

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ НЕАЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Главная функция белков - ферментативная (каталитическая).

«Все ферменты – белки, но не все белки ферменты»

Фундаментальное положение о том, что ферментами (биокатализаторами) могут быть исключительно белки, просуществовало до 1967 года, когда впервые заговорили о *рибозимах*.

Рибозимы (ribonucleic acid enzyme) = РНК фермент или каталитическая РНК

В 1967 г. **Карл Везе, Френсис Крик и Лесли Оргел** высказали гипотезу о том, что РНК может выполнять роль биокатализатора, поскольку её молекула способна формировать вторичную структуру.

В 1980 г. **Томас Чек и Сидней Альтман** выделили рибозимный комплекс из клеток простейших и бактерий (Нобелевские лауреаты 1989 г. – «Исследование каталитических свойств РНК»).

Термин **рибозимы** был введен в 1982 году Келли Крюгером.

Реакции, катализируемые рибозимами:

- гидролиз фосфодиэфирных связей внутри самой молекулы РНК;
- гидролиз химических связей в других молекулах РНК;
- обеспечивают аминотрансферазную активность в рибосомах.

В качестве кофакторов для рибозимов выступают ионы двухвалентных металлов (часто Mg^{2+}).

Избранные факты из истории энзимологии

- В 17 веке Ван Гельмонт ввел термин «фермент» - от *fermentum* (лат.) – закваска.
- К концу 19 века «фермент» и «энзим» стали синонимами.
- 1890 г. Эмиль Фишер сформулировал идею о субстратной специфичности ферментов. Гипотеза «ключ – замок».
- В самом начале XX века И.Павлов впервые указал на возможность существования пищеварительных ферментов в неактивной форме (*профермент, зимоген*).
- 1913 г. Леонор Михаэлис и Мод Ментен (Германия) – вывели уравнение, описывающее кинетику ферментативной реакции.
- С 1922 г. начались систематические работы по выделению и очистке ферментов.
- 1926 г. Семнер – первым в мире получил в кристаллическом виде фермент *уреазу*. Поставлена точка в дискуссии: «Существуют ли ферменты, имеющие небелковую природу?»

XX век для биохимии – век энзимологии

Ферменты – биологические катализаторы, способные многократно изменять скорость метаболических реакций.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов:

- 1. Ферменты обладают **субстратной специфичностью**. Это универсальное свойство ферментов.**
- 2. **Специфичность превращений** с участием ферментов: не только **определённый субстрат**, но и **определённый продукт**.**
- 3. Ферментативный катализ чрезвычайно эффективен: ускоряет превращения в $10^6 - 10^{11}$ раз.**
- 4. Ферментативный катализ тонко **регулируется**.**
- 5. Фермент **никогда не расходуется** в ходе катализируемой реакции.**

6. **Скорость** ферментативной реакции **пропорциональна количеству фермента.**
7. Ферментативный катализ происходит **в особых условиях**: температура $+37^{\circ}\text{C}$, оптимальное значение pH, давление – 1 атмосфера.

Ферментативный катализ подчиняется законам термодинамики:

- Фермент может катализировать только **термодинамически вероятную реакцию** (т.е. **спонтанные** или **самопроизвольно протекающие** в данных условиях реакции).
- Фермент **не изменяет направление** биохимической реакции и **не сдвигает ее равновесие**. При участии фермента **равновесие достигается во много раз быстрее (секунды)**, чем в его отсутствие (**часы**).
- Фермент в **одинаковой степени ускоряет как прямую, так и обратную реакции.**

Согласно решению Комиссии по ферментам Международного биохимического союза, все известные ферменты делят на **6 классов**.

В шифре фермента после букв КФ (ЕС) стоят четыре цифры, разделенные точкой:

КФ (ЕС) 1.1.3.18.

Класс, к которому принадлежит фермент

Подкласс - уточняет природу хим. группы, которую атакует фермент

Подподкласс - уточняет природу атакуемой хим. связи или природу акцептора, участвующего в реакции

Порядковый номер фермента в подклассе

1 класс: ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

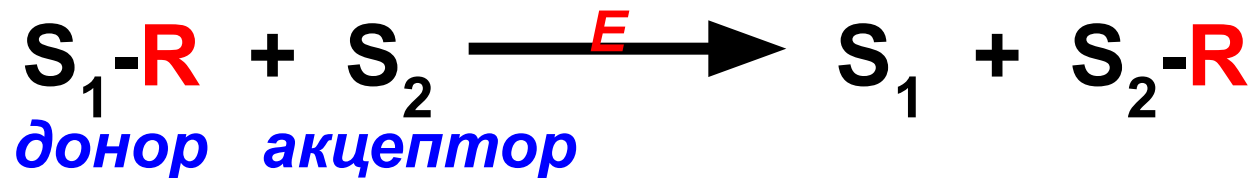
Катализируют окислительно-восстановительные реакции. Содержит 17 подклассов (самый многочисленный класс ферментов):



- **Дегидрогеназы** – если субстрат является донором H^+
- **Оксидазы** – если акцептором электрона является молекулярный кислород.
- **Оксигеназы** – если молекулярный кислород непосредственно включается в молекулу субстрата.

2 класс: ТРАНСФЕРАЗЫ

Переносят хим. группы (**R**) от молекулы-донора к молекуле-акцептору. Содержит 8 подклассов (один из самых многочисленных классов):

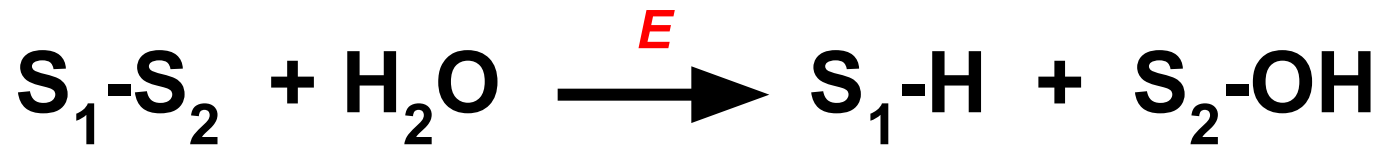


В зависимости от переносимой группы, имеются специфические названия:

- перенос P_n – **киназа**; $\text{—P} \begin{array}{l} \diagup \text{O}^- \\ \equiv \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array}$ (фосфорильная гр.)
- перенос аминокрупп – **аминотрансферазы**
(АсАТ/АлАТ)

3 класс: ГИДРОЛАЗЫ

Разрывают химические связи с присоединением воды. Содержит 11 подклассов (известно около 500 ферментов):

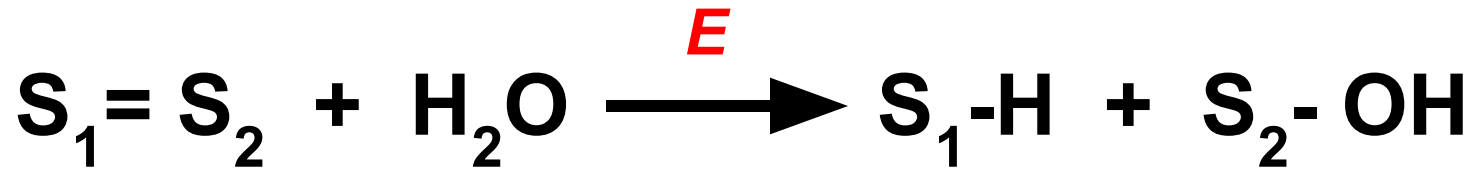


В этот класс входят все пищеварительные ферменты и ферменты лизосом.

Пример: гидратазы, липазы, эстеразы, фосфатазы, пептидазы, уреазы, АТФазы.

4 класс: ЛИАЗЫ

Отщепляют (*не гидролитически*) от субстрата хим. группу, или присоединяют воду по двойной связи. Содержат 4 подкласса (известно около 230 ферментов):



В основном это ферменты, работающие при синтезе или расщеплении промежуточных продуктов обмена.

Пример: декарбоксилазы, гидратазы.

5 класс: ИЗОМЕРАЗЫ.

Катализируют внутримолекулярные перестройки (превращения в пределах одной молекулы).

Содержит 5 подклассов (известно около 100 ферментов):



Пример: изомеразы, рецемазы, эпимеразы, мутазы.

Глюкозо-6-Ф \square *фосфоглюкомутаза* \square Фруктозо-6-Ф.

6 класс: ЛИГАЗЫ

Катализируют присоединение друг к другу двух разных молекул с образованием ковалентной связи. Процесс идет с потреблением энергии.

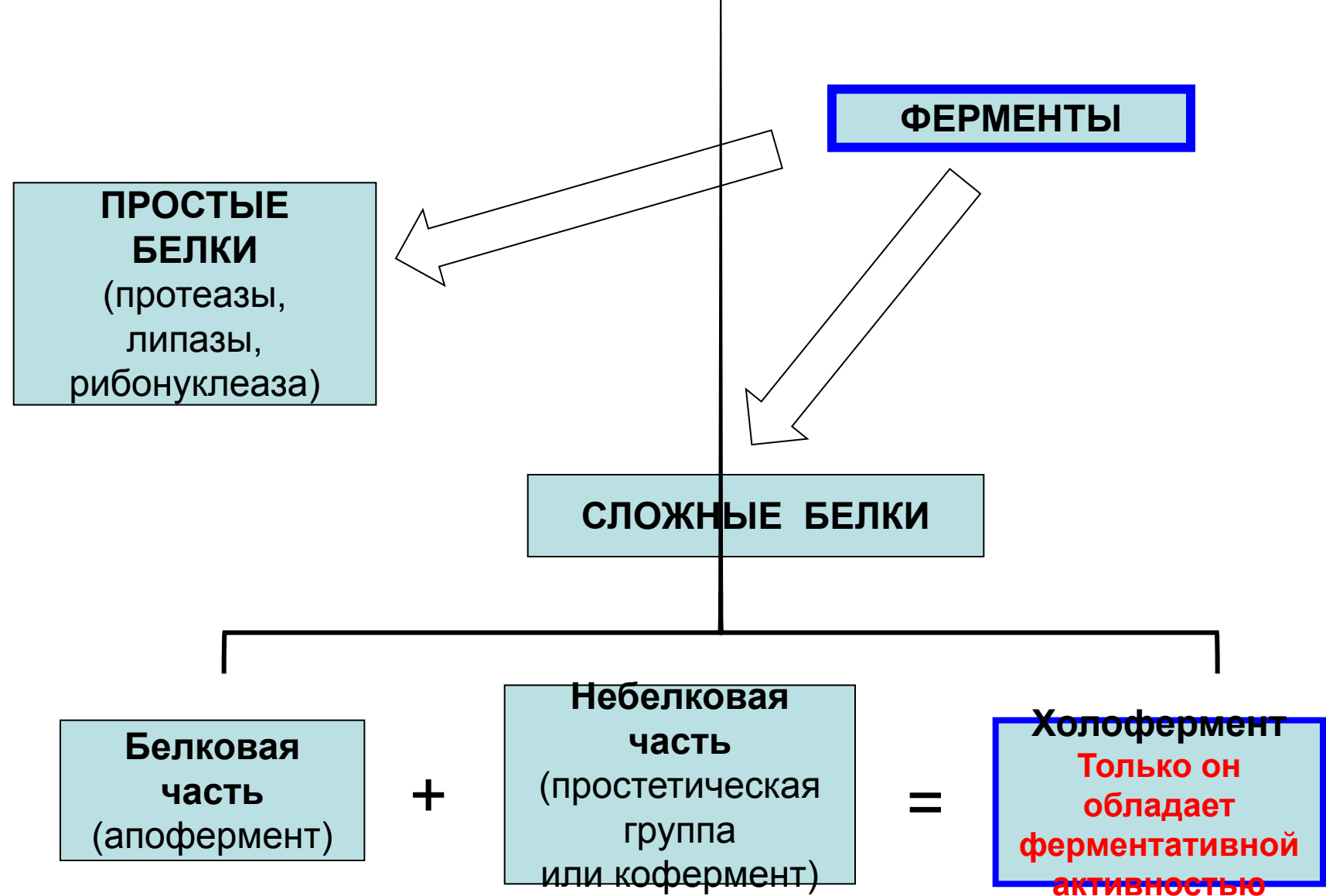
Если источниками являются АТФ или другие нуклеозидТФ, то **СИНТЕТАЗА**:



Если источниками являются высокоэнергетические фосфаты (ФЕП, креатин-Ф и др.), то **СИНТАЗА**:



Содержит 5 подклассов (известно менее 100 ферментов).



Кофермент – небелковая, но органическая молекула, как правило, легко отделяется от апофермента.

**НЕБЕЛКОВА ЧАСТЬ
МОЛЕКУЛЫ СЛОЖНОГО
ФЕРМЕНТА**

```
graph TD; A[НЕБЕЛКОВА ЧАСТЬ МОЛЕКУЛЫ СЛОЖНОГО ФЕРМЕНТА] --> B[КОФЕРМЕНТ:]; A --> C[КОФАКТОР:];
```

КОФЕРМЕНТ:

небелковая, но органическая молекула, легко отделяется от апофермента.

КОФАКТОР:

присутствующий в активном центре ион металла. Около 25% известных ферментов нуждаются в кофакторах.

Классификация коферментов:

Витаминные коферменты

НАД, НАДФ, ФМН, КоА и др.,
Их предшественниками являются витамины.

Невитаминные коферменты

1. Нуклеотидные коферменты.
2. Металлопорфириновые коферменты.
3. Пептидные коферменты.
4. Ионы металлов.

Роль металлов в ферментативном катализе:

1. Металлы образуют электрофильные группы в составе активного центра: они связываются с «-» зарядами в молекуле субстрата.
2. Металлы с переменной валентностью сами участвуют в переносе электронов (прямое участие в катализе).
3. Металлы участвуют в формировании и стабилизации пространственной конфигурации молекулы фермента, включая четвертичную структуру.
4. Металлы формируют «мостик», соединяющий апо- и ко-фермент.

