

Лекция №6

Кинетика ферментативного катализа.

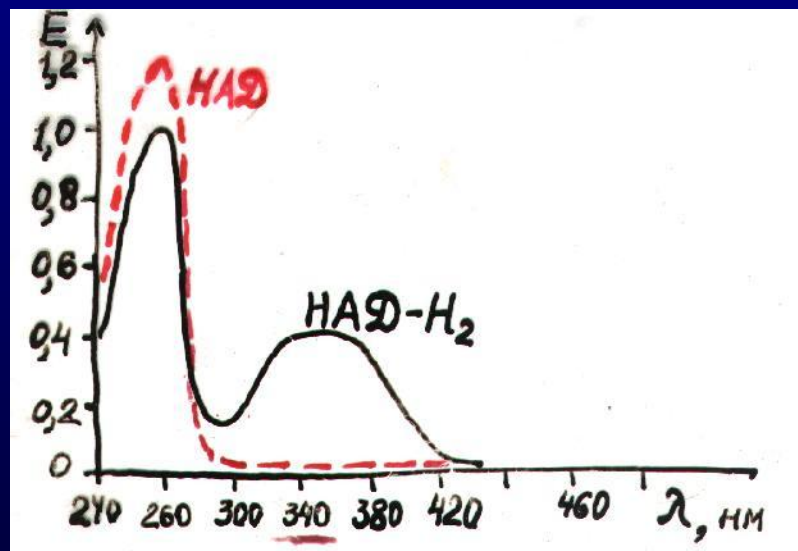
Регуляция активности ферментов.

1. Методы определения количества ферментов

Наиболее часто используемые:

- 1) Колориметрические - основаны на определении образующихся в ходе реакции окрашенных веществ.
Спектрофотометрические – основаны на поглощении света в определенных участках спектра субстратами и продуктами реакции, реже активными группами ферментов.

Определение
активности НАД –
зависимых
дегидрогеназ



2. Способы выражения активности ферментов.

Используются 2 основные единицы:

- 1) **КАТАЛ** – такое количество фермента, которое может осуществить превращение 1 моль субстрата за 1 сек.

Катал = Моль/с, мМоль/с, мкМоль/с, нМоль/с

2) **IU - International Units**

МЕ(международная единица) – то количество любого фермента, которое катализирует превращение 1 мкМоля субстрата в минуту при заданных условиях.

МЕ = мкМоль / мин

Активность ферментов в сыворотке и плазме крови - в единицах на 1 литр : МЕ/л, Е/л

IU(МЕ) $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ нкат/л К = 16,67

1 МЕ = 16,67 нкат/л

3. Кинетика ферментативных реакций

Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ и условий их взаимодействия на скорость ферментативной реакции.

