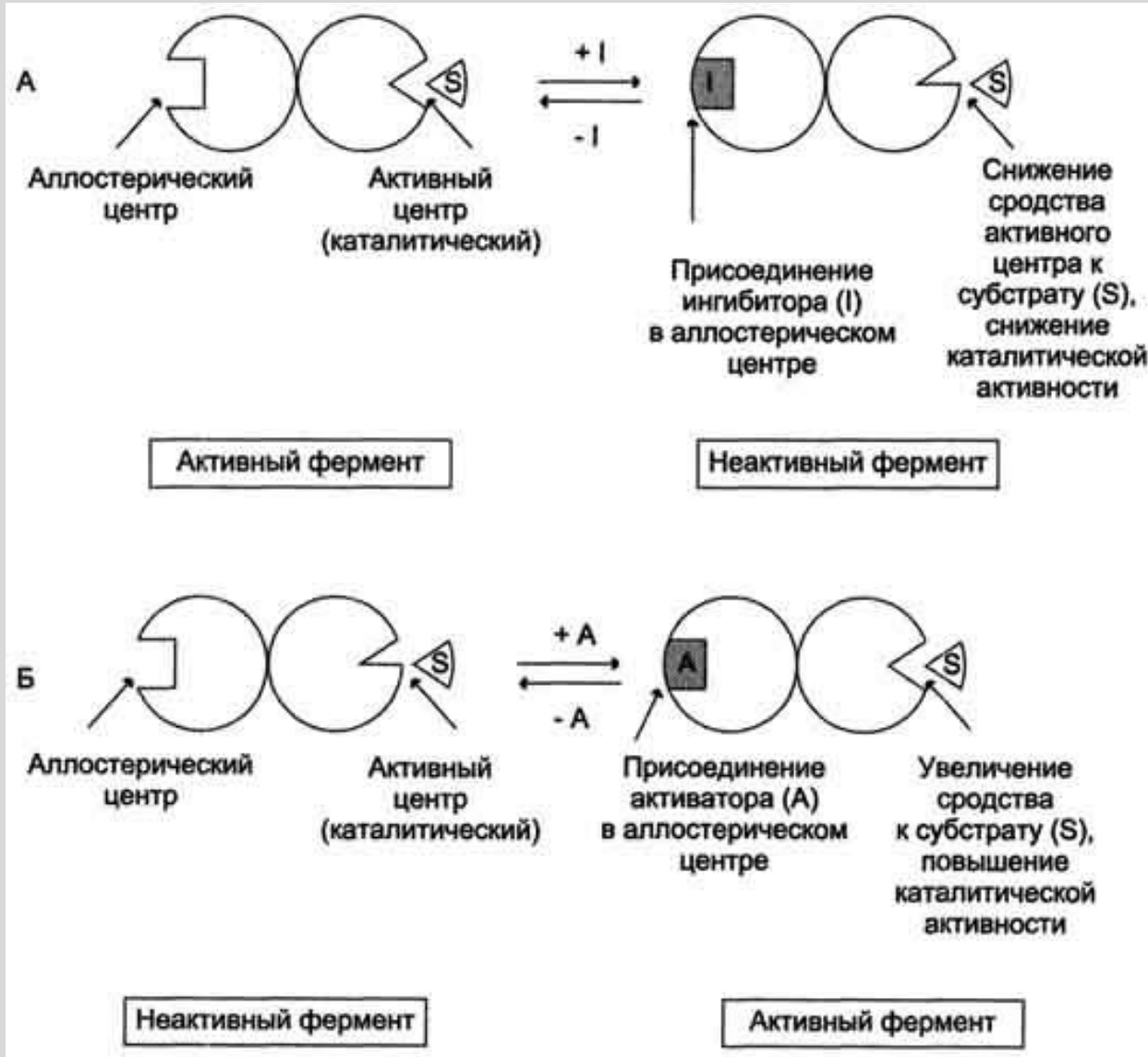


ОСОБЕННОСТИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОРОВ

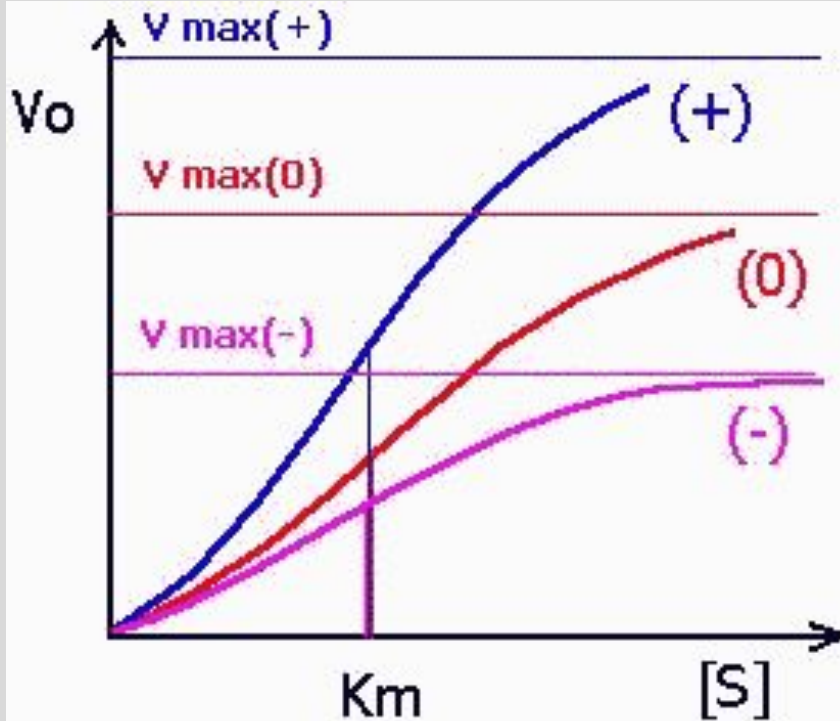
- РЕГУЛИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, **НЕ ЗАТРАГИВАЯ** АКТИВНОГО ЦЕНТРА.
- ПРИСОЕДИНЯЮТСЯ К МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА **ВНЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА.**
- ПРИСОЕДИНЕНИЕ СУБСТРАТА
ЛИБО **ОБЛЕГЧАЕТСЯ** (АКТИВАТОРЫ),
ЛИБО **СТАНОВИТСЯ НЕВОЗМОЖНЫМ**
(ИНГИБИТОРЫ)

Схема, поясняющая работу аллостерического фермента.