Активный (каталитический) центр фермента

В нём происходят два важнейших события:

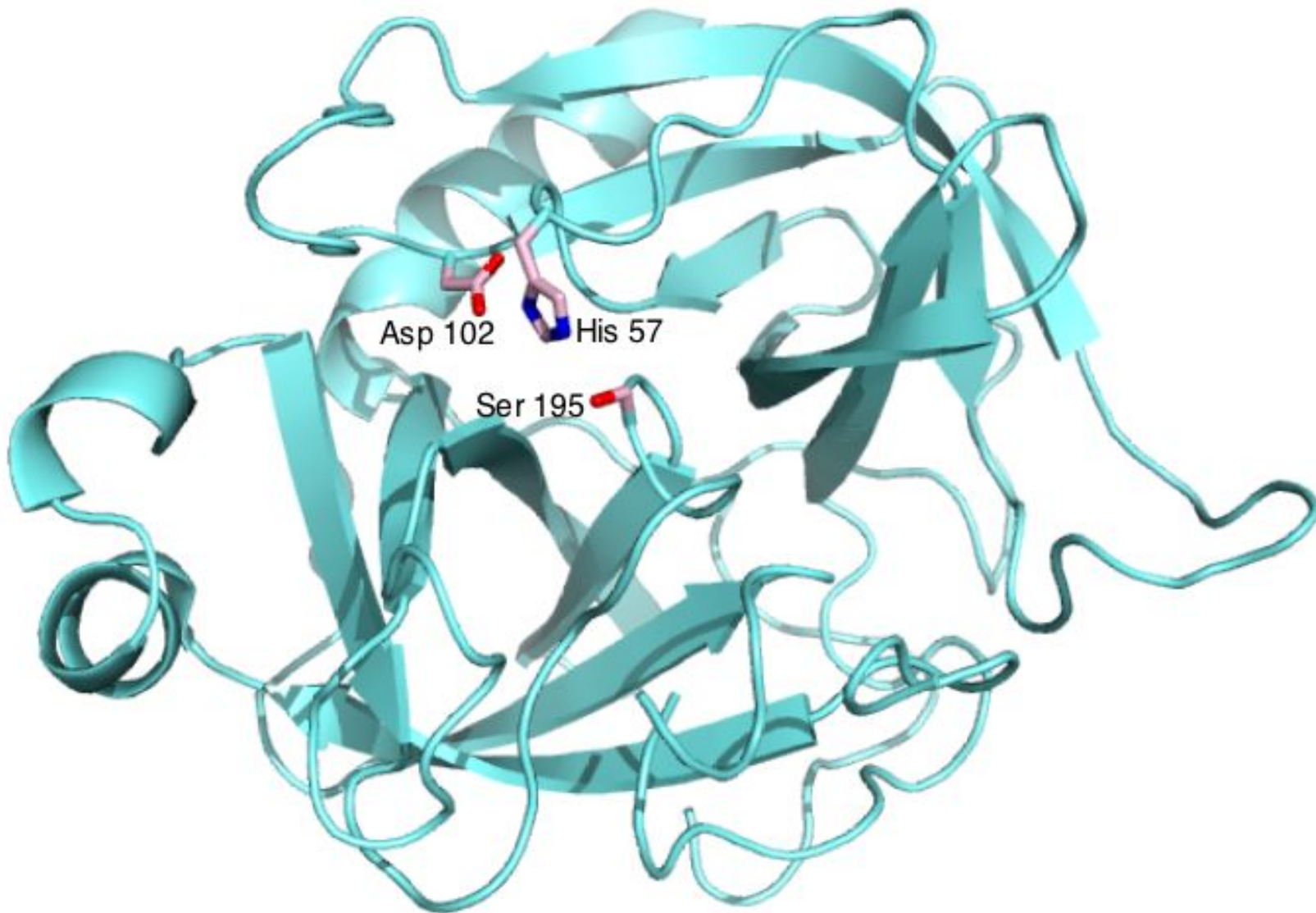
- связывание молекулы субстрата
- превращение субстрата(ов) в продукт(ы).

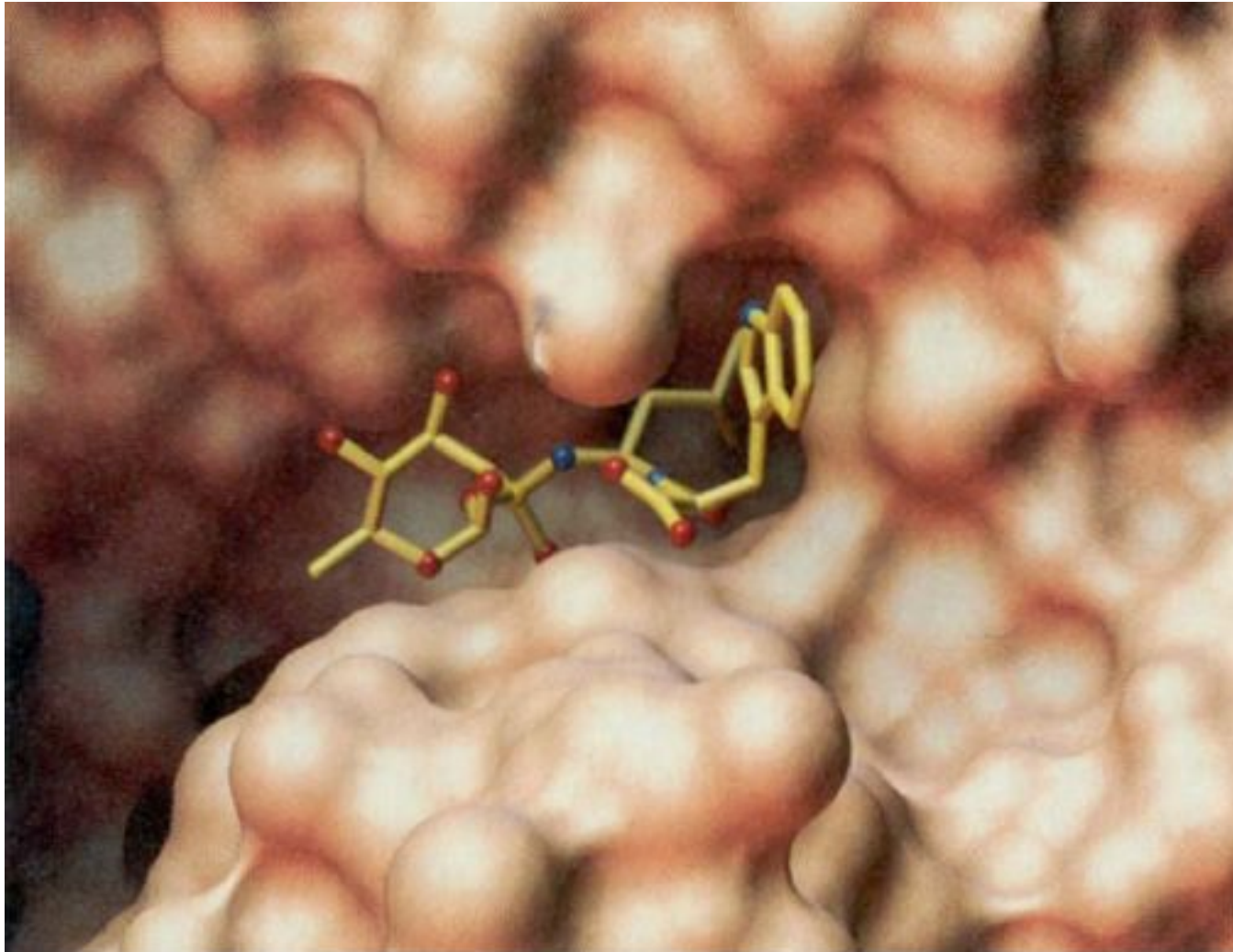
В сложных ферментах, неотъемлемой частью активного (каталитического) центра является кофактор.

Активный (каталитический) центр, чаще всего, формируется **12 - 16 аминокислотами**, которые в первичной структуре полипептидной цепи расположены на значительном расстоянии друг от друга.

После того, как полипептидная цепь фермента образует **нативную пространственную конфигурацию (конформацию)**, аминокислоты **сближаются и занимают в пространстве определенное (уникальное) положение.**

Химотрипсин: активный (каталитический) центр





Активный центр – трехмерное образование. Для некоторых ферментов активный центр имеет форму щели или углубления.

Структура активного центра фермента:

Контактный (якорный) участок – служит для связывания молекулы субстрата, размещения её в строго определенной позиции и **определяет субстратную специфичность фермента**. Образующаяся связь примерно в 50-100 раз слабее ковалентной. Каталитического превращения в этом участке не происходит.

Каталитический участок – служит для превращения субстрата в продукт. Этот участок **определяет путь превращения субстрата**.

Примеры функциональных групп аминокислотных остатков, участвующих в катализе:

- карбоксильная гр. (АСП, ГЛИЦ)
- аминогруппа (ЛИЗ)
- имидазольная гр. (ТРИПТ)
- индольная гр. (ТИР)
- ароматическое кольцо (Ф-АЛА)
- сульфгидрильная гр. (ЦИС)
- тиоэфирная гр. (МЕТ) и др.

Гидрофобные функц. группы аминокислот в составе активного центра фермента проявляют сродство к неполярным группам в молекуле субстрата.

Полярные функц. группы – сообщают кислотно-основные свойства.

Функции аминокислотных остатков, которые не входят в состав активного центра

- 1. Вспомогательные аминокислоты.** Расположены в непосредственной близости от активного центра и влияют на конформацию этого центра.
- 2. Способствующие аминокислоты.** Расположены сравнительно далеко от активного центра и способствуют формированию **нативной конформации** всей молекулы фермента.

Механизмы ферментативного катализа

1. Кислотно-основной катализ.

В состав активного центра входят аминокислотные остатки, содержащие функциональные группы, которые проявляют кислотно/основные свойства: доноры/акцепторы H^+ .

Молекула субстрата, связавшись в активном центре, индуцирует перераспределение плотности электронного облака групп активного центра. Это приводит к разрыву химических связей в молекуле субстрата и его превращение в продукт.

Кислотно/основные свойства особо выражены у аминокислот:
цис, гис, тир, сер, лиз, глу.

Ферменты, для которых характерен этот механизм катализа:

- Гидролазы (3 класс)
- Изомеразы (5 класс)
- Лиазы (4 класс)

Механизмы ферментативного катализа

2. Ковалентный катализ.

В активном центре между молекулой субстрата (S) и каталитическими функциональными группами аминокислот образуется ковалентная связь. В результате этого образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс (ES).

Этот комплекс высокоактивен и неустойчив, он быстро распадается с освобождением продукта ферментативного катализа (P) и свободную молекулу фермента:



Ферменты, для которых характерен этот механизм катализа:

- трипсин
- эластаза
- ЩФ

Помимо вышеупомянутых механизмов ферментативного катализа, важная роль принадлежит следующим явлениям, которые способствуют снижению энергии активации:

1. Эффект ориентации реагентов и их сближение:

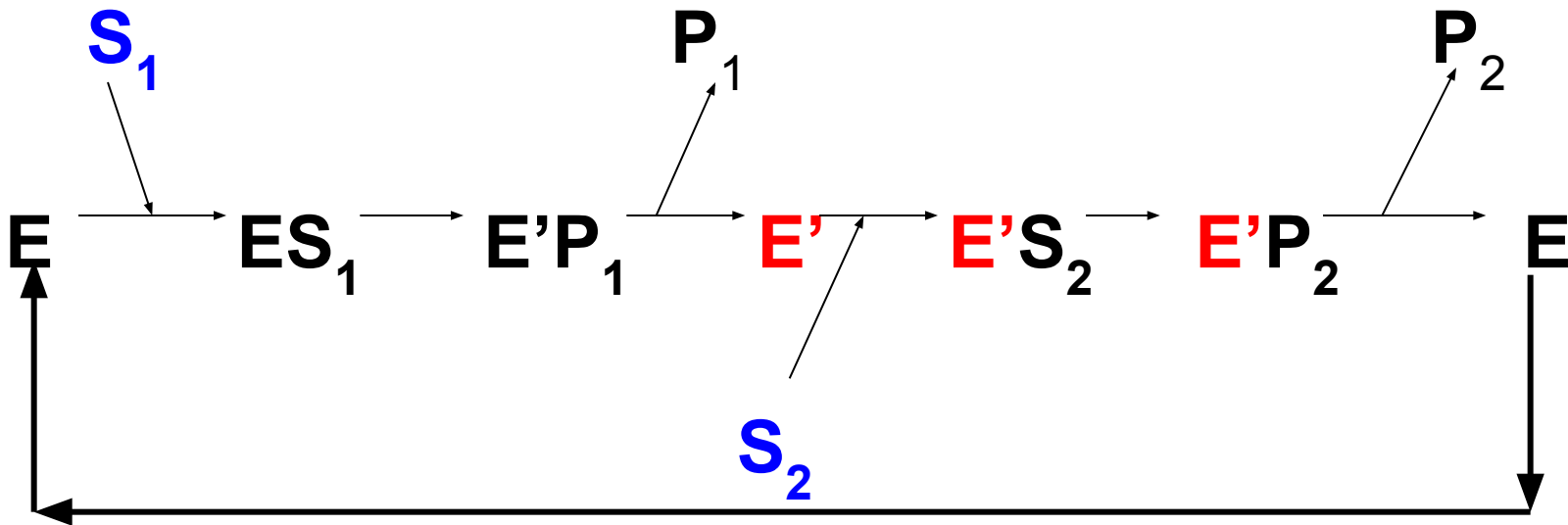
Молекулы субстрата, связавшись с контактными группами в активном центре, **сближаются с каталитическими группами**. Такое сближение способствует активации взаимодействия субстрата и активного центра.

2. Эффект деформации молекулы субстрата:

После связывания молекулы субстрата с активным центром, **молекула субстрата приобретает «деформированную» или «напряженную» конформацию**. В результате этого в молекуле субстрата увеличиваются межатомные расстояния, что существенно облегчает их разрыв и стимулирует образование продукта.

3. Механизм «пинг-понг».

Этот механизм характерен для сложных ферментов, содержащих кофермент. В процессе катализа происходит **обратимая модификация** кофермента:



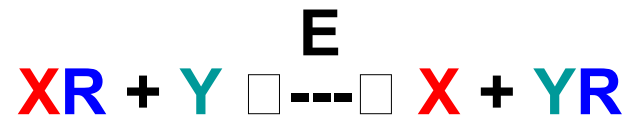
На определенном этапе в молекуле фермента (E) кофермент обратимо химически модифицируется (E') и в таком виде взаимодействует со второй молекулой субстрата (S_2). Такой вид катализа характерен для реакций переаминирования.

Двухсубстратные-двухпродуктные ферментативные реакции

Такие ферментативные реакции - самый распространённый тип биохимических реакций.

Почти все двухсубстратные-двухпродуктные реакции представляют собой **реакции переноса группы R**.