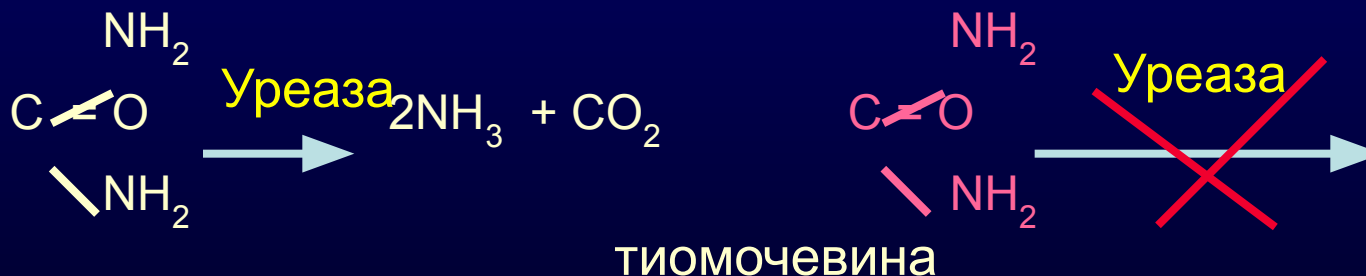
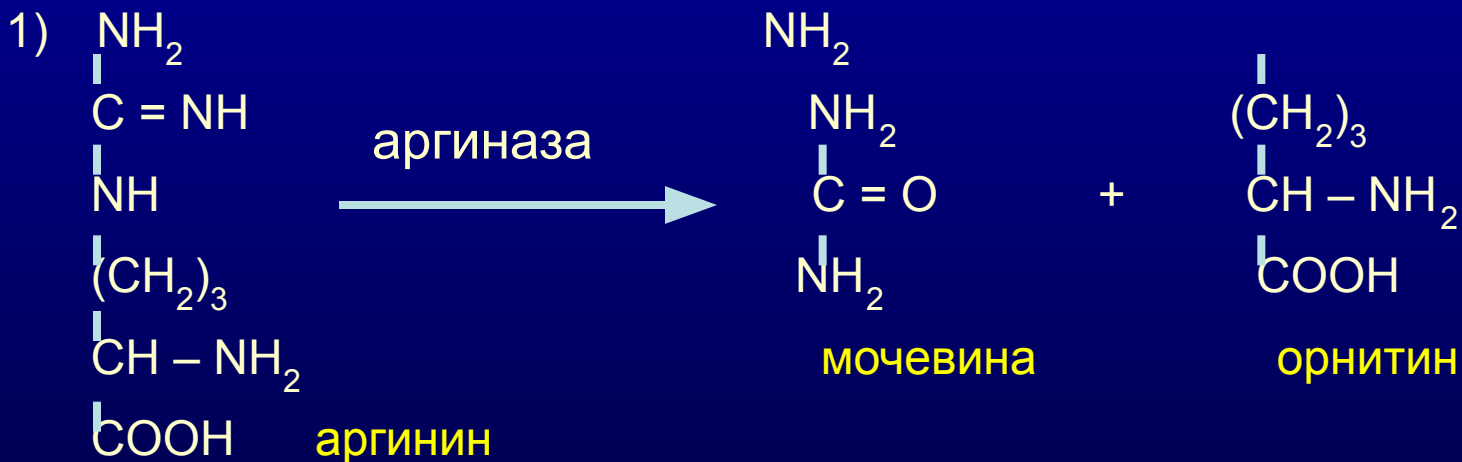
*РАССМОТРИМ ФАКТОРЫ , КОТОРЫЕ ВЛИЯЮТ НА СКОРОСТЬ
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ:*

1) Зависимость скорости от вида субстрата.

Ферменты обладают избирательностью действия - **специфичность действия:**

1 – Абсолютная специфичность. - фермент превращает только 1 субстрат.

Стереохимическая специфичность – разновидность абсолютной. (ЛДГ осуществляет превращение только L- лактата)