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



Эффекторы V-типа изменяют значение V_{max}



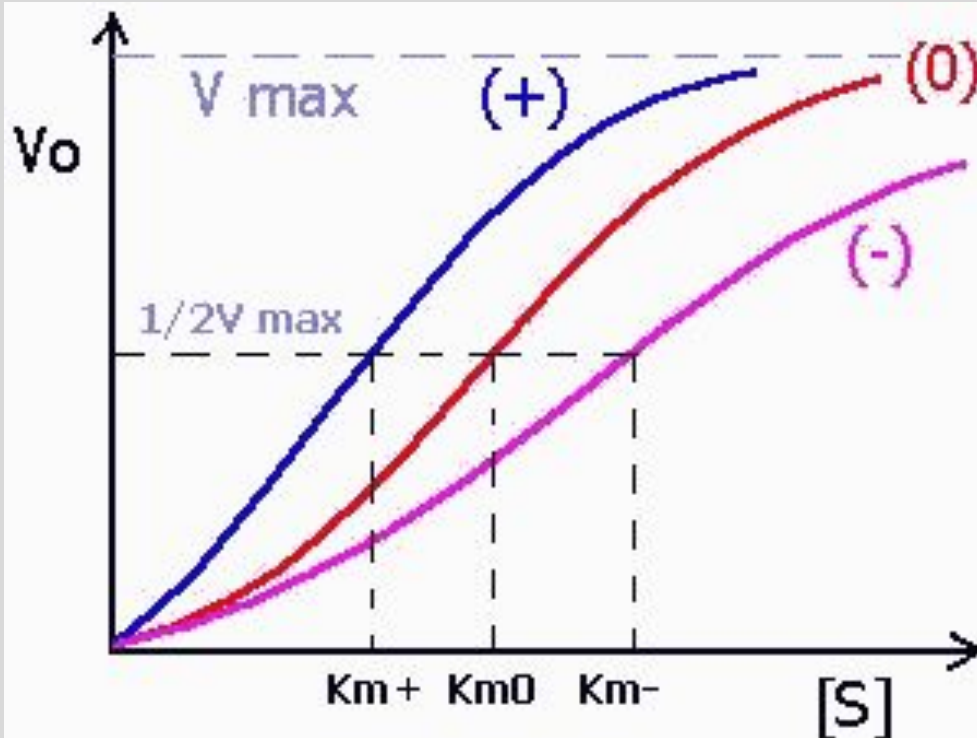
Влияние аллостерических
эффекторов V-типа:

(+) 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

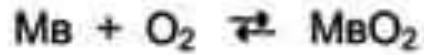
1. НАЛИЧИЕ **СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ**, ПРОСТРАНСТВЕННО УДАЛЕННЫХ ОТ КАТАЛИТИЧЕСКОГО (АКТИВНОГО) ЦЕНТРА
2. СОСТОЯТ ИЗ **НЕСКОЛЬКИХ СУБЪЕДИНИЦ**
3. ГРАФИК ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА ИМЕЕТ **S-ОБРАЗНУЮ ФОРМУ**, ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О КООПЕРАТИВНОСТИ ПРОЦЕССА

УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА



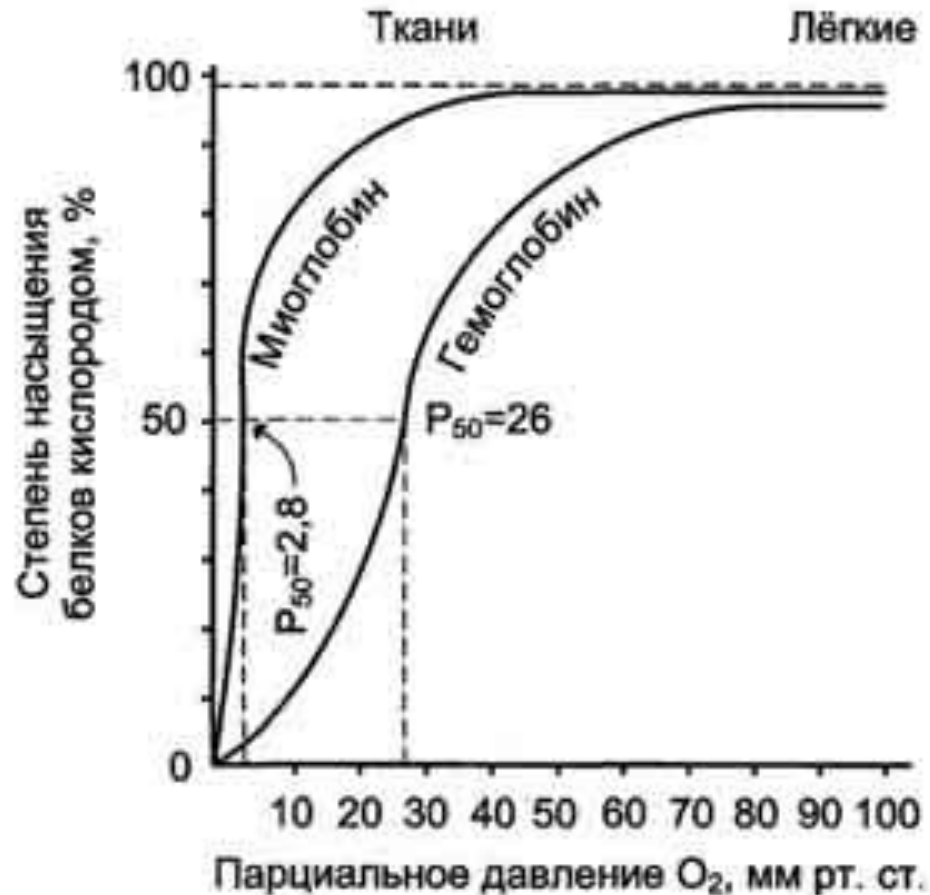
Арчибальд Хилл
1886-1977

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

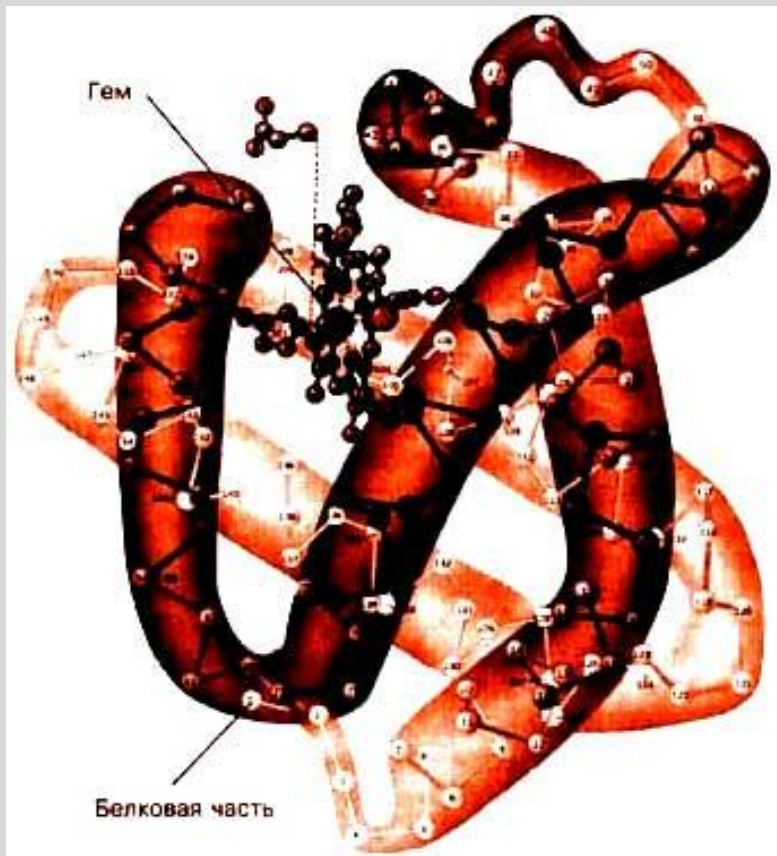


Дезоксиммиоглобин Оксиммиоглобин

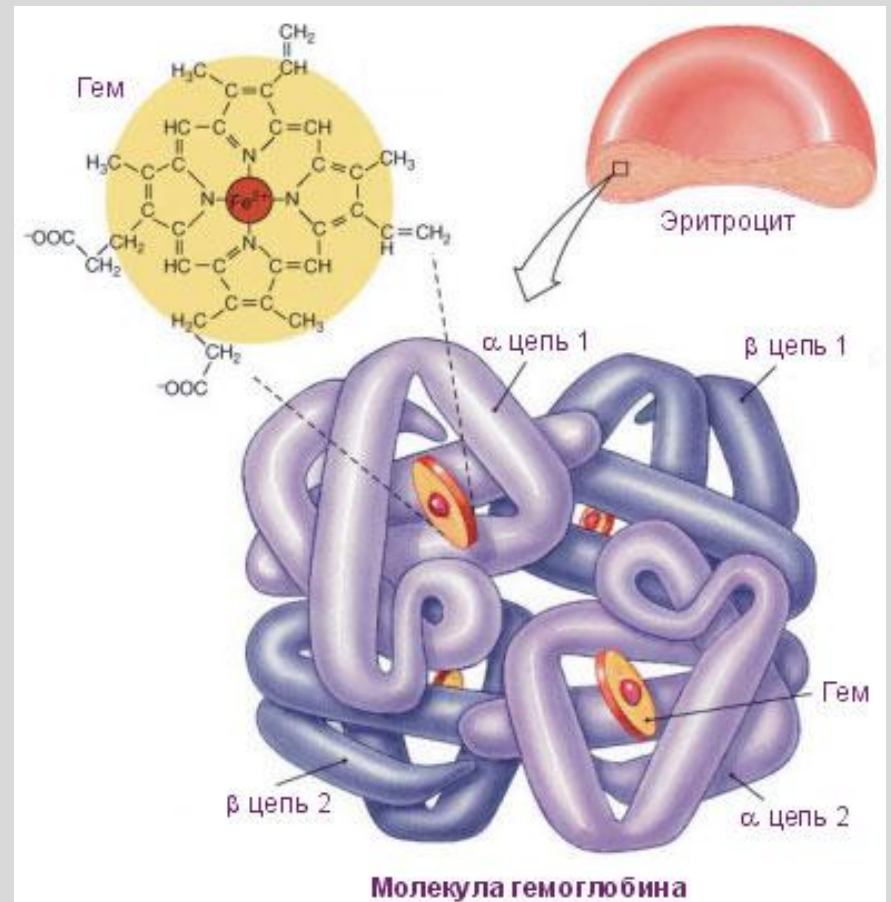
Схема



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

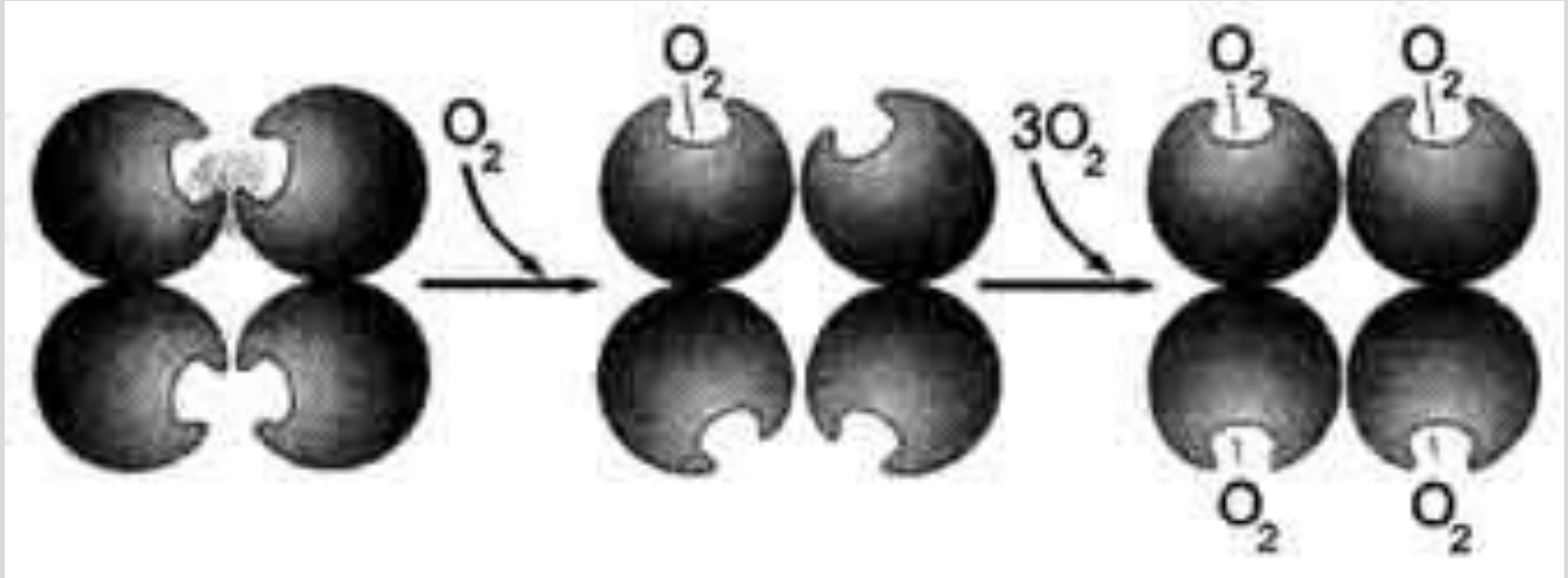


МИОГЛОБИН



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,