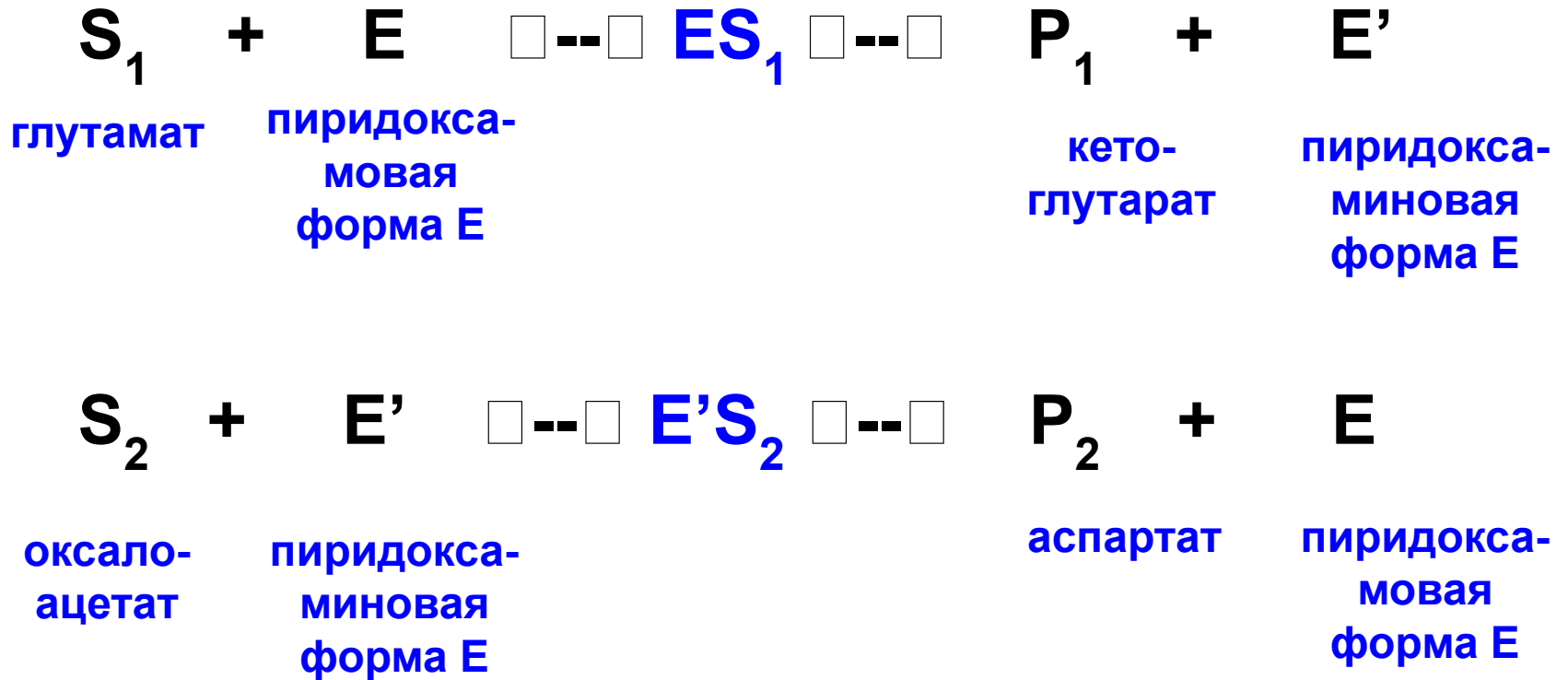
При этом **R** переносится от одной молекулы субстрата (**X**), к другой молекуле (**Y**):



Двухсубстратные-двухпродуктные реакции протекают с образованием *двух видов промежуточных комплексов*. Причина - субстраты связываются с ферментом в *произвольном порядке*.

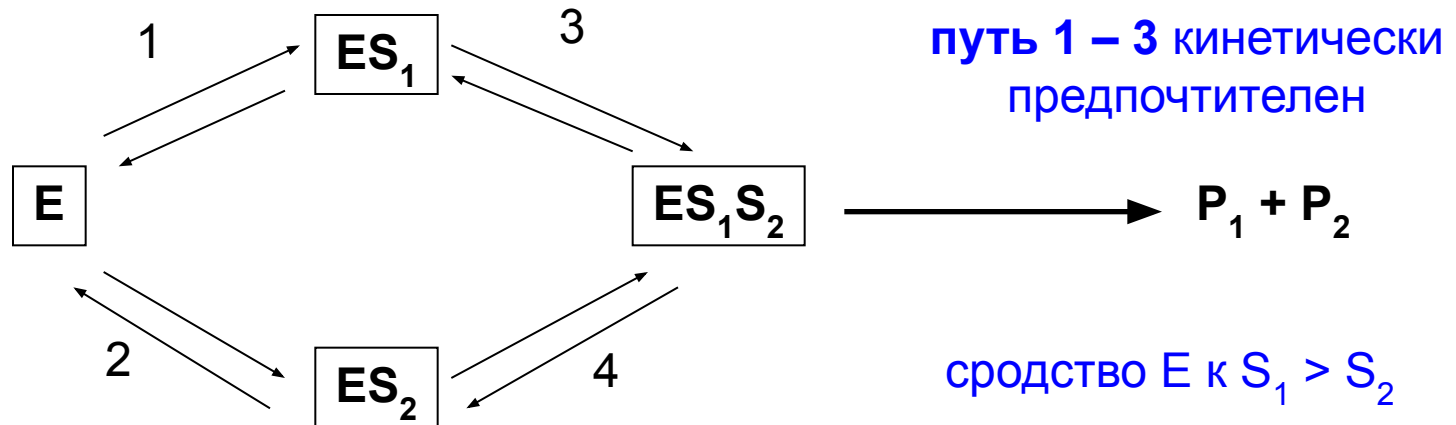
1. Тройной комплекс: E-**X**R-**Y** - содержит фермент (E) и оба субстрата (**X**R и **Y**);
2. Замещенная форма фермента: E-R.

Пример двухсубстратных-двухпродуктных реакций, идущих с образованием замещенной формы фермента – реакции, катализируемые *аминотрансферазами*.



Особенность двухсубстратных реакций – кинетика может отклоняться от кинетики Михаэлис-Ментен:

график зависимости V от $[S]$ представляет не классическую параболическую кривую, а принимает черты сигмовидной (S-образной) кривой.

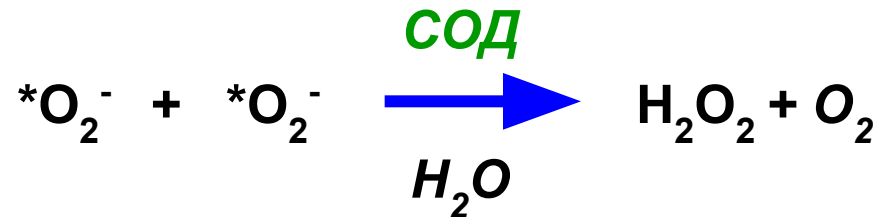


$[S_1] = const$, невариабельный субстрат:

Субстратная специфичность ферментов

1. Абсолютная субстратная специфичность.

Активный центр фермента комплементарен только одному субстрату. В природе явление сравнительно редкое.



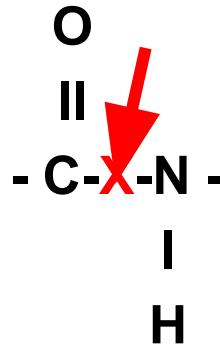
2. Групповая субстратная специфичность.

Этот вид специфичности характерен для большей части ферментов. Фермент катализирует **однотипные реакции** в группе **структурно сходных субстратов**.

панкреатическая липаза

ТАГ -----□ Моноацилглицерол + 2 СЖК

Протеазы – гидролиз **пептидной связи**:



3. Стереоспецифичность.

Субстрат может иметь несколько стереоизомеров, но фермент взаимодействует только с каким-то одним определенным стереоизомером.

D- и L- сахара. *Гексокиназа* активна только по отношению к *D-глюкозе*.

α - и β -гликозидные связи. *Амилаза* активна только по отношению к α -1,4-гликозидной связи (крахмал, гликоген), но не клетчатки.

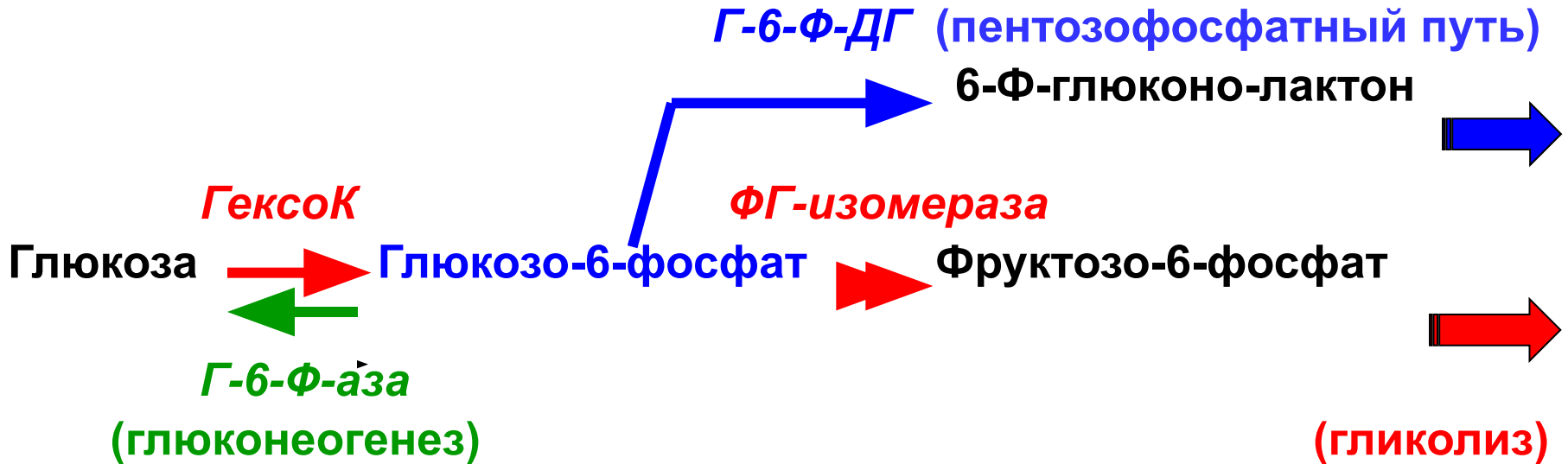
D- и L- аминокислоты.

Цис / Транс – изомеры.

4. Каталитическая субстратная специфичность.

Одна молекула служит субстратом для нескольких ферментов.

Пример: глюкозо-6-фосфат.



Ферменты, использующие один и тот же субстрат, имеют **активные центры, строение которых существенно отличаются**. Этим определяется различие путей превращения одного и того же субстрата.

Гипотезы, объясняющие механизм субстратной специфичности ферментативного катализа

1. Гипотеза Э.Фишера «Ключ – замок» (1890 г.)

Структура активного центра фермента – жесткая. **Силуэт активного центра - «слепок» силуэта молекулы субстрата.** Молекула субстрата – «ключ», активный центр фермента – «замок». Гипотеза может объяснить только феномен абсолютной субстратной специфичности ферментативного катализа.

2. Гипотеза Кошланда «Вынужденное соответствие»

Структура активного центра не жесткая (способна деформироваться). **Когда молекула субстрата присоединяется к активному центру фермента, то он деформируется.**

Происходит «подстраивание» конформации активного центра под силуэт молекулы субстрата. **Субстрат «вынужда-ет» активный центр менять свою конформацию для того, чтобы «соответствовать» структуре субстрата.**

Таким образом, «замок» (активный центр) меняет свою конформацию, сообразно форме «ключа» (молекулы субстрата).

Зависимость V ферментативной реакции от pH

В зависимости от pH среды, различные функциональные группы аминокислот фермента будут ионизированы в разной степени.

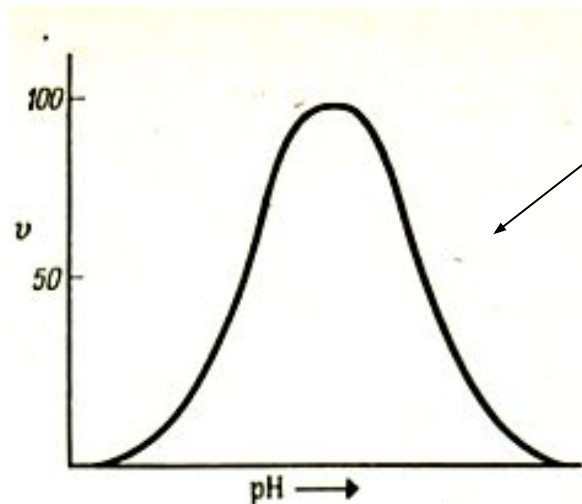
Пути влияния на каталитические свойства фермента:

- изменение ионизации функц. групп аминокислот в активном центре, **ответственных за катализ.**
- изменение ионизации функц. групп аминокислот в активном центре, **ответственных за связывание молекулы субстрата.**
- изменение конформации части или большей части молекулы фермента.

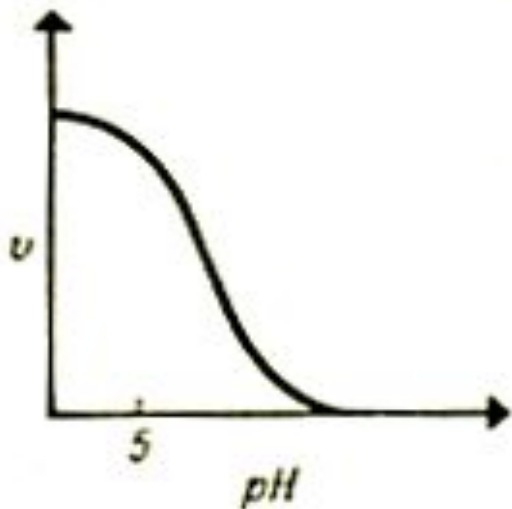
Влияние на сродство субстрата к ферменту:

- изменение ионизации молекулы субстрата

Зависимость V ферментативной реакции от pH

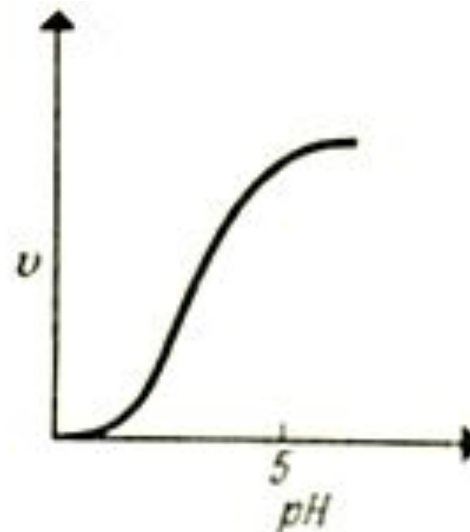


A



B

Активность фермента максимальна, когда молекула имеет $+q$



C

Активность фермента максимальна, когда молекула имеет $-q$

Зависимость V ферментативной реакции от pH

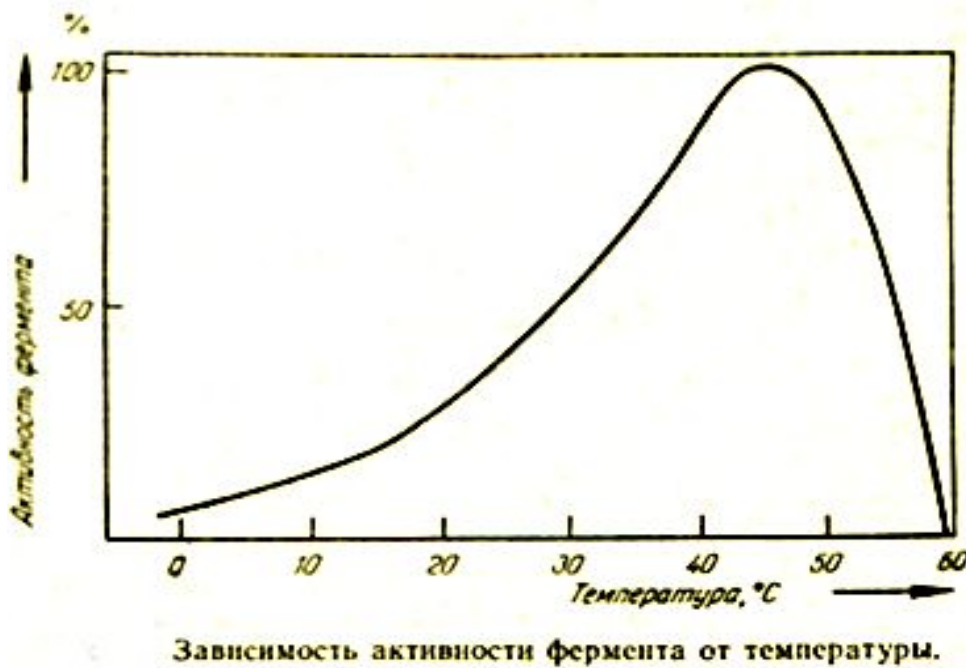
Для работы подавляющего большинства ферментов существует pH-оптимум. Даже незначительные отклонения от него в любую сторону – приводит к существенному снижению V реакции.