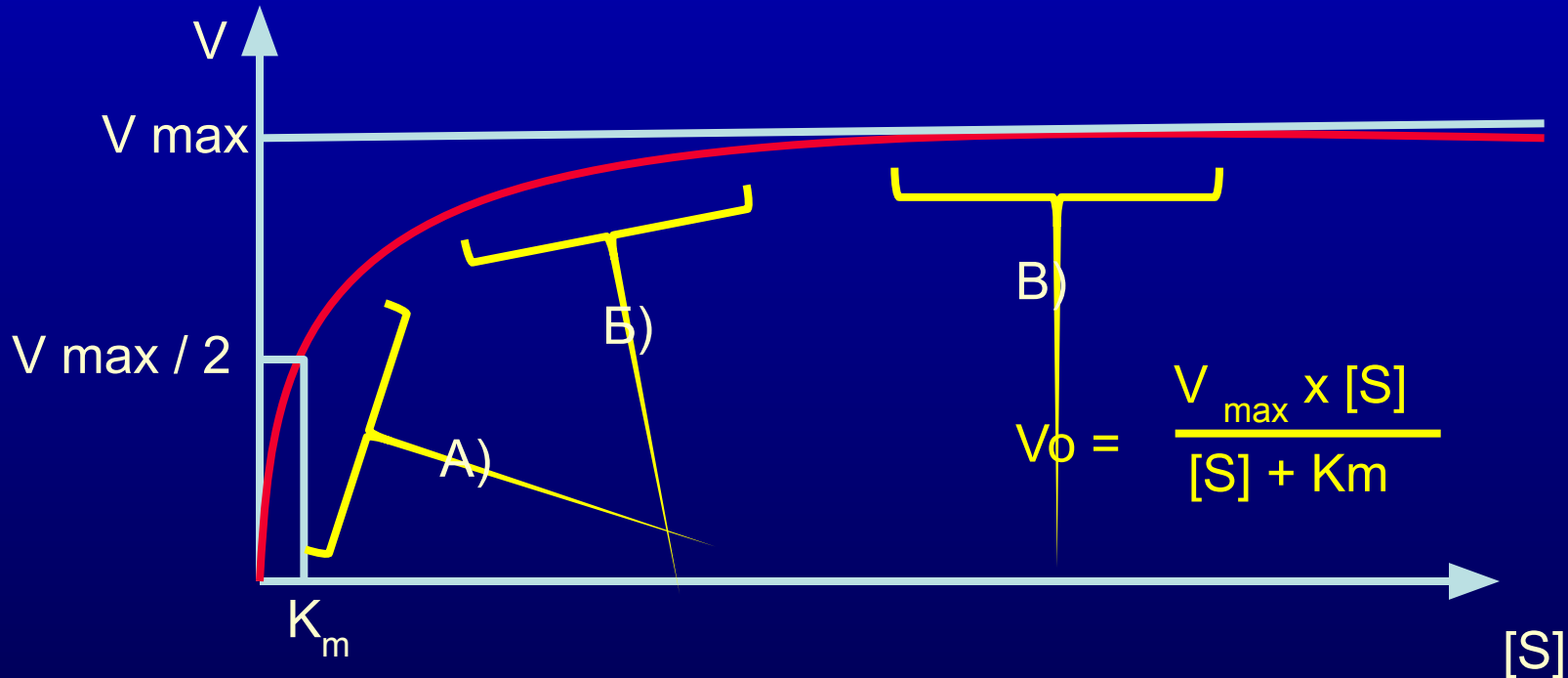
2 – Относительная специфичность

(объясняется тем, что, активный центр ферментов, обладающих относительной специфичностью не жесткая структура, он может менять свою конформацию при образовании E-S комплекса, и с каждым S эта конформация своя.)