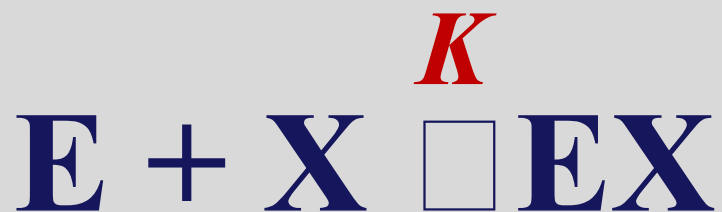
А. ХИЛЛ РАССМОТРЕЛ МОДЕЛЬ **МАКСИМАЛЬНОЙ** **КООПЕРАТИВНОСТИ**

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

$\lg[Y/1-Y]$

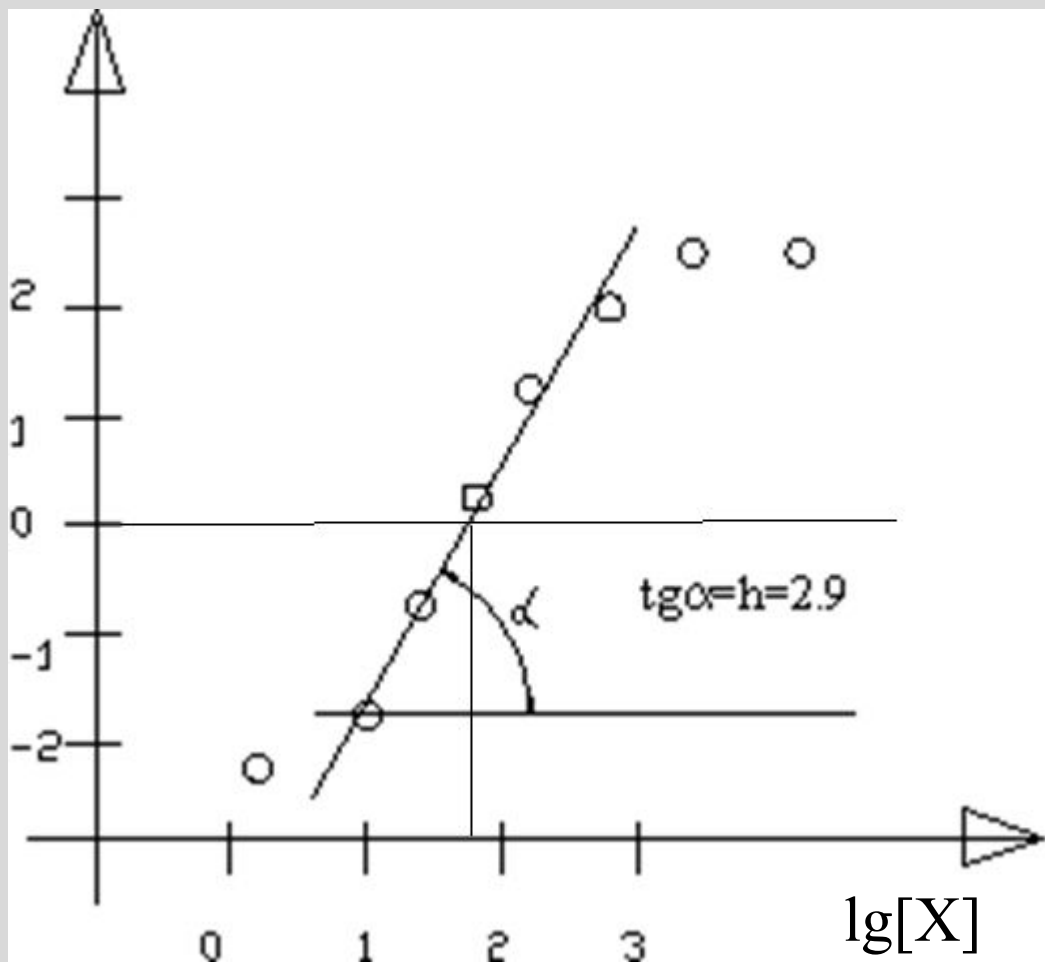


График Хилла для насыщенного кислородом гемоглобина

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

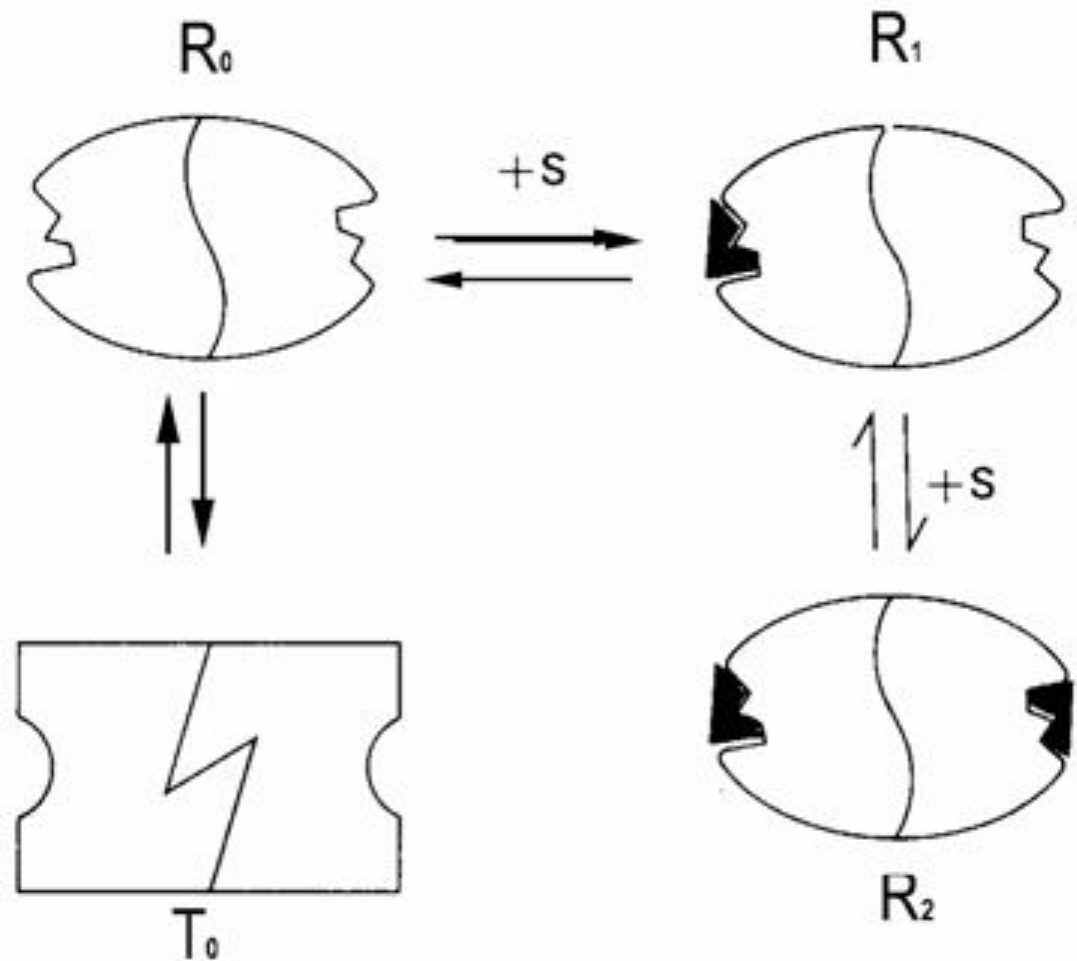
КОНФОРМАЦИЯ **T** ИМЕЕТ **НИЗКОЕ СРОДСТВО** К СУБСТРАТУ



Жак
Моно

Модель согласованного механизма (симметричная модель)