Исключение составляет фермент инвертаза:



V ферментативной реакции не зависит от pH в диапазоне 3,0 – 7,5

Зависимость V ферментативной реакции от температуры



Исключение составляет термофильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза). Фермент выделен из бактерий *Thermus aquaticus*. Т-оптимум для них +72° С

При более низкой T понижение V реакции обусловлено:

- замедлением диффузии молекул субстрата и уменьшением частоты столкновения субстрата с ферментом;
- денатурацией фермента.

При более высокой T понижение V реакции обусловлена:

- денатурацией фермента;
- разрушением фермента.

Энергетика биохимических реакций

Для протекания химической реакции требуется выполнение, по меньшей мере, **трех условий**:

1. Реакция должна быть термодинамически возможной: происходит спонтанно (самопроизвольно). При этом энергия продукта (P) будет меньше энергии субстрата (S). Изменение свободной энергии Гиббса имеет значение $-\Delta G$, то есть **химическое превращение идет с отдачей энергии (экзергонический процесс) в форме химической работы: разрыв одних хим.связей и образование других хим. связей.** Свободная энергия Гиббса (ΔG) – часть общей энергии системы, которая **доступна для выполнения работы.**
2. Достаточная частота взаимостолкновений атомов и молекул.
3. Сталкивающиеся атомы и молекулы должны обладать повышенной кинетической энергией (энергия активации).

Энергетика биохимических реакций

Энергия активации (E_a) – дополнительное количество кинетической энергии, которое необходимо передать молекуле, чтобы она **оказалась в переходном состоянии** и получила возможность вступить в химические реакции.

Переходное состояние обозначает максимальную способность молекулы к химическому превращению. Чем большая часть молекул в 1 моле вещества находится в переходном состоянии, тем выше V химической реакции.

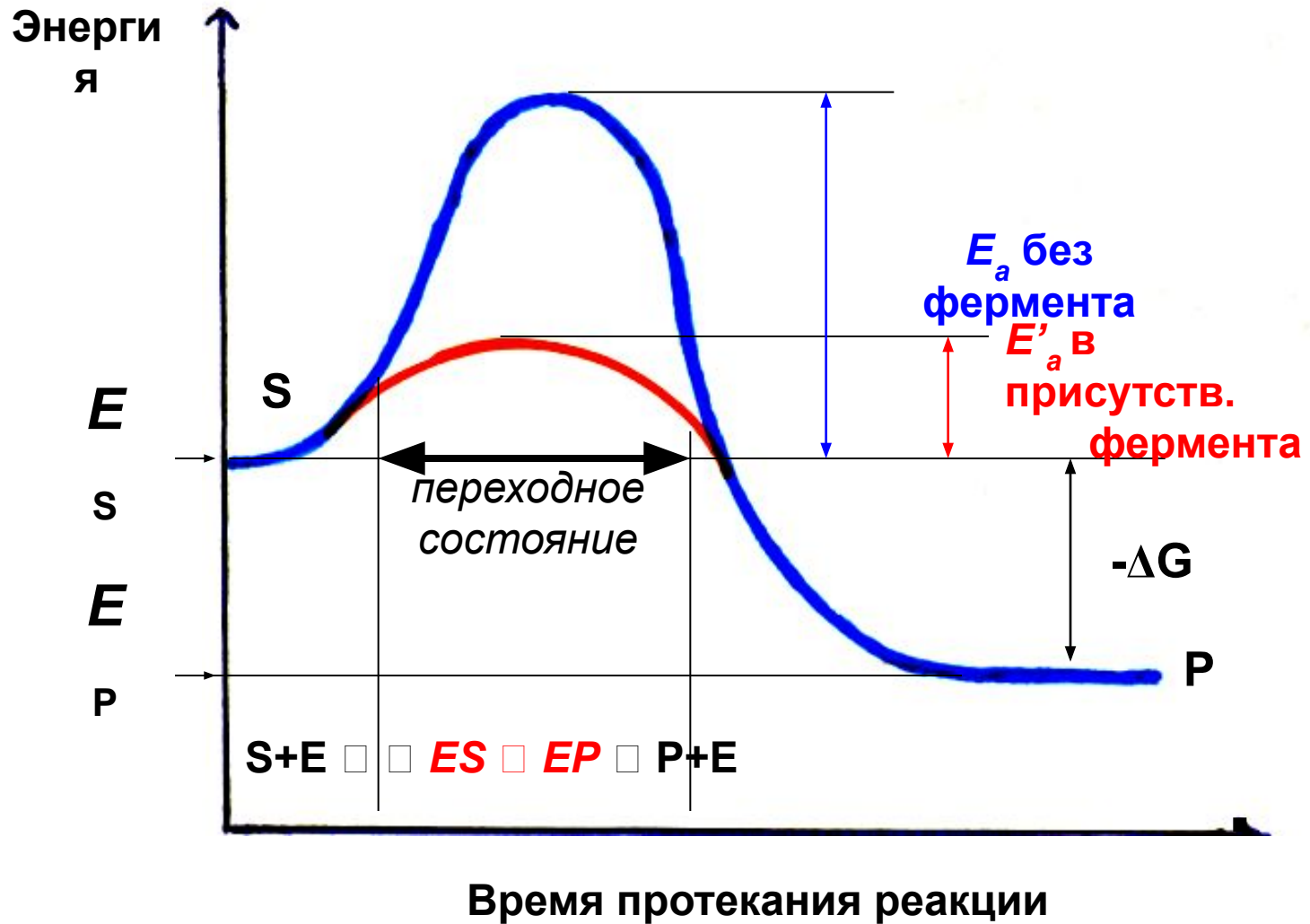
Энергетика биохимических реакций

Взаимодействующие молекулы должны преодолеть **энергетический барьер**. Именно для этого им необходимо получить дополнительное количество энергии = **энергию активации (E_a)**.

Передать взаимодействующим молекулам дополнительное количество кинетической энергии можно путем нагревания. **Для биологических объектах нагревание свыше $+40^\circ\text{C}$ губительно.**

В ходе эволюции сформировался механизм ускорения метаболических превращений с участием ферментов. **Ферменты уменьшают величину энергии активации**, при этом не повышая температуру, кото-рая способна разрушить биомолекулы.

Влияние фермента на величину энергии активации, E_a



Переходное состояние и фермент-субстратный комплекс (ES)



Время существования ES совпадает с временем продолжительности переходного состояния.

Образование ES – способ уменьшения E_a , в условиях, при которых нельзя повышать T более $+37^\circ \text{C}$.

Стадия образования «первичного» ES комплекса протекает сравнительно быстро (зависит от $[S]$).

Стадия превращения «первичного» ES комплекса в «активированный» ES комплекс – *лимитирующая*. На этой стадии происходит превращение $S \rightarrow P$.

Стадия диссоциации EP-комплекса: выход P и освобождение E , протекает сравнительно быстро.

Зависимость V реакции от T

Коэффициент Ван-Гоффа (Q_{10}):

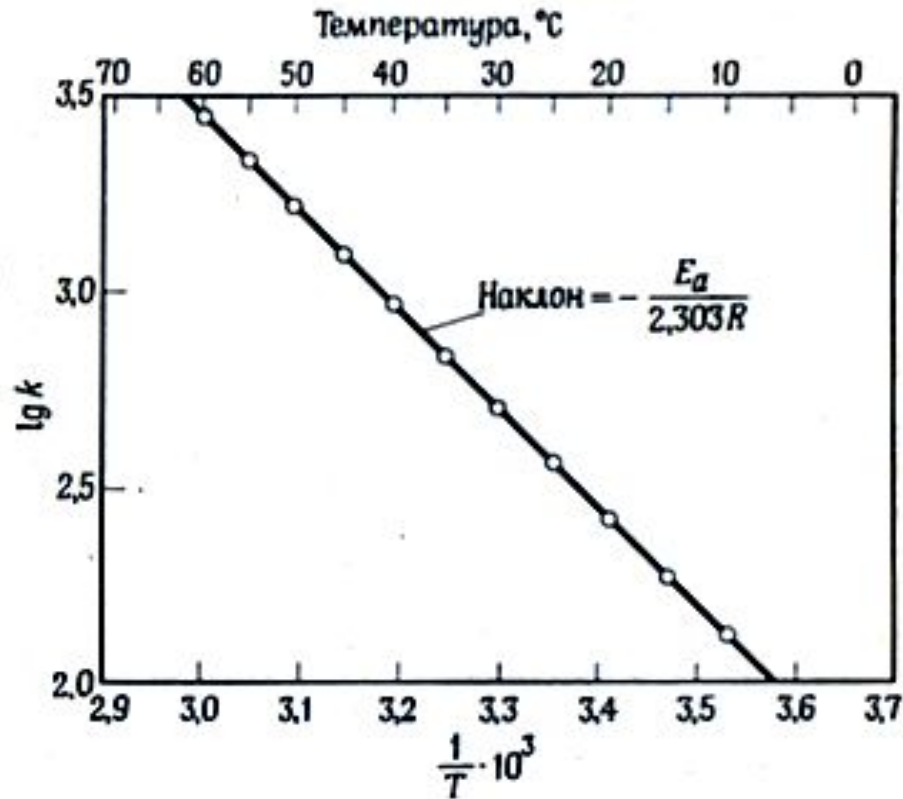
$$Q_{10} = \frac{V_{T+10}}{V_T}$$

Коэффициент показывает: во сколько раз возрастет скорость хим. реакции при увеличении температуры на 10°C.

Для химических реакций $Q_{10} = 2,0$

Для ферментативных реакций, протекающих в организме, $Q_{10} = 1,7$

Аррениус установил зависимость между константой скорости реакции и энергией активации



$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

График Аррениуса. С его помощью сравнительно легко определить величину энергии активации (E_a)

Ферментативная КИНЕТИКА



В общем виде скорость (V) ферментативной реакции можно описать уравнениями:

$$v = -\frac{d[S]}{dt}$$

Если выразить через
уменьшение $[S]$

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

Если выразить через
прирост $[P]$

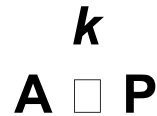
Скорость химической реакции выражает изменение количества вещества, вступившего в реакцию (или количество вещества, образовавшегося в реакции), за единицу времени.

Одна из характеристик ферментативной реакции:

Порядок реакции

Порядок реакции определяется числом участников реакции, концентрации которых перемножаются в уравнении скорости реакции.

Реакция первого порядка:



Если $[A]$ обозначить a , то:

$$v = -\frac{da}{dt} = -ka$$

k – константа реакции первого порядка, размерность: с^{-1}

$$V = ka = (\text{моль} * \text{л}^{-1}) * \text{с}^{-1} = k * (\text{моль} * \text{л}^{-1}), \text{ тогда:}$$

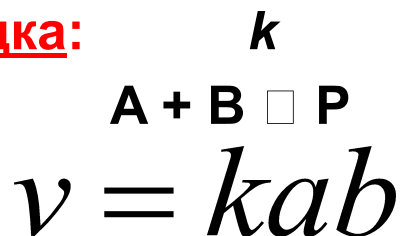
$$k = V / a = (\text{моль} * \text{л}^{-1}) * \text{с}^{-1} / \text{моль} * \text{л}^{-1} = \text{с}^{-1}$$

Константа скорости (био)химической реакции k численно равна скорости реакции при концентрации каждого из реагирующих веществ - 1 моль/л.

Константа скорости (k) реакции зависит от температуры, от природы реагирующих веществ, от катализатора, от pH и др. факторов, но не зависит от концентрации реагирующих веществ.

Иными словами, k – коэффициент пропорциональности (поправочный коэффициент), позволяющий с максимальной точностью рассчитать скорость ферментативной реакции в данных конкретных условиях её протекания.

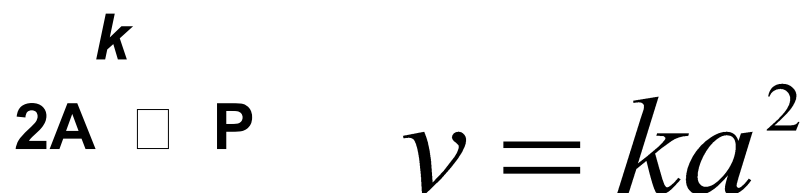
Реакция второго порядка:



k – константа реакции второго порядка,

размерность: $\text{моль}^{-1} \times \text{с}^{-1}$

Частный случай:



В случае, когда $[B] \gg [A]$, следует записать:

$$v = k'a$$

Это реакция второго порядка, но в силу избытка $[B]$ уравнение выглядит как для реакции первого поряд-ка - **псевдо унимолекулярная реакция**.

В случае **тримолекулярных** реакций:



Такие реакции **нельзя относить к реакциям третьего порядка.**

Они протекают в **две стадии**:



Какая-то из двух реакций будет лимитирующей, то есть определять скорость всего процесса.

Реакции нулевого порядка:

Скорость таких реакций **не зависит от концентрации субстрата:**

$$V = \text{const.} = V_{\text{max.}}$$

Ферментативные реакции, как правило, реакции нулевого порядка, поскольку протекают в присутствии избытка субстрата. Это позволяет ферменту обеспечивать максимально высокую скорость метаболических превращений.

Корректно определить активность фермента in vitro можно только в условиях проявления им максимальной скорости (разумный избыток субстрата).

Единицы активности фермента:

Международная единица (МЕ, Е, U):

Активность, при которой происходит утилизация 1 микромоля S (или наработка 1 микромоля P) в мин.:

$$1 \text{ МЕ} = \text{мкмоль/мин} \text{ (мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}\text{)}$$

Активность фермента в системе СИ:

Активность, при которой происходит утилизация 1 моля S (или наработка 1 моля P) в секунду:

$$1 \text{ катал (кат.)} = \text{моль} \cdot (\text{л} \cdot \text{с})^{-1}$$

$$1 \text{ МЕ} = 16,67 \text{ х кат.} \quad 1 \text{ кат.} = 6 \times 10^7 \text{ х МЕ}$$

Удельная активность фермента:

Активность фермента в любых единицах активности, но **приведенная к 1 мг белка, присутствующего в пробе.**

Законы ферментативной кинетики.

Первые попытки.

Первые попытки описания законов ферментативной кинетики были сделаны **Брауном** и **Анри** (период 1892-1903гг.).

Эти работы не достигли цели. Не была осознана принципиальная важность измерения начальной скорости ферментативной реакции: в течение **первых 3 - 4 минут от начала**, что позволяло пренебрегать скоростью обратной реакции, которая оказывает все больший вклад на поздних стадиях реакции.

В итоге, уравнение, которое было предложено **Анри**, не позволяло удовлетворительно описать все эмпирически полученные данные.