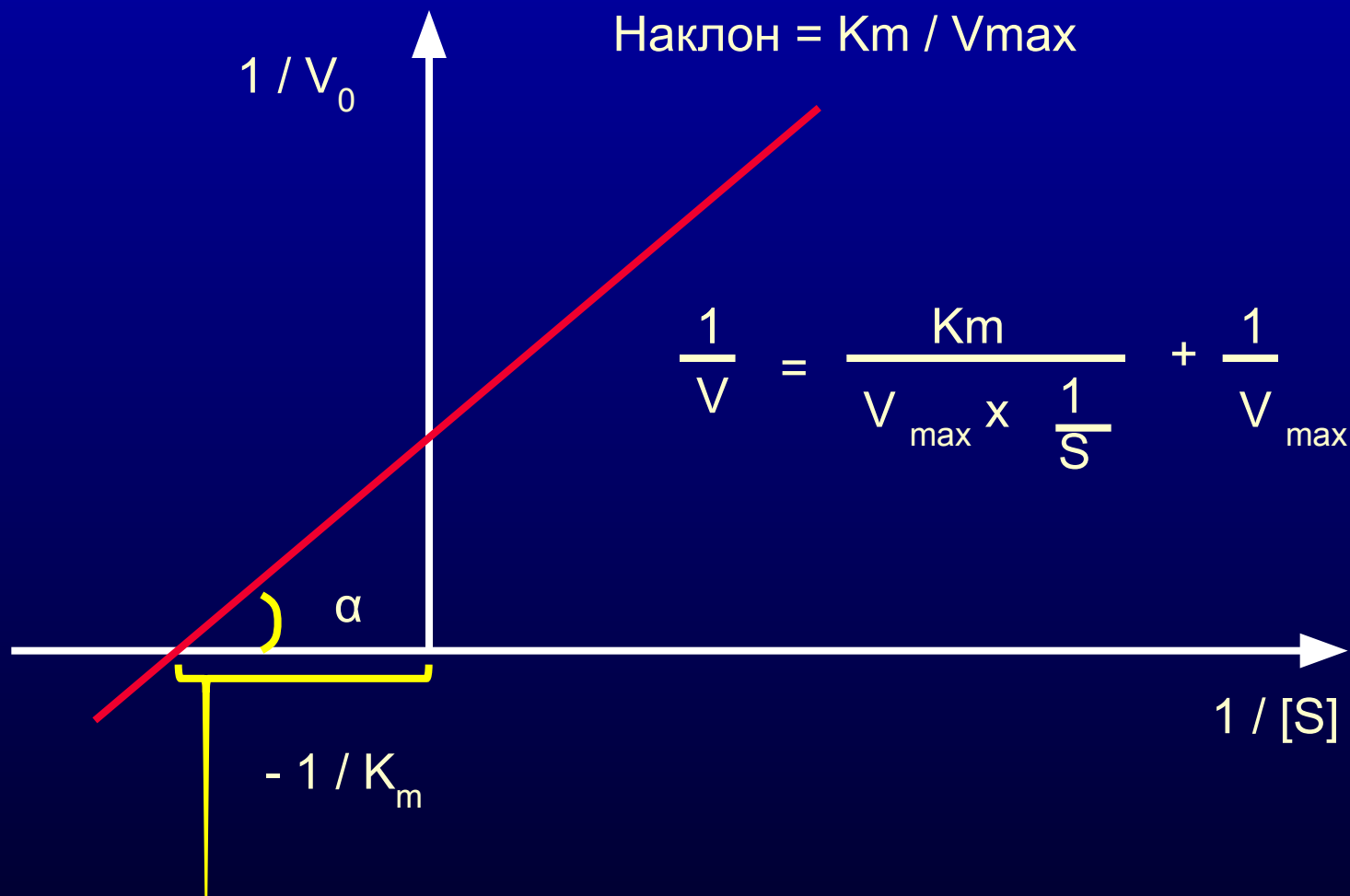
2) Влияние [S] на скорость реакции.

Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента. (Михаэлиса – Ментен)