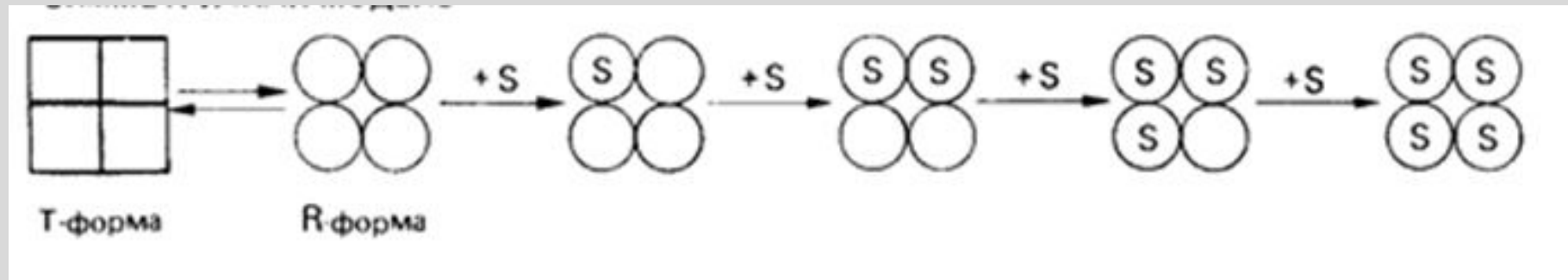
1965 г., Жак Моно, Джеффри Уайман и
Жан-Пьер Шанже

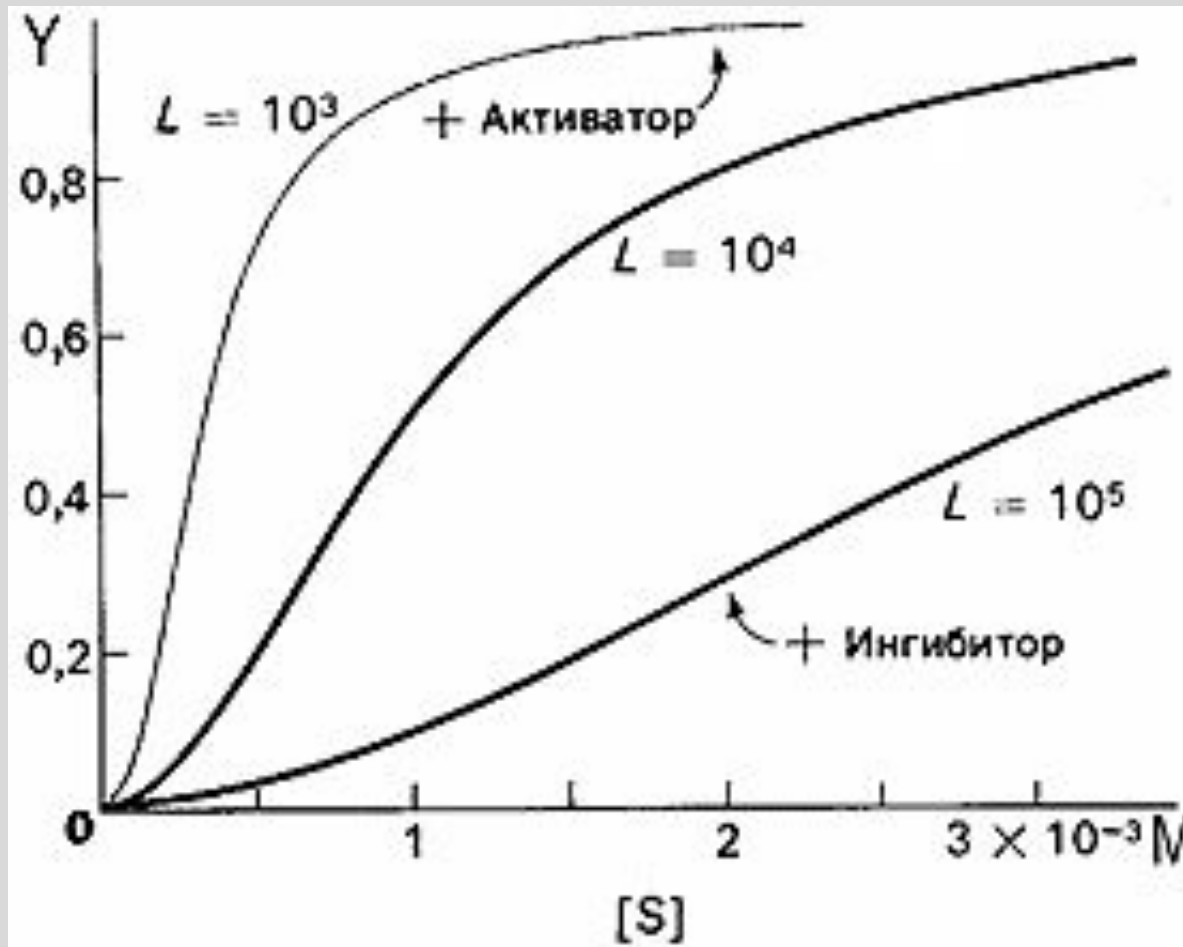


Присоединение **первой** молекулы субстрата сопровождается переходом **ТТ-формы** с низким сродством к субстрату **в RR-форму** с высоким сродством.

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

$$L = T/R$$

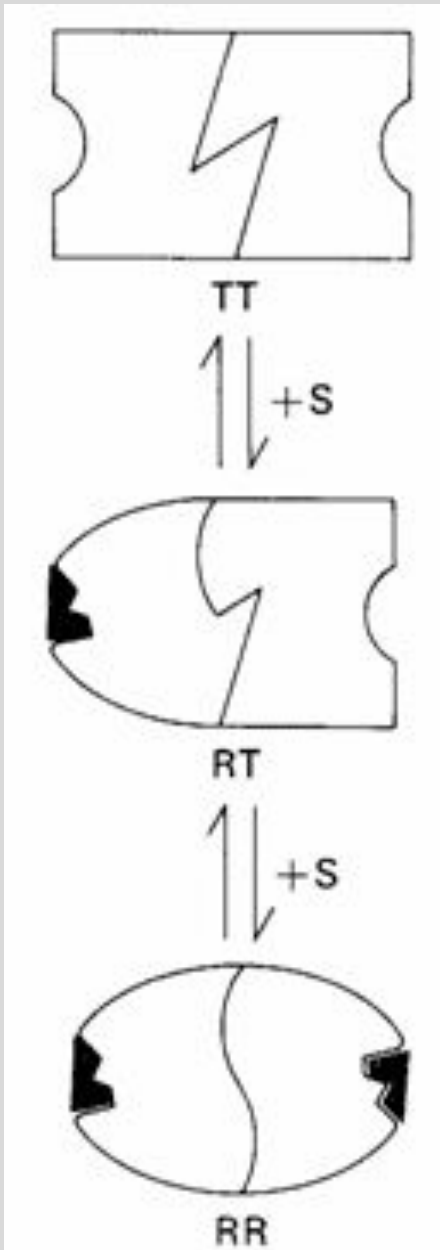
Зависимость степени насыщения Y активных центров фермента от концентрации субстрата $[S]$ в соответствии с моделью согласованного механизма $K_R = 10^{-5} \text{ M}$.