Исследования Л. Михаэлис и М. Ментен



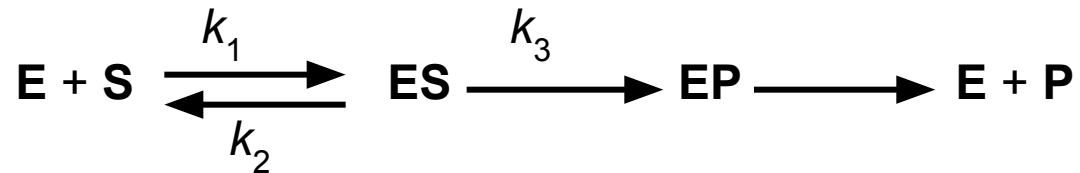
**Leonor
Michaelis
1875-1949**



**Maud Leonora Menten
1879-1960**

В 1913 году Л. Михаэлис и М. Ментен вывели уравнение кинетики ферментативной реакции (уравнение Михаэлис - Ментен)

Исходные положения теории Михаэлиса и Ментен:



Первая стадия ферментативной реакции (с константами k_1 и k_2) – равновесный процесс, следовательно:

V образования комплекса $ES = V$ диссоциации комплекса ES

Константа диссоциации комплекса ES (субстратная константа), $K_s = k_2 / k_1$

Стадия реакции $ES \rightarrow EP$ (с константой k_3) определяет скорость процесса в целом.

Судьба комплекса ES принципиальна, поскольку V всего процесса будет пропорциональна $[ES]$.

V образования комплекса ES = $k_1[E][S]$

V диссоциации комплекса ES = $k_2+k_3 [ES]$

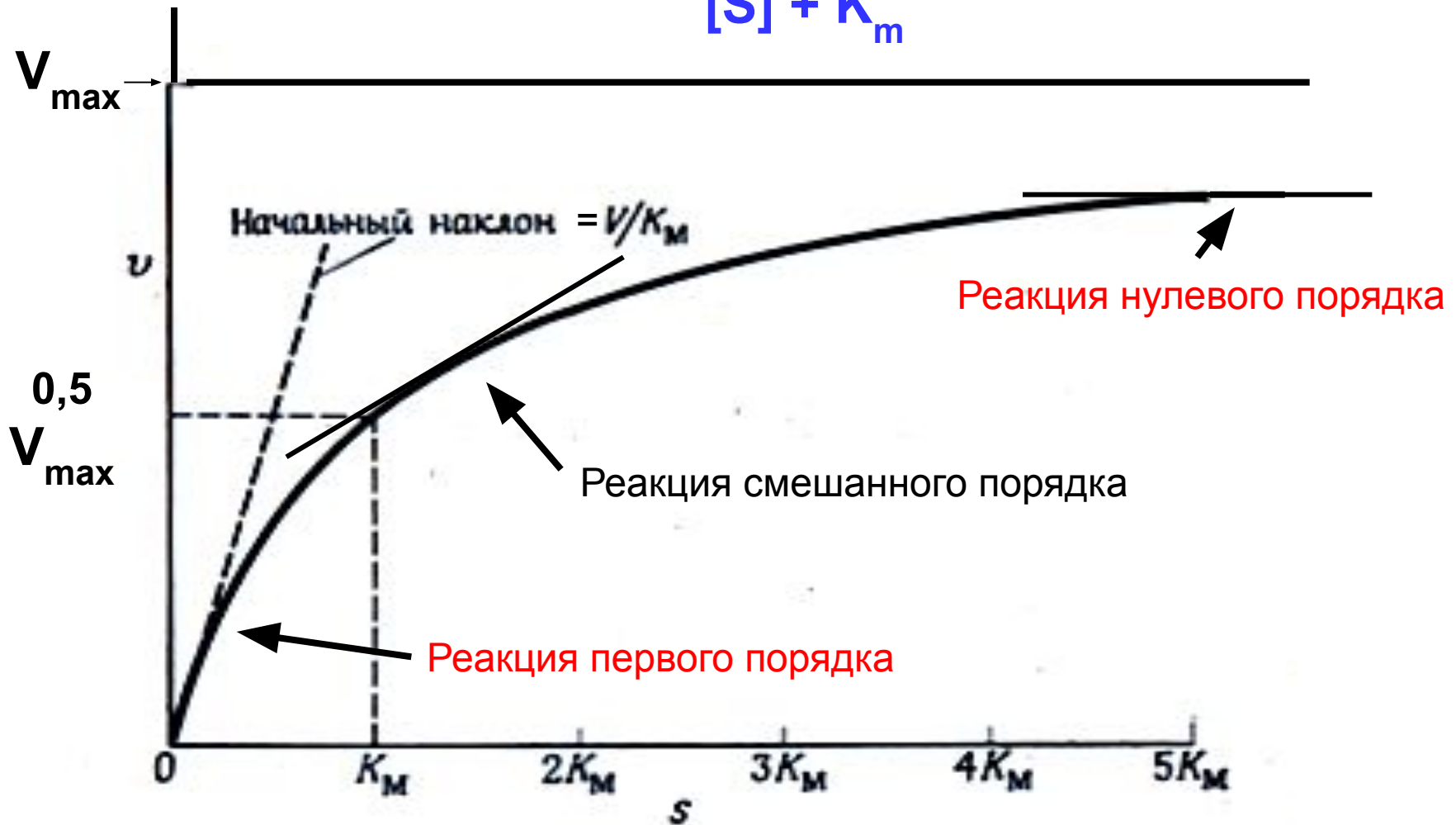
$k_1[E][S] = k_2+k_3 [ES]$ отсюда:

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

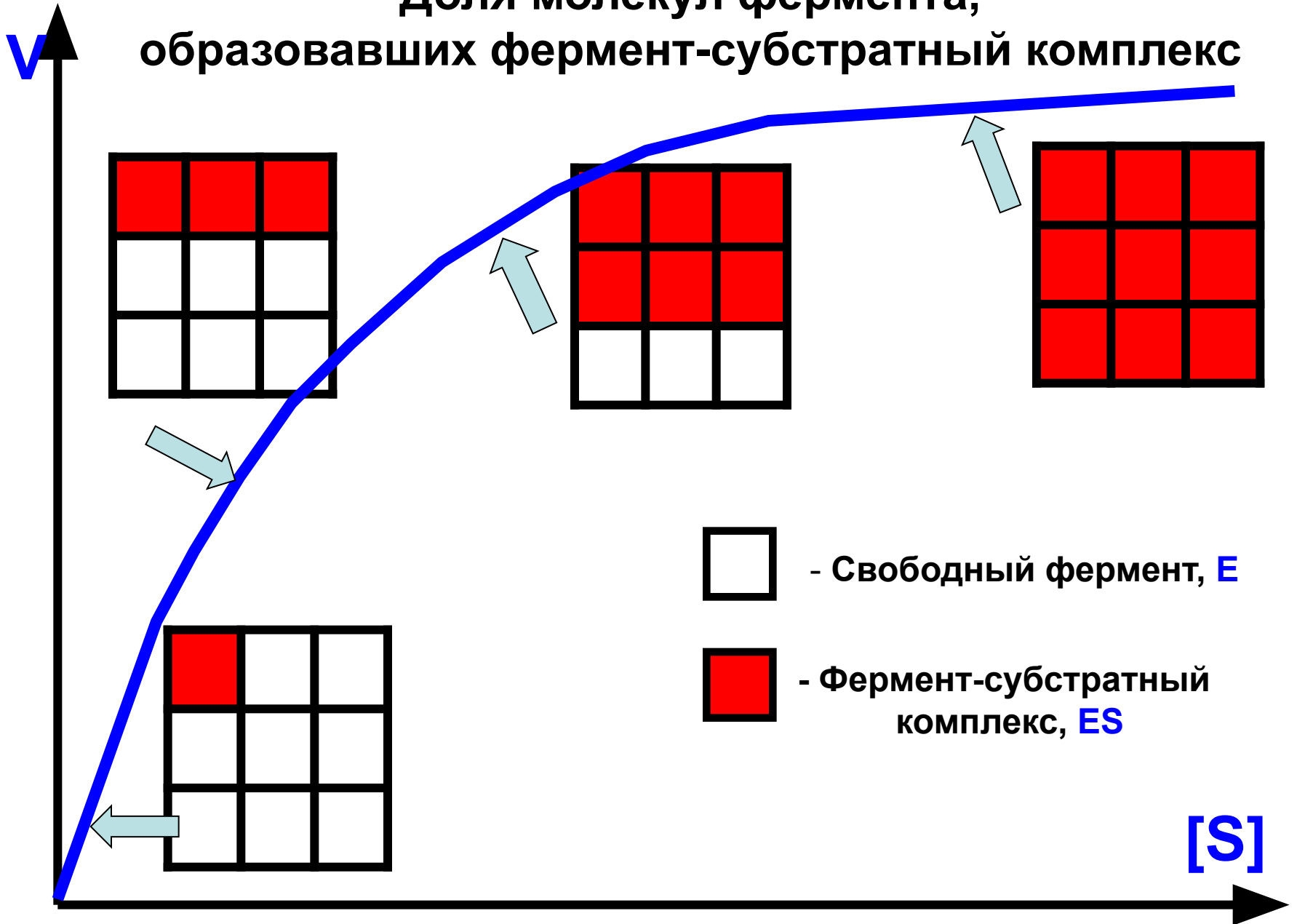
$\frac{k_2+k_3}{k_1} = K_M$ - константа Михаэлиса, **размерность:**
моль* л⁻¹

Уравнение Михаэлис – Ментен:

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



Доля молекул фермента, образовавших фермент-субстратный комплекс



Из графика, построенного на основе уравнения Михаэлис – Ментен, следует:

1. Если $[S] \ll K_m$, то наблюдаемая скорость (v) будет прямо пропорциональна $[S]$. Уравнение примет вид:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m} \quad \text{поскольку } [S] + K_m = K_m$$

2. Если $[S] \gg K_m$, то наблюдаемая скорость $v = V_{\max}$.
Уравнение примет вид:

$$V = V_{\max} \quad \text{поскольку } [S]/[S] = 1, \text{ а величиной } K_m \text{ можно пренебречь.}$$

При достижении определенной $[S]$, скорость ферментативной реакции перестает зависеть от $[S]$ – достигается состояние «насыщения». При этом все молекулы E входят в состав комплекса ES .

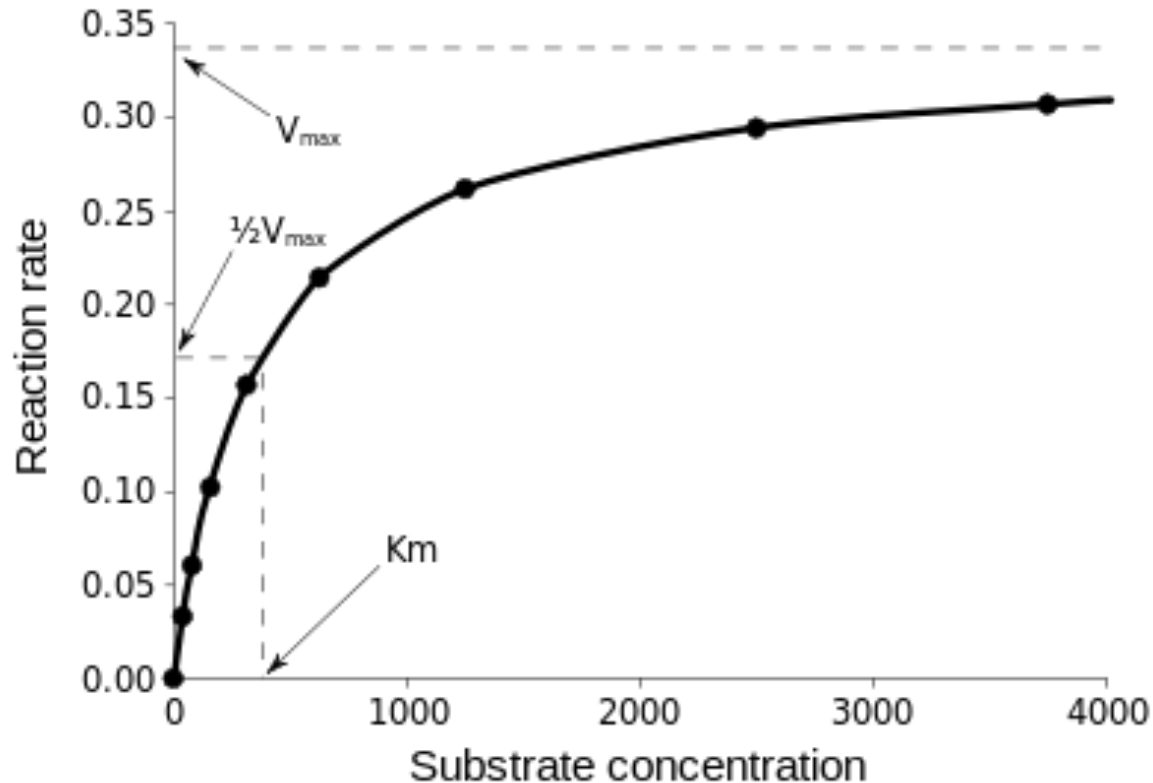
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad K_m = [S] \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right)$$

K_m нельзя путать с K_s (константой диссоциации комплек-
са **ES** или субстратной константой).



Только в случае, когда $k_2 \gg k_3$, $K_m = K_s$

График Михаэлис – Ментен имеет вид параболической кривой



Практика показала, что *in vitro* даже при $[S] = 10K_m$, наблюдаемая скорость реакции может составлять 0,92 от максимальной. Это затрудняет точное определение величины V_{max} и K_m с помощью графика Михаэлис – Ментен.

Способы линеаризации кривой Михаэлис - Ментен:

1. График Лайнуивера – Бэрка (график двойных обратных координат, 1934 г).