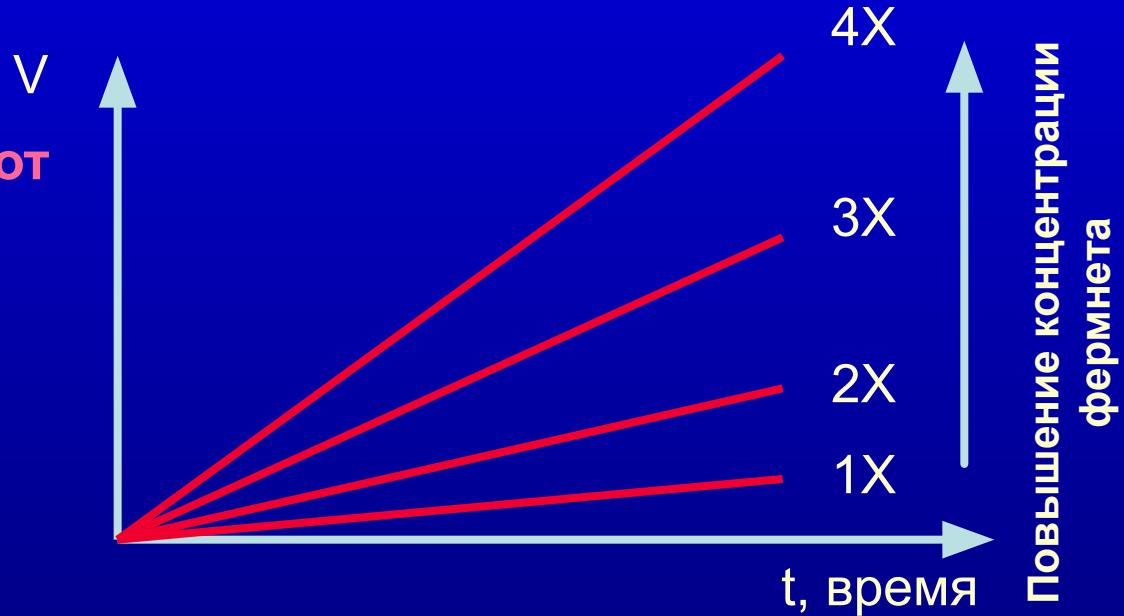


- а) – реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна $[S]$)
- б) – реакция смешанного порядка (скорость пропор. конц. реаг. в-в)
- в) – реакция нулевого порядка (высокая скорость , не зависящая от $[S]$).

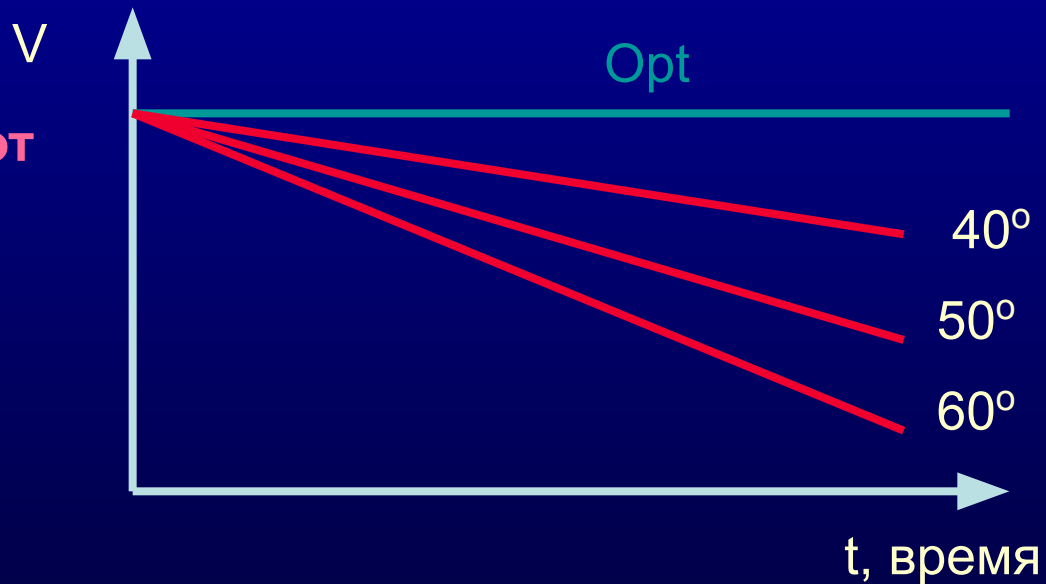
График Лайнуивера – Берка,
построенный по методу
двойных обратных величин.



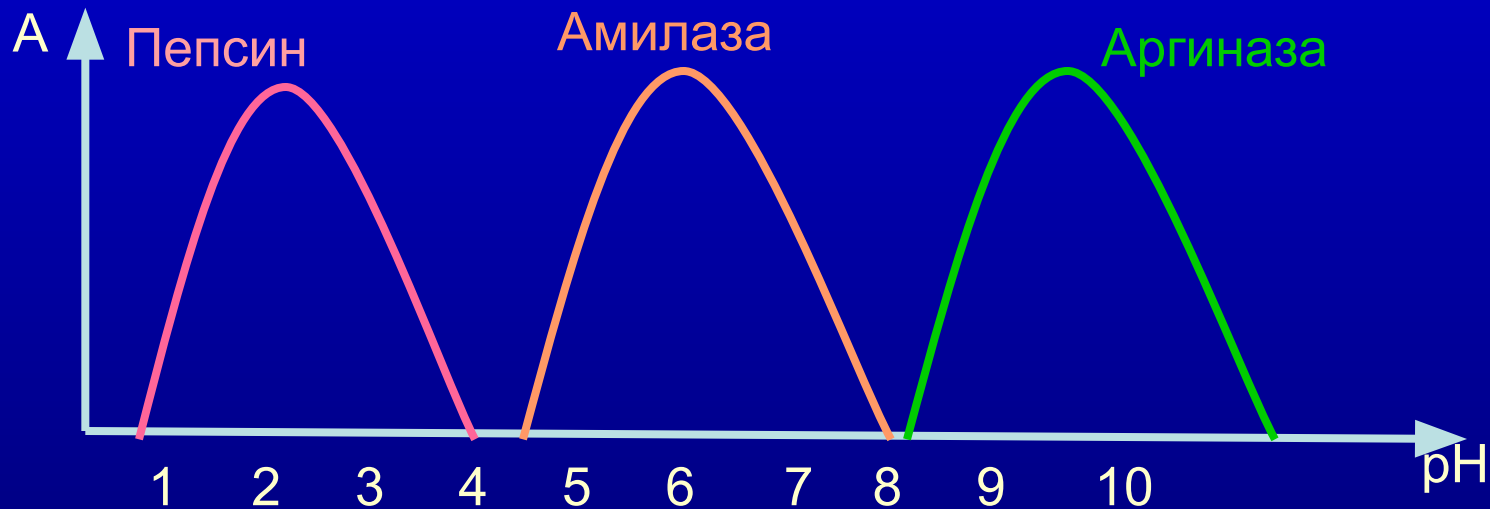
3) Зависимость скорости реакции от концентрации фермента.



4) Зависимость скорости реакции от температуры.

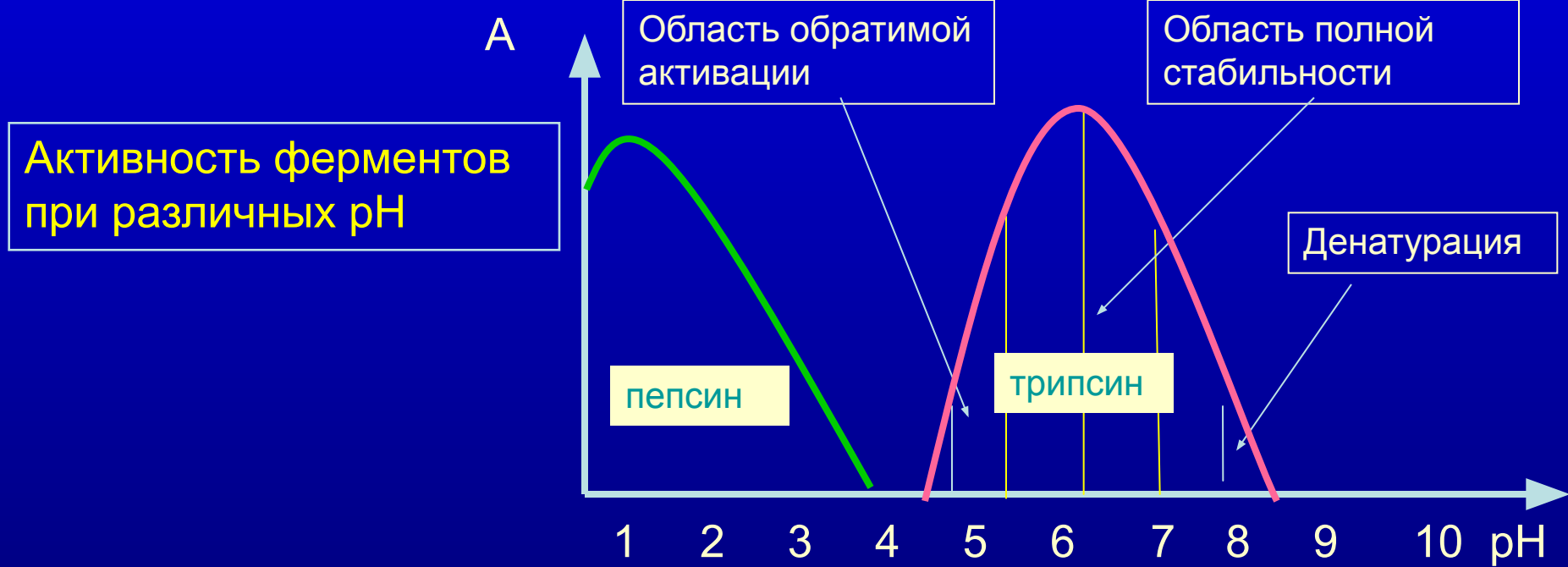


4) Зависимость скорости реакции от pH среды.

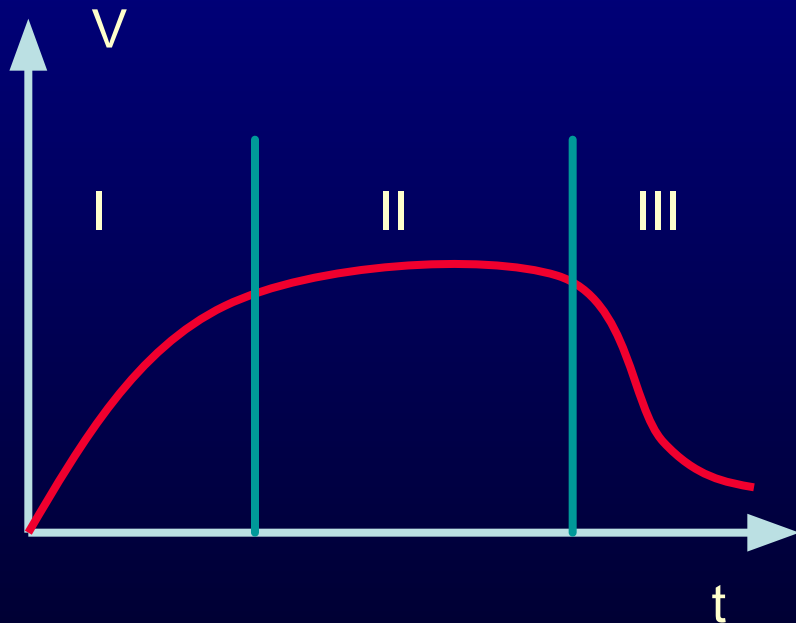


В норме pH цитозоля = 7,2

ФЕРМЕНТ	Opt pH
Пепсин	1,5
Амилаза слюны	6,8 – 7,0
Трипсин	7,7
Каталаза	7,6
Уреаза	7,0 – 7,2
Липаза	7,0 – 8,5
Щелочная фосфатаза	10



Ход ферментативной реакции во времени



I – переходный участок

II – участок начальной скорости реакции в стационарной фазе

III – участок основного протекания реакции

Влияние различных веществ на активность ферментов

1. АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

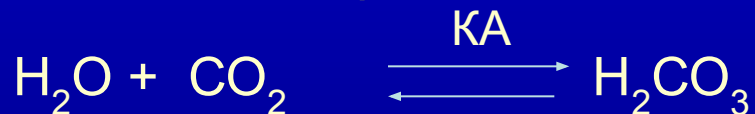
1.1. Активация ферментов ионами металлов

Ионы Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , K^{+}

- Входят в состав простетической группы фермента, компонент активного центра
- Облегчают образование ES - комплекса
- Способствуют присоединению кофермента к апоферменту
- Обеспечивают становление четвертичной структуры фермента
- Действуют иными путями:
 - создание каталитически активной конформации белка
 - влияние на поверхностный заряд молекулы фермента
 - удаление ингибитора
 - вытеснение неэффективного иона из связи с ферментом

Механизм активации ферментов металлами

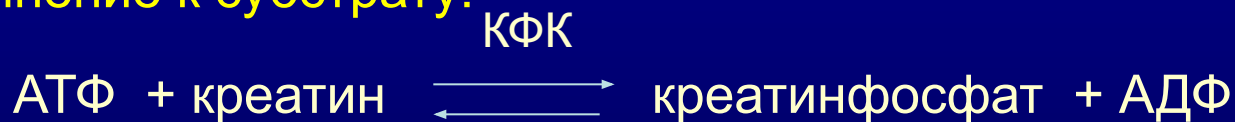
1. В состав активного центра:



Zn:



2. Присоединение к субстрату:

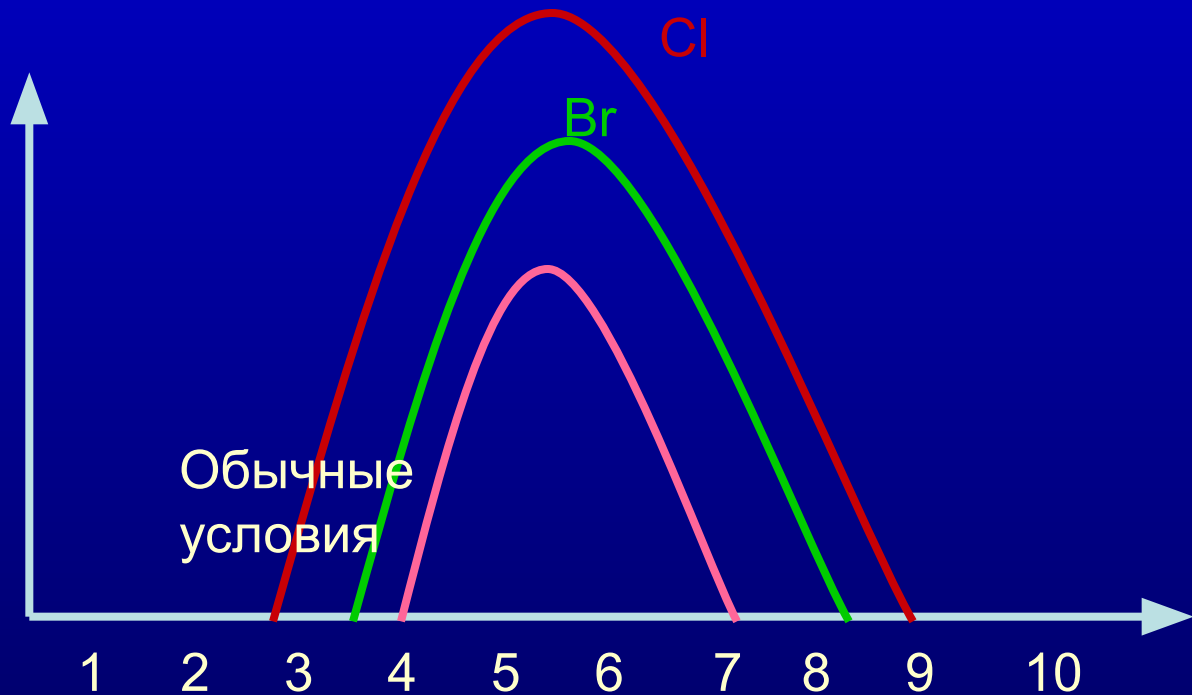


Комплекс металл - субстрат



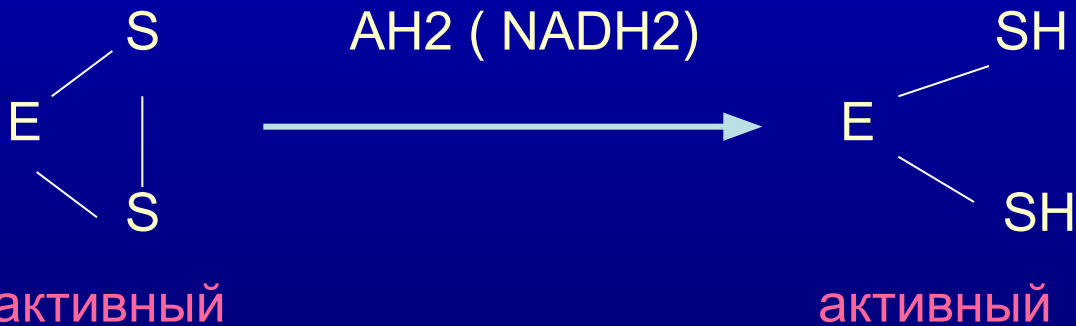
Регуляция ферментов анионами

Активность амилазы в присутствии различных ионов