Модель последовательного механизма

Дэниел Кошланд
(1920–2007)

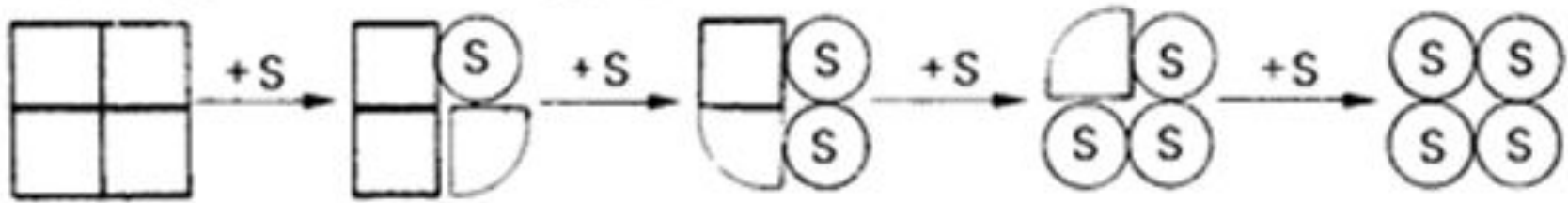
Автор: Даниэль Кошланд



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.

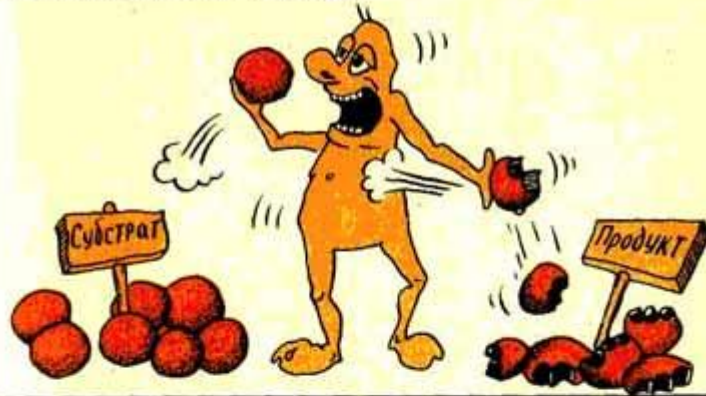
"ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ"



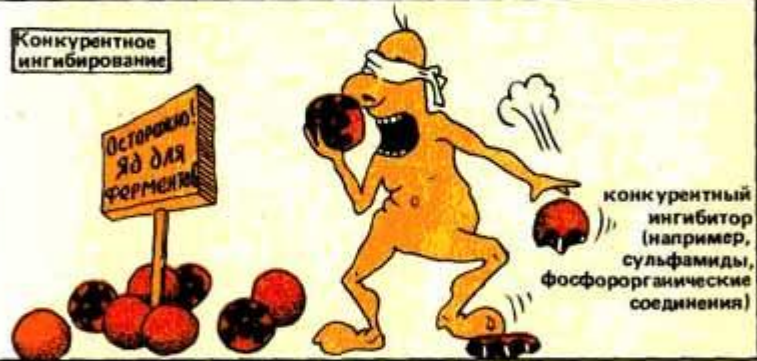
Фермент приобретает каталитически активную конформацию только в результате взаимодействия с субстратом. Если фермент состоит из нескольких субъединиц, то конформационное изменение одной из них, вызванное субстратом, последовательно передается другим субъединицам и облегчает им связывание добавочных молекул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

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Реакция в отсутствие ингибитора