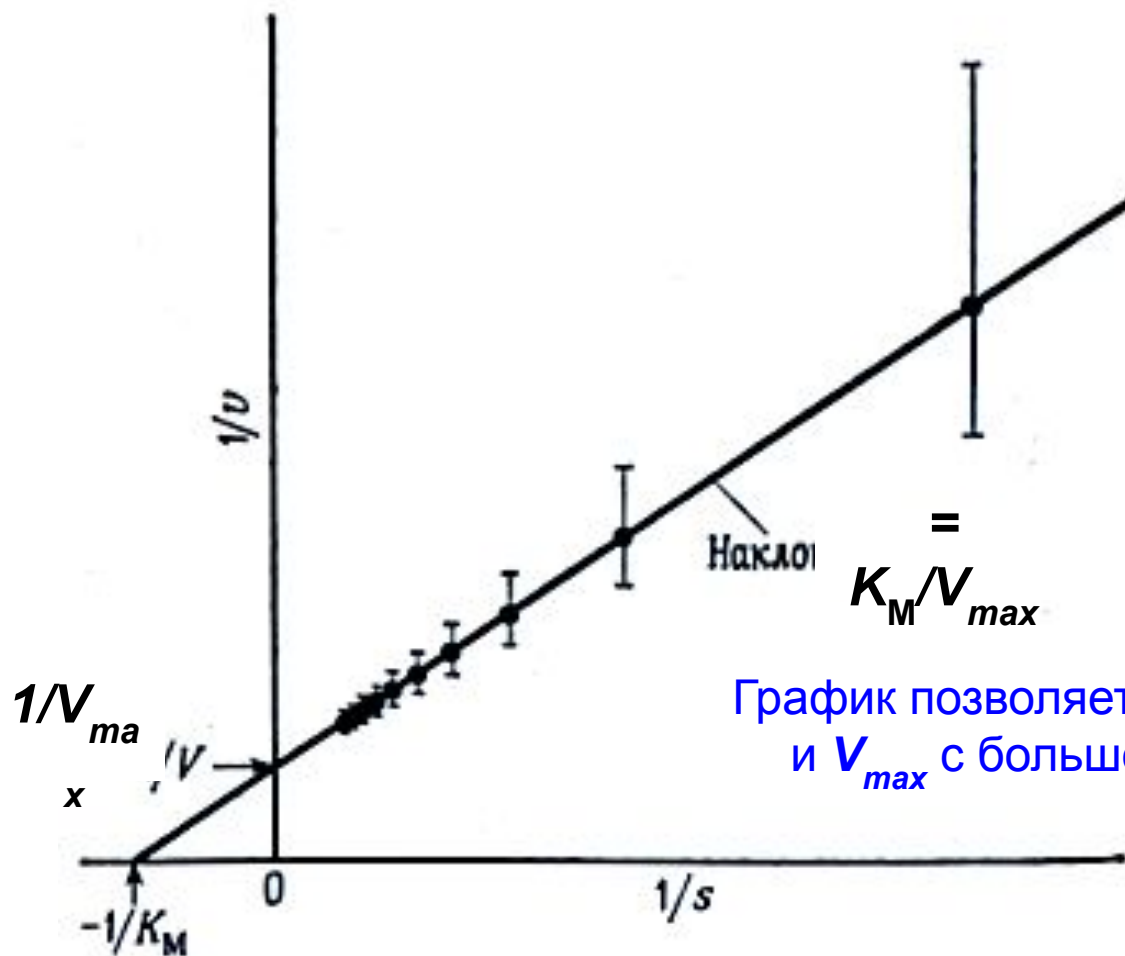
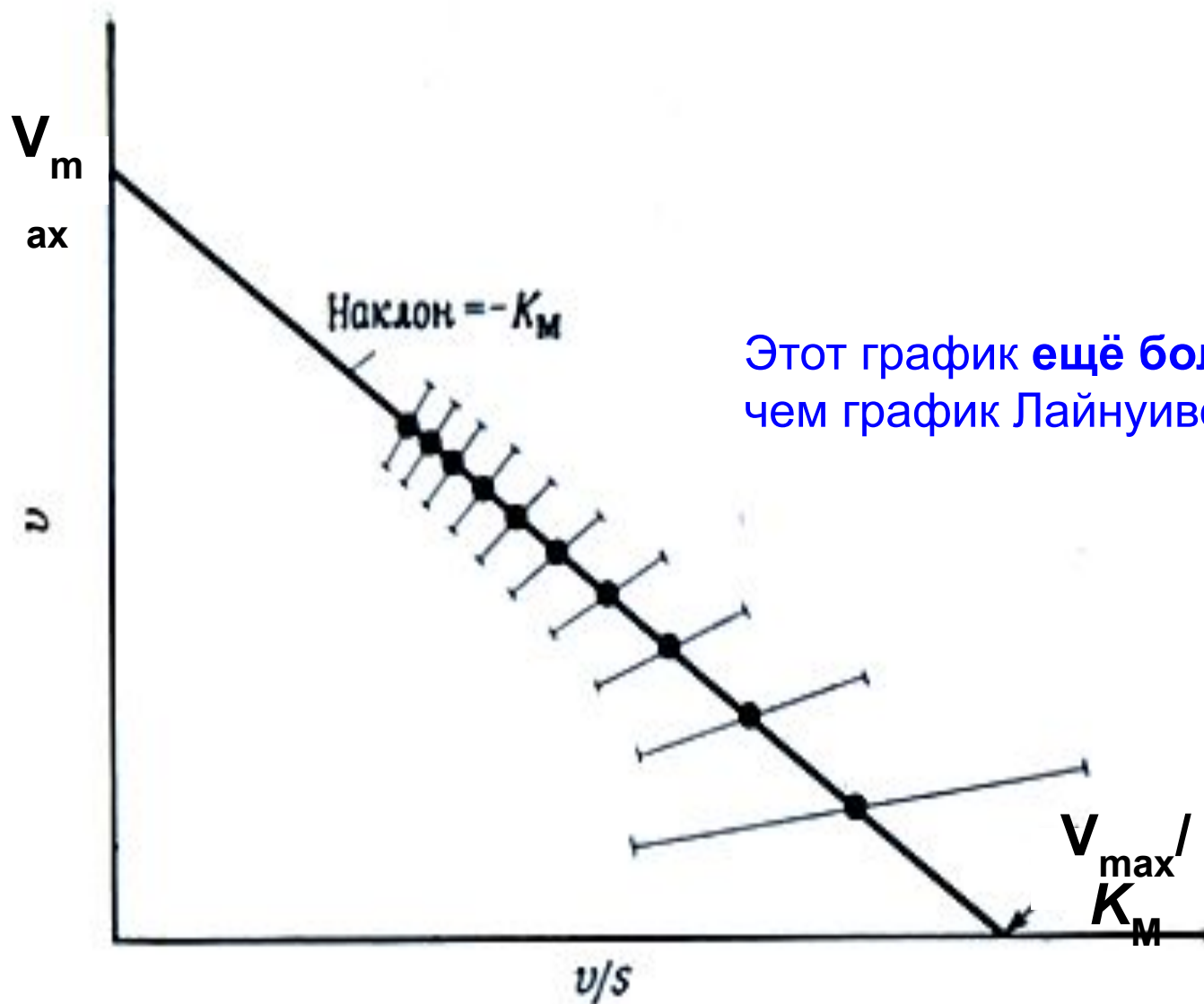


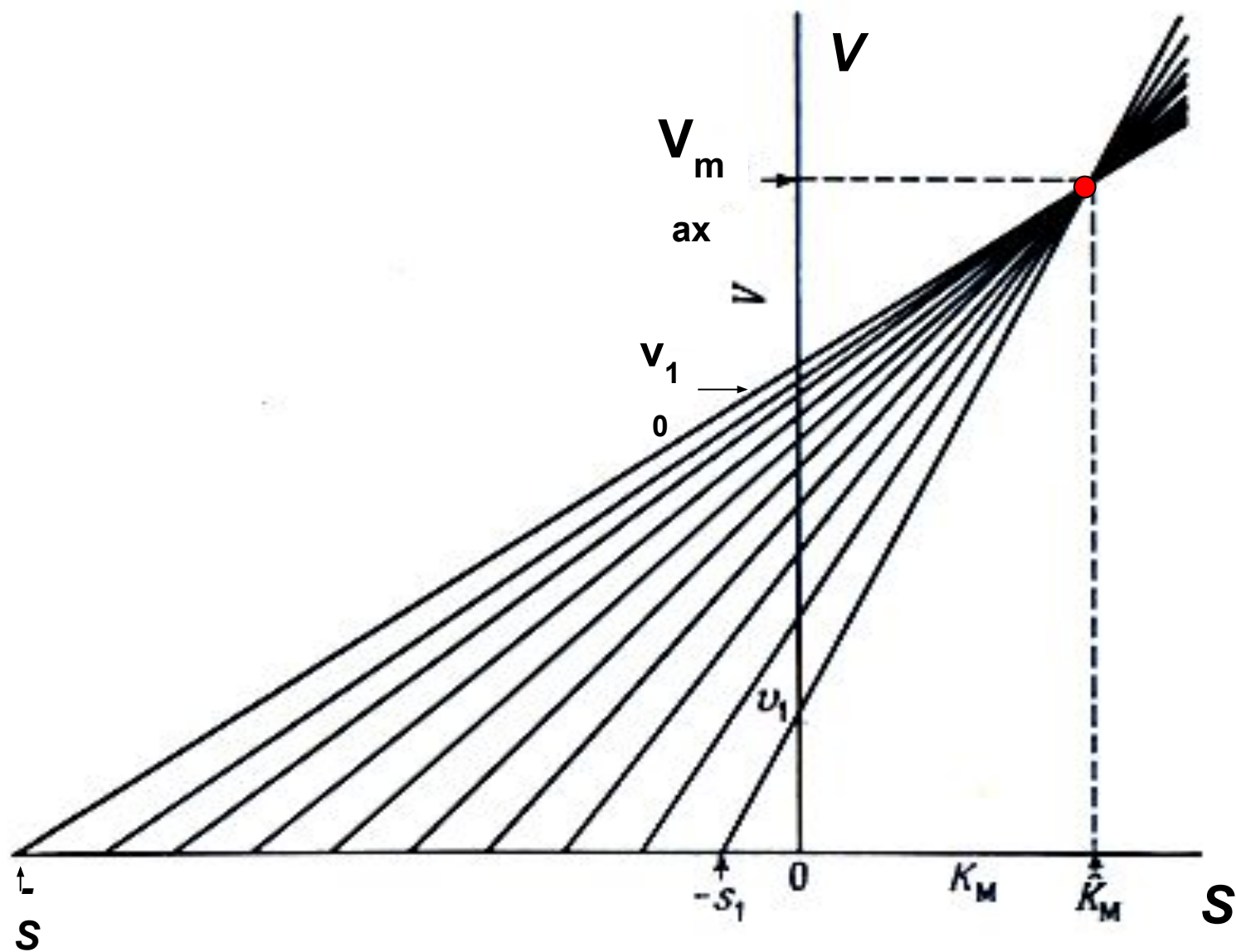
График позволяет определять K_m
и V_{max} с большой точностью

2. График Эди –Хофсти, рубеж 40 и 50-х.



Этот график **ещё более точен**,
чем график Лайнуивера-Бэрка

3. График Эйзенталя и Корниш-Бодена, 1974 г.



Для чего необходимо знать величины

$$K_m \text{ и } V_{max}$$

$$K_m$$

- Зависит от T° ; если фермент проявляет относительную субстратную специфичность, для каждого субстрата существует свое значение K_m .
- Не зависит от концентрации фермента.
- Знание K_m , позволяет корректно оценить активность фермента (определить V_{max} , дефицит субстрата не позволит ошибочно занижить активность).
- K_m – мера сродства субстрата к ферменту, мера прочности связывания субстрата с активным центром фермента. Чем выше сродство, тем меньше величина K_m .

V_{max}

- Зависит от концентрации фермента: чем больше фермента, тем выше скорость.
- V_{max} – отражает важную характеристику фермента:
число оборотов фермента.

Число оборотов фермента – количество молекул преобразованного субстрата на 1 молекулу фермента за единицу времени (при условии насыщения фермента субстратом).

Большинство ферментов имеют число оборотов около $1 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$.

**Абсолютный рекорд принадлежит карбоангидразе:
 $6 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$**

Регуляция неаллостерических ферментов

Неаллостерические ферменты активируются с участием кофакторов и коферментов, а снижают активность под влиянием различных ингибиторов.

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ингибирование \neq Инактивация

Ингибитор – соединение, специфически снижающее активность Е, путём прямого или косвенного влияния на его активный центр.

Под влиянием ингибитора активность Е может существенно уменьшаться, но **никогда не становится равно нулю.**

ИНГИБИТОРЫ



```
graph TD; A[ИНГИБИТОРЫ] --> B[ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ  
Подчиняются кинетике  
Михаэлис-Ментен]; A --> C[НЕОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ  
Разрушают/модифицируют функ-  
циональные группы в составе  
активного центра – «каталитичес-  
кие яды».  
Не подчиняются кинетике  
Михаэлис – Ментен.]; B --> D[Бесконкурентные ингибиторы]; B --> E[Неконкурентные ингибиторы]; B --> F[Конкурентные ингибиторы  
или изостерические];
```

ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Подчиняются кинетике
Михаэлис-Ментен

НЕОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Разрушают/модифицируют функ-
циональные группы в составе
активного центра – «каталитичес-
кие яды».

Не подчиняются кинетике
Михаэлис – Ментен.

Конкурентные ингибиторы
или изостерические

Неконкурентные ингибиторы

Бесконкурентные ингибиторы

Инактиваторы – комплекс химических, биологических, физических факторов, которые способны деструктурировать молекулу фермента. **Под влиянием инактиваторов активность фермента становится равна нулю.**

- **Экстремальные температуры**
 - **жёсткое УФ излучение**
 - **УЗ высокой мощности**
 - **Экстремальные рН**
- **Протеолитические ферменты**
 - **Ионизирующая радиация**

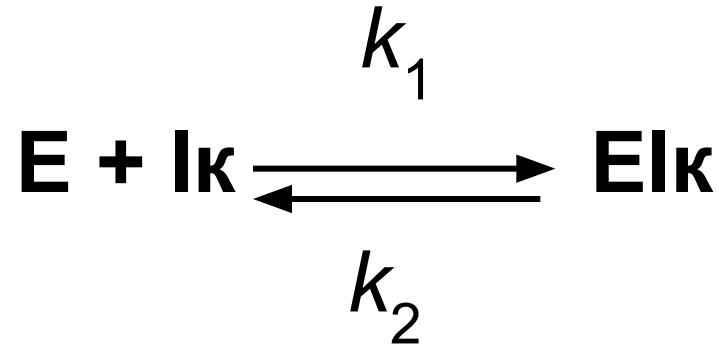
Конкурентные (изостерические) ингибиторы, I_k

Связываются с активным центром фермента, **конкурируя за активный центр с субстратом (S)**, вследствие **высокого структурного сходства I_k с S** .

Такой вид ингибирования широко распространен. Связывание происходит **только со свободной формой** фермента:

$E + I_k \rightleftharpoons EI_k$ (комплекс фермент-ингибитор, непродуктивный)

Если комплекс **ES** уже сформировался, то **I_k** присоединиться к **E** не может.



K_i – константа ингибирования (константа диссоциации комплекса **EIk**):

$$K_i = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][Ik]}{[EIk]}$$

Для проявления конкурентного ингибирования важно соотношение **[S] / [Ik]**, а не их абсолютное значение. Снять такое ингибирование можно, **создав избыток S.**

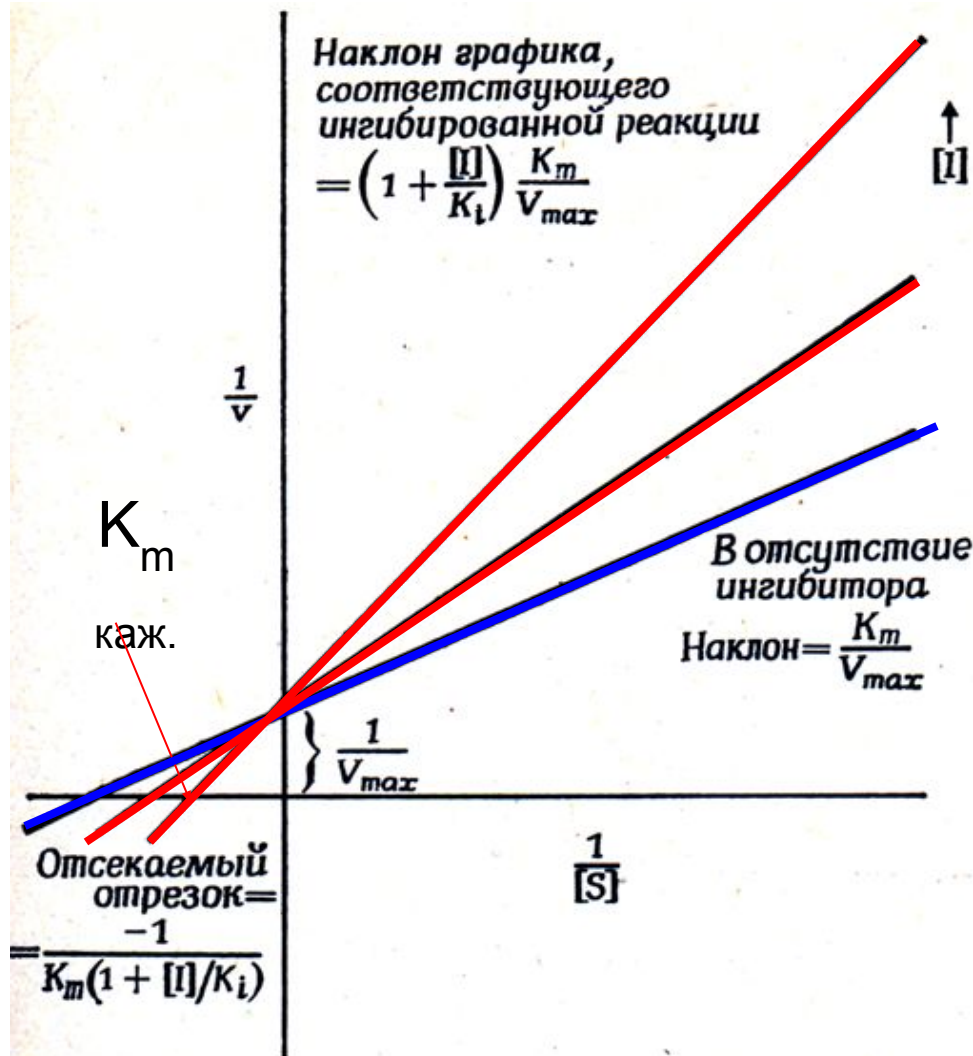
Физический смысл константы ингибирования K_i :
это концентрация конкурентного **ингибитора**, при которой он связывается с половиной **активных центров присутствующих ферментов**, вызывая **50%-торможение скорости ферментативной реакции**.

Размерность K_i – моль/л

Чем выше концентрация конкурентного ингибитора (при неизменной концентрации субстрата), тем в большей мере проявляется его эффект, поскольку отношение $[I]:[S]$ растёт. По мере увеличения $[I]$ значение K_i будет уменьшаться.

При каждой концентрации ингибитора, он занимает **часть активных центров**. Для субстрата остается всё меньше свободных центров. Таким образом, для того, **чтобы вызвать 50%-ингибирование оставшихся «работающих» центров**, понадобится добавить **меньшее количество ингибитора** (его концентрация также будет меньше).

Выявление конкурентного типа ингибирования путем построения графика Лайнуивера-Бэрка

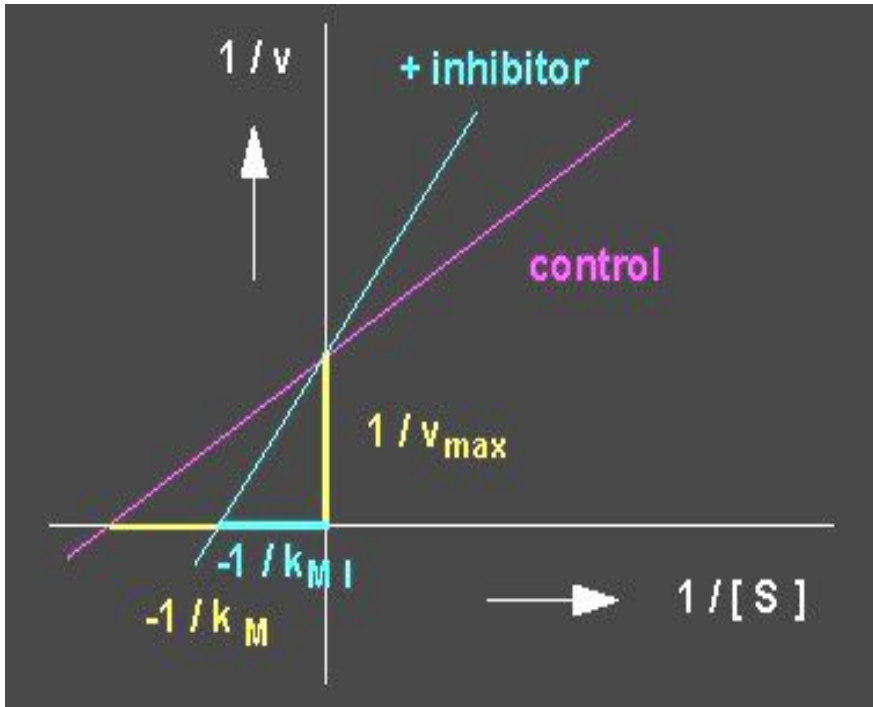


$V_{max} = \text{Const.}$
 K_m увеличивается

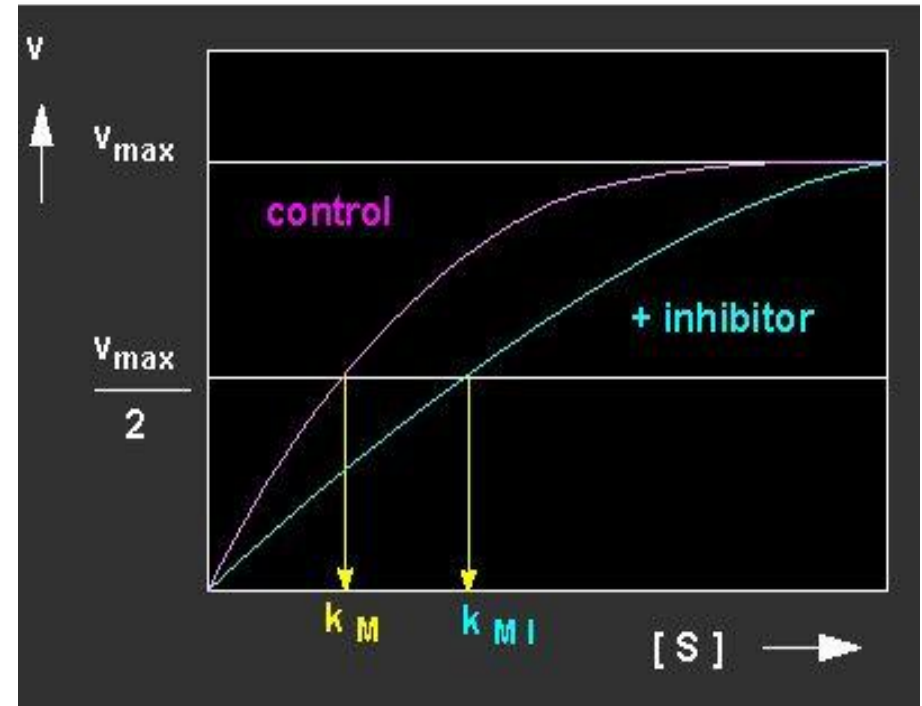
в присутствии K_i
 K_m обозначают,
 как K_m каж.

$$K_i = \frac{[I]}{\left[\frac{K_m \text{ каж.}}{K_m} - 1 \right]}$$

Влияние конкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента



Координаты Лайнуивера - Бэрка



Координаты Михаэлис - Ментен

Неконкурентные ингибиторы, Инк

Связываются не с активным центром фермента, а **с другим участком молекулы фермента** (за пределами активного центра).

Опосредованно меняется конформация активно-го центра и скорость реакции уменьшается.

$E + S + \text{Инк} \rightleftharpoons \text{E} \text{S} \text{Инк}$ (тройной комплекс,
непродуктивный)

Инк не влияет на связывание **S** с **E**.

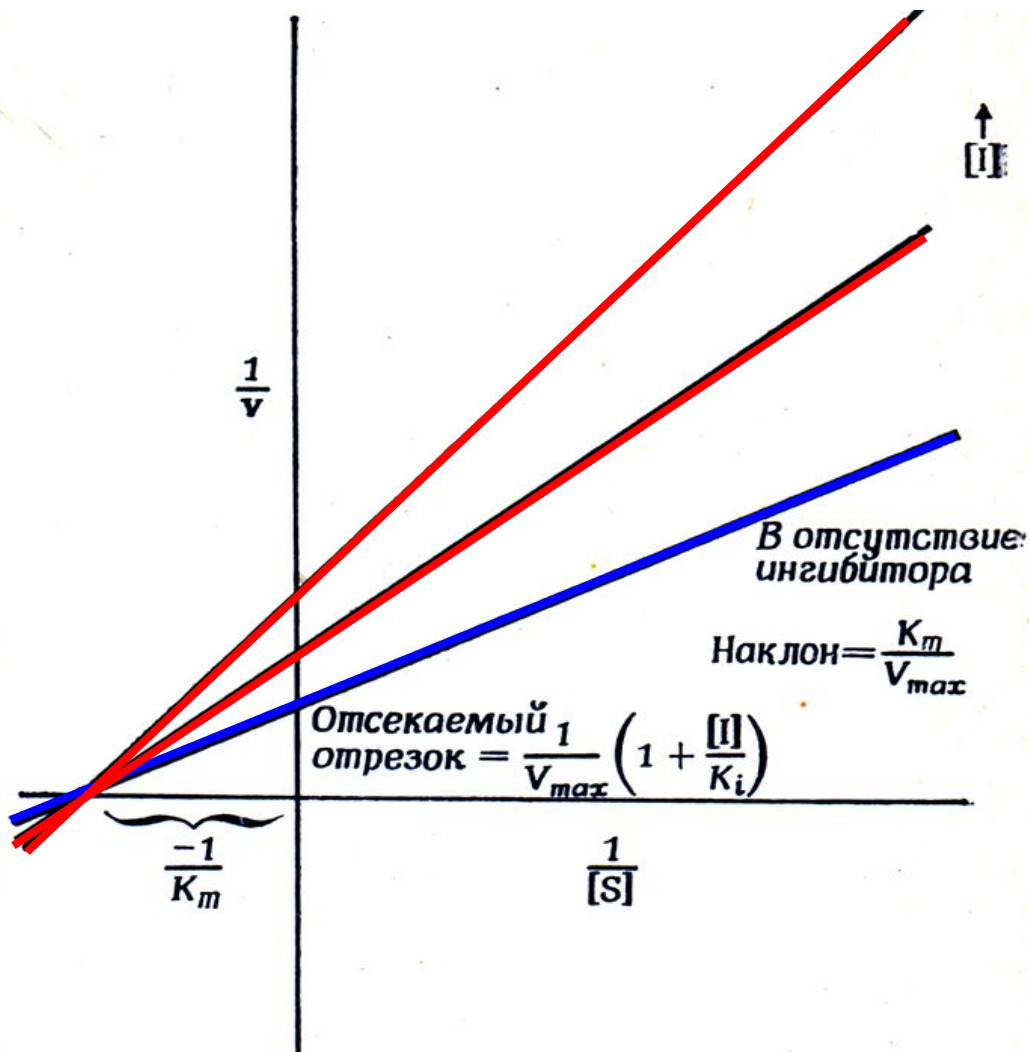
Iнк не уменьшает доли **E**, связавшегося с **S**,
но **снижает число оборотов фермента**.

Этот вид ингибирования невозможно снять избытком **S**. Но **Iнк** можно **отмыть** от **E**, поскольку ингибитор связывается с **E** обратимо.

Примеры неконкурентных ингибиторов:

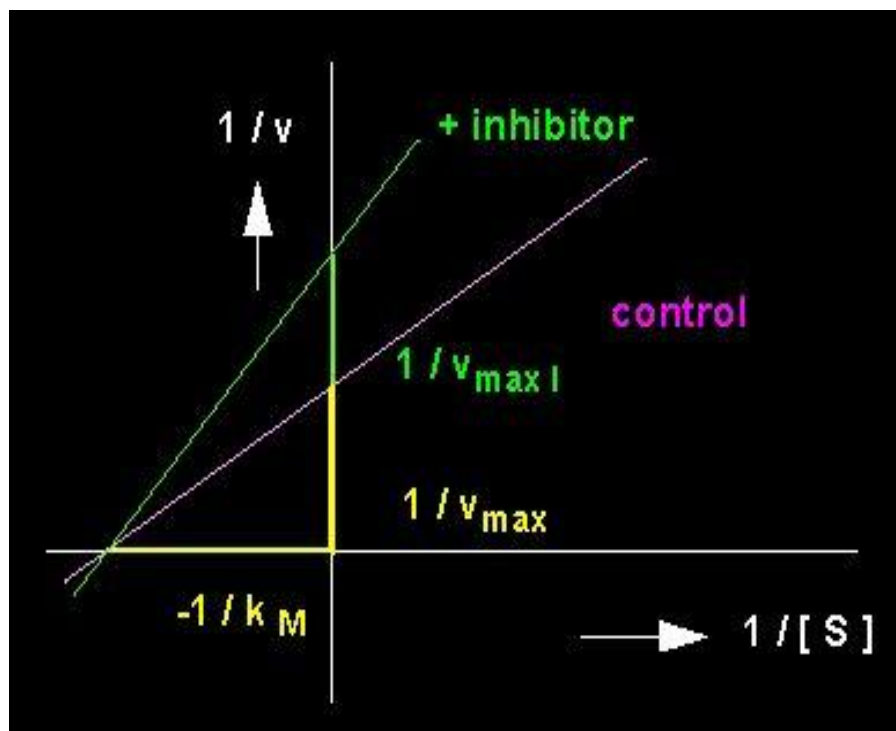
- **ЭДТА**
- **окислители SH-групп**
- **редокс переходы Me с переменной валентностью**

Выявление неконкурентного типа ингибирования путем построения графика Лайнуивера-Бэрка

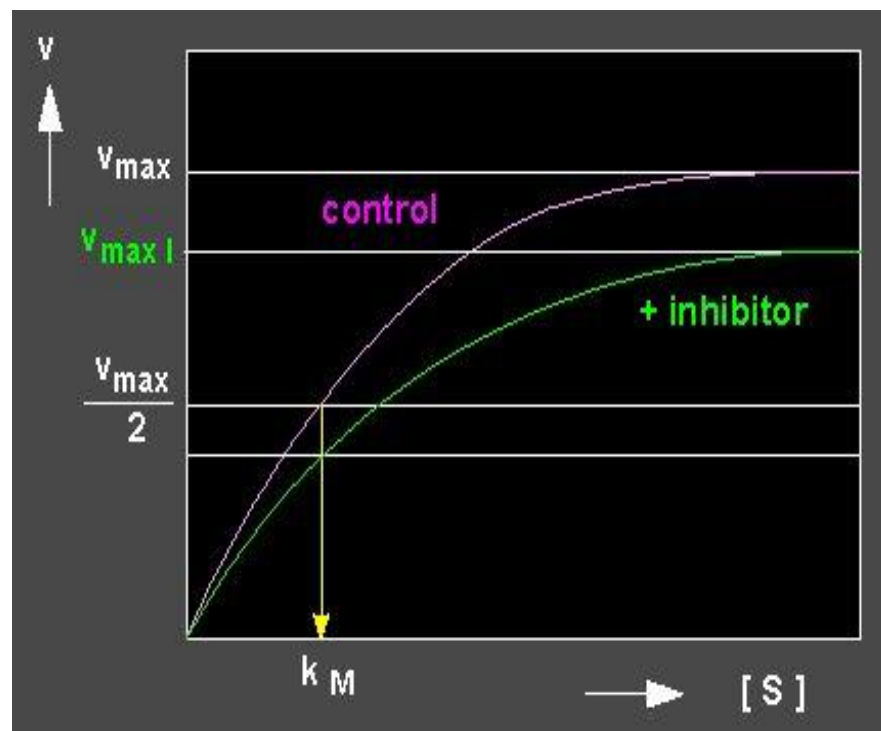


V_{max} уменьшается
 $K_m = \text{Const.}$

Влияние неконкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента

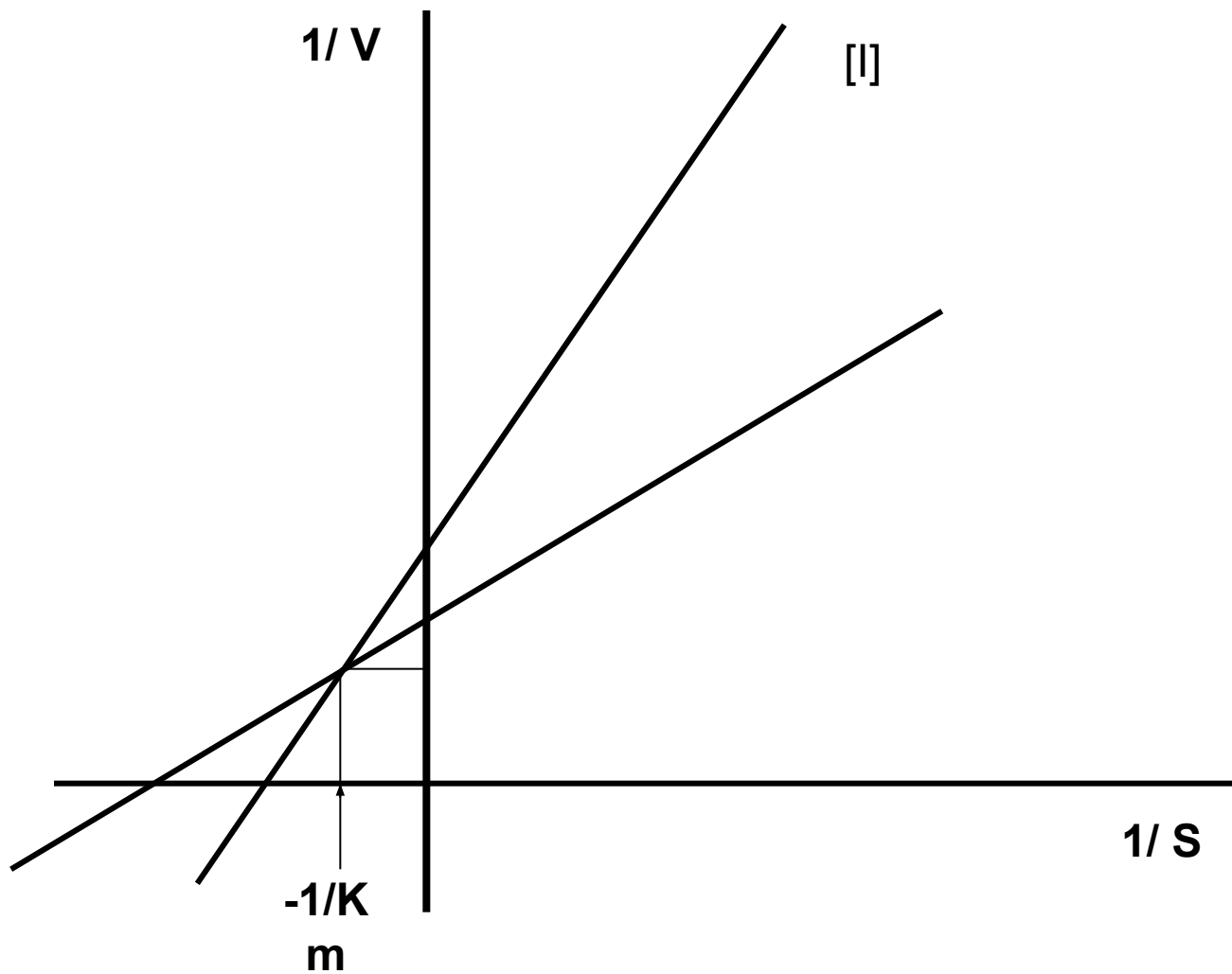


Координаты Лайнуивера - Бэрка



Координаты Михаэлис - Ментен

Выявление смешанного типа ингибирования путем построения графика Лайнуивера-Бэрка

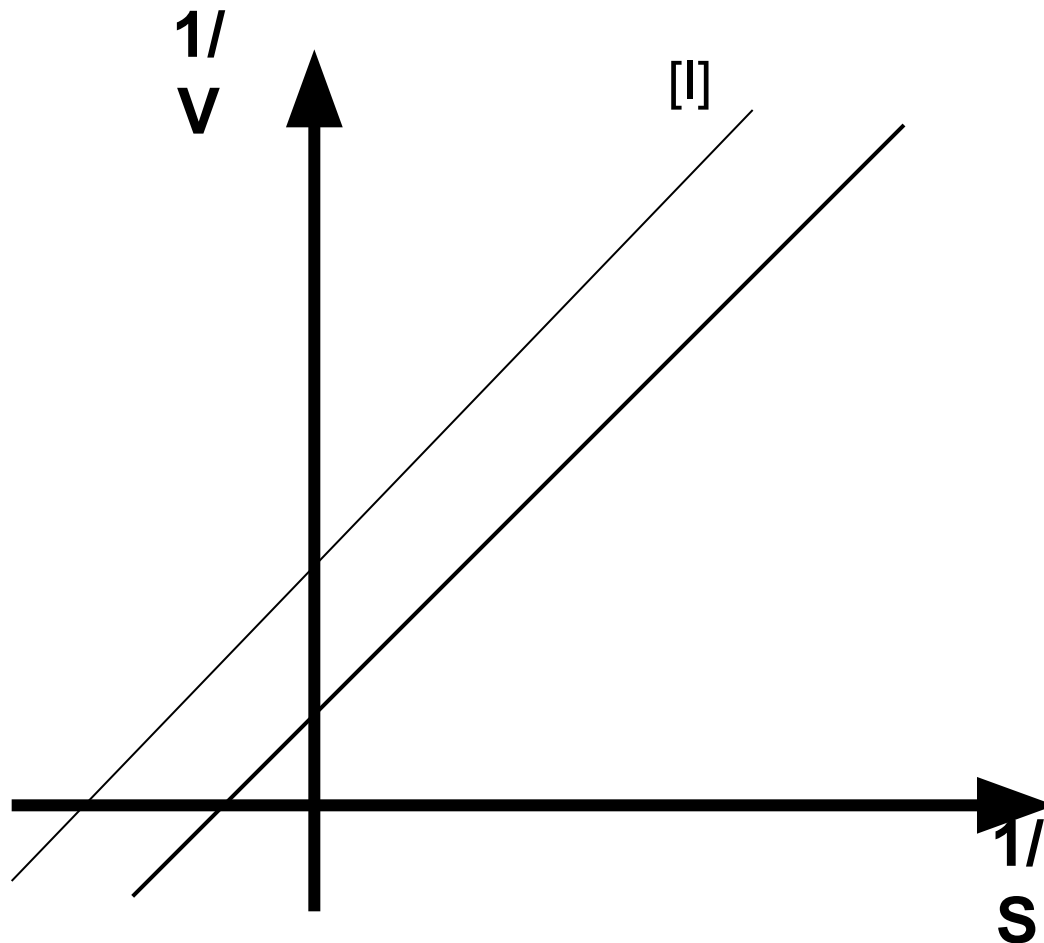


Бесконкурентные ингибиторы, I_bk

Такой ингибитор **присоединяется только к уже существующему комплексу ES**. В отсутствие **S**, ингибитор **не взаимодействует с E**.

Это означает, что участок для связывания **I_bk** в молекуле **E** «открывается», (становится доступен для **I_bk**) **только после образования комплекса ES**.

Выявление бесконкурентного типа ингибирования путем построения графика Лайнуивера-Бэрка



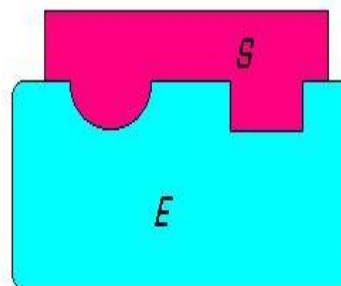
Значения K_m и V_{max} изменяются одинаковой степени.

$$\frac{K_m}{V} = \frac{V}{K_m} = \text{Const.}$$

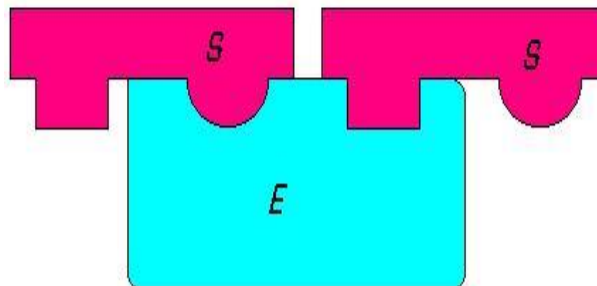
Частный случай **бесконкурентного ингибирования** – ингибирование субстратом или субстратное торможение.

В условиях **существенного избытка субстрата** (чрезвычайно высокая $[S]$) фермент может быть ингибирован в результате того, что **в его активный центр, где должна связываться одна молекула субстрата, встраивается сразу две молекулы субстрата**. Образуется непродуктивный комплекс **ESS** (вместо **ES**):

Такое ингибирование можно **снять** путем **уменьшения концентрации субстрата**.



нормальное связывание, превращение возможно

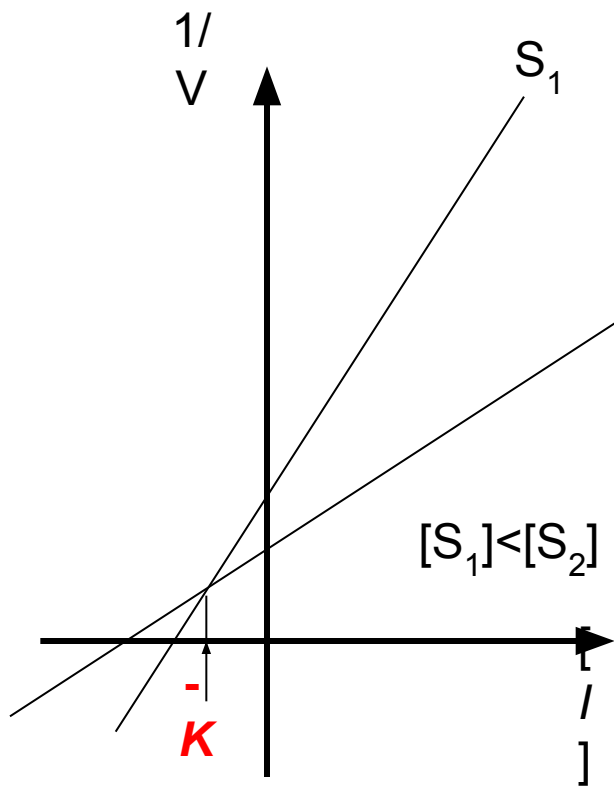


аномальное связывание, ни один из субстратов не превращается в продукт

Графические методы определения величины K_i

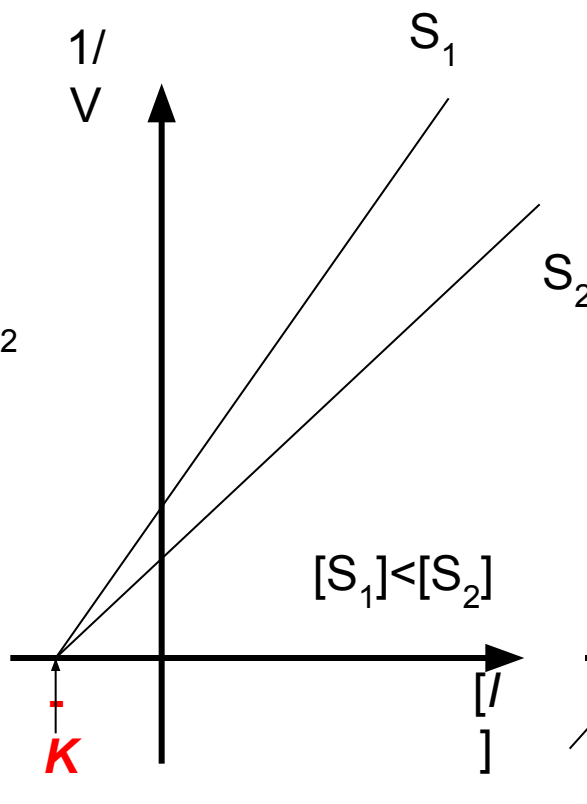
Определяют V в зависимости от $[I]$ при двух постоянных $[S]$.

Конкурентное



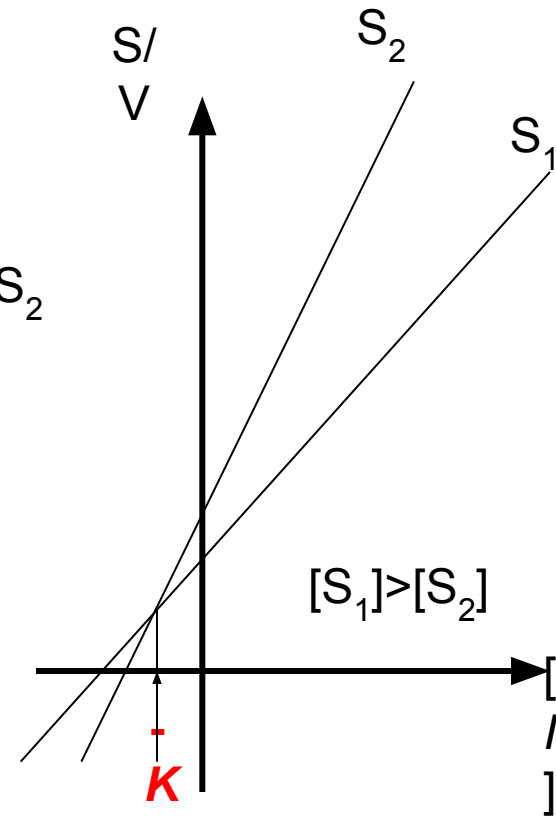
Метод Диксона

Неконкурентное



Метод Диксона

Бесконкурентное



Метод Корниш-Боудена