Конкурентное ингибирование

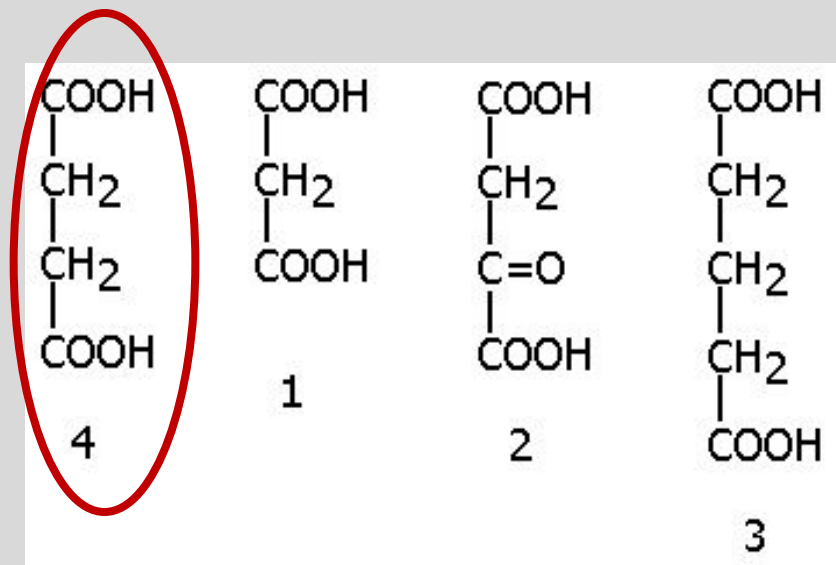


Неконкурентное ингибирование

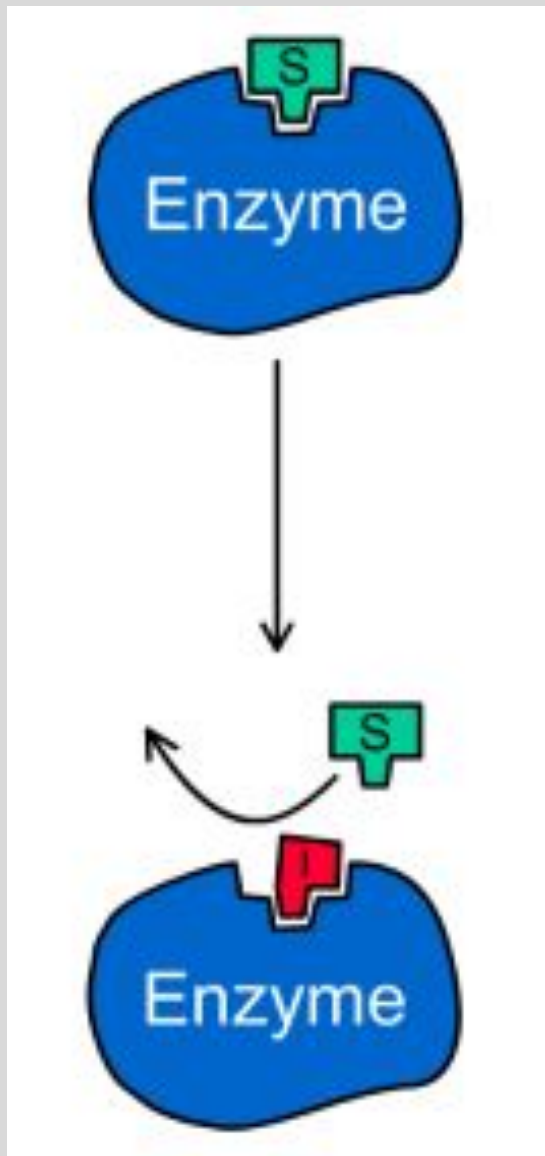


КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

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

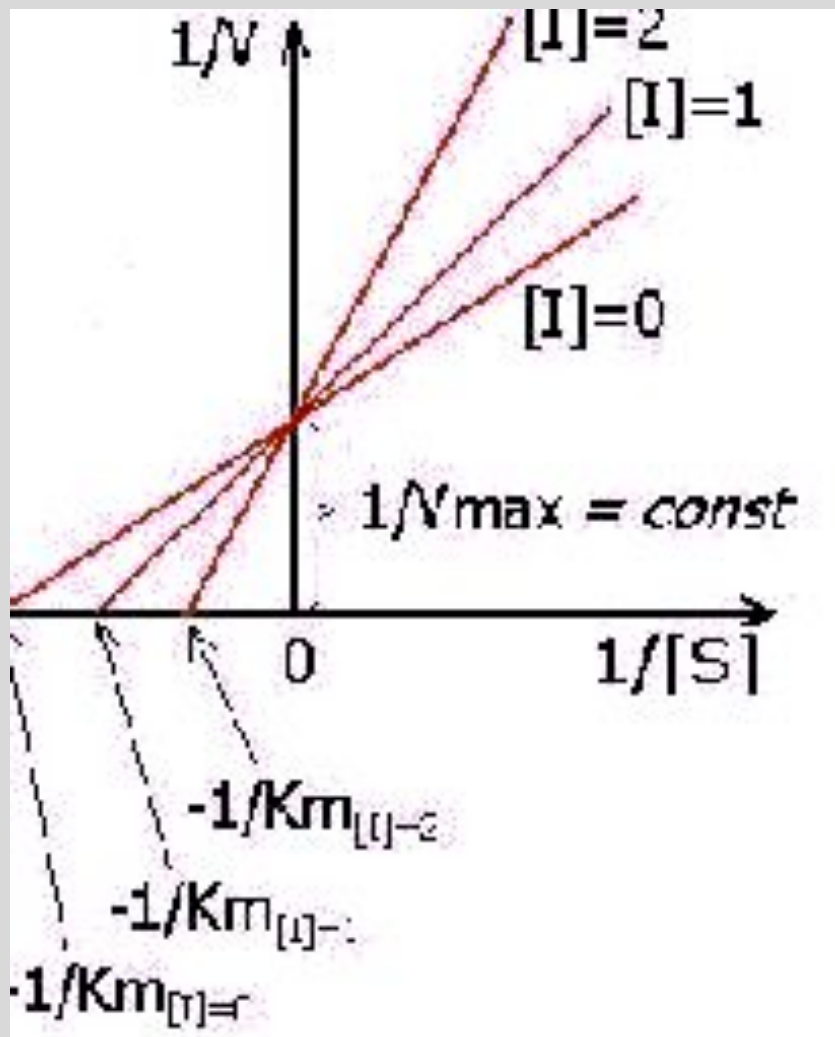


Ингибитор связывается в **АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФЕРМЕНТА** и конкурирует за него с субстратом.



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

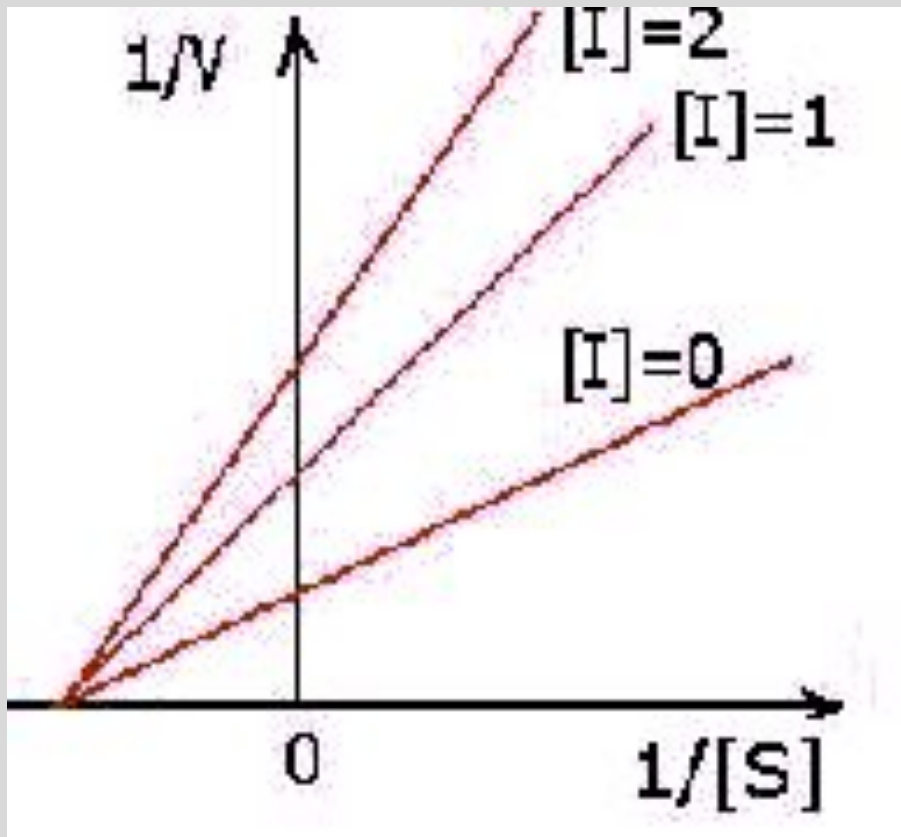
Максимальная скорость реакции V_{max} не меняется, а константа Михаэлиса увеличивается в $(1 + [I]/K_i)$ раз

НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

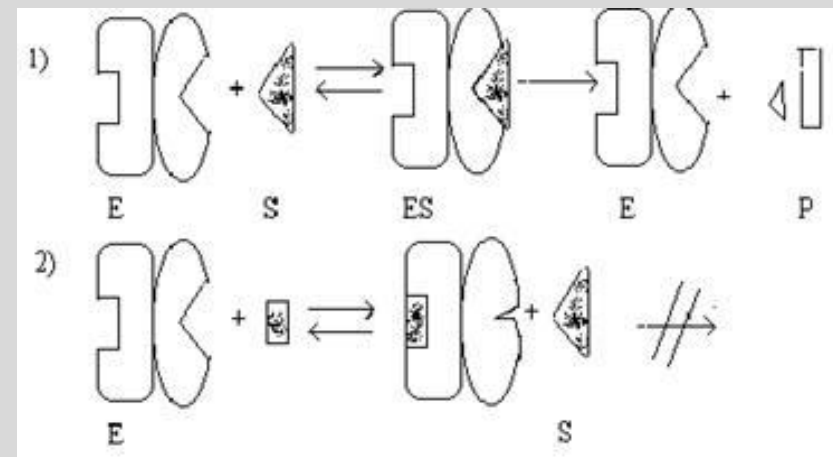
ИНГИБИТОР связывается с ФЕРМЕНТОМ **ВНЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА**, но при этом меняется структура активного центра и связь с субстратом становится невозможной
ОБРАЗУЕТСЯ НЕАКТИВНЫЙ КОМПЛЕКС **ESI**

УРАВНЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА – БЕРКА для НЕКОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

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

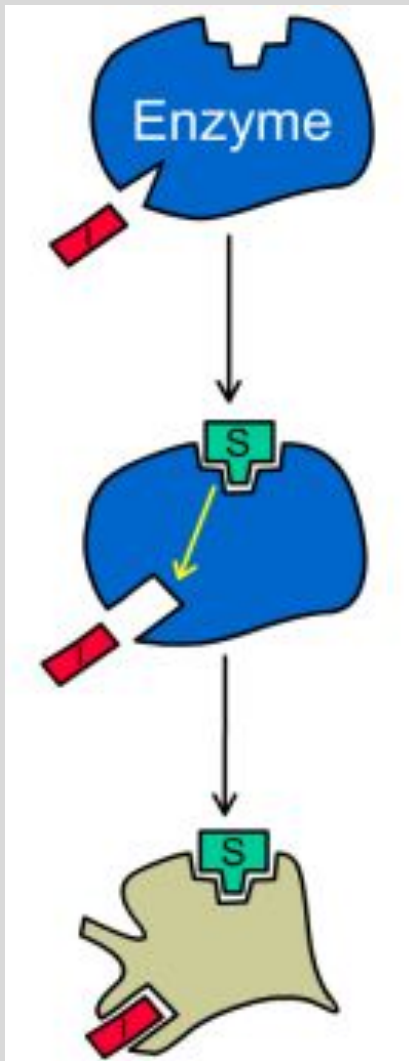


ИЗМЕНЕНИЕ
ГРАФИКА
Лайнуивера –
Берка в случае
неконкурентного
ингибирования



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

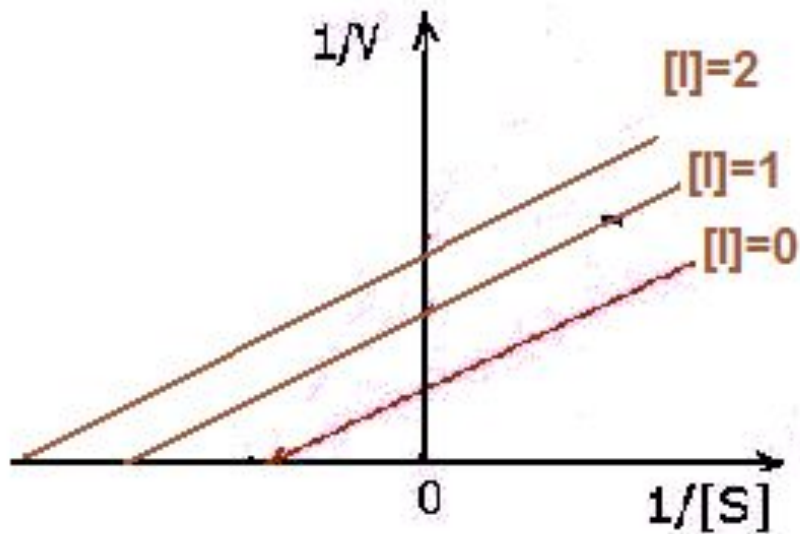
БЕСКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ



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.

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



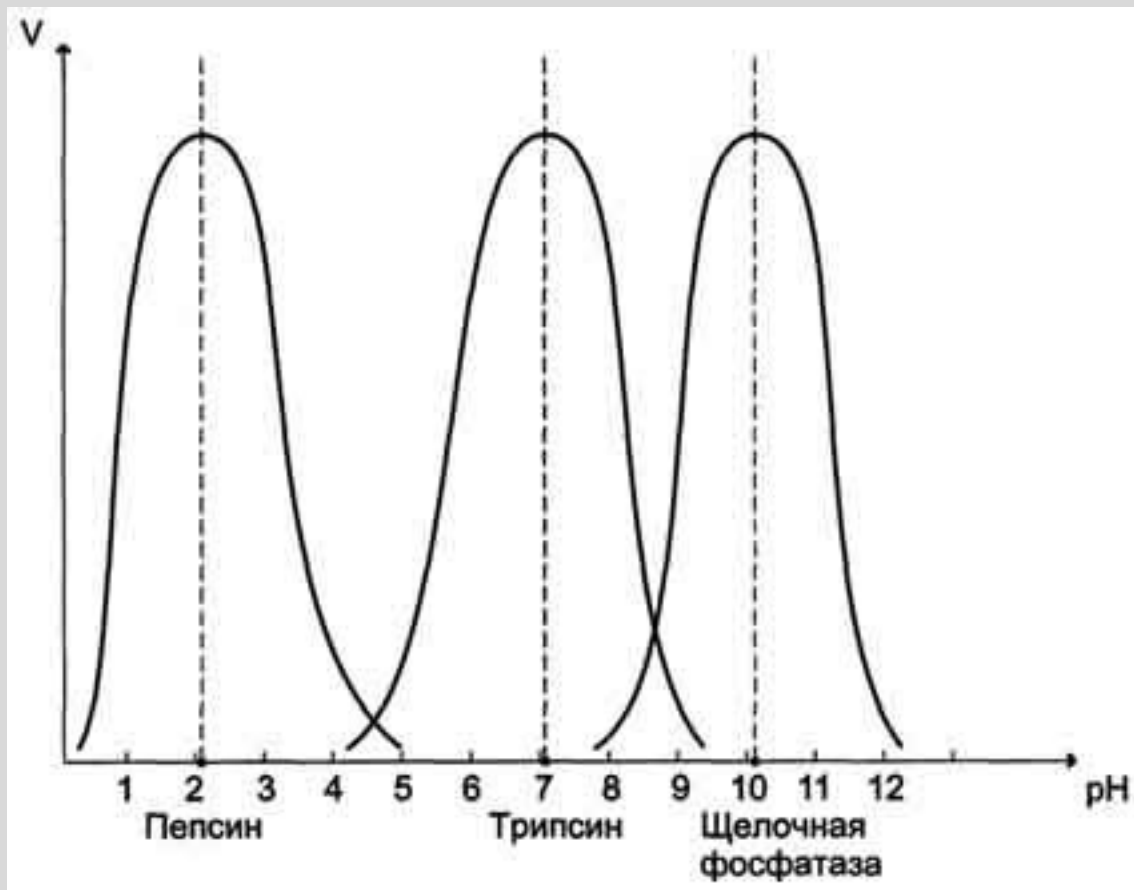
ИЗМЕНЕНИЕ ГРАФИКА
Лайнуивера – Берка
В СЛУЧАЕ
БЕСКОНКУРЕНТНОГО
ИНГИБИРОВАНИЯ

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 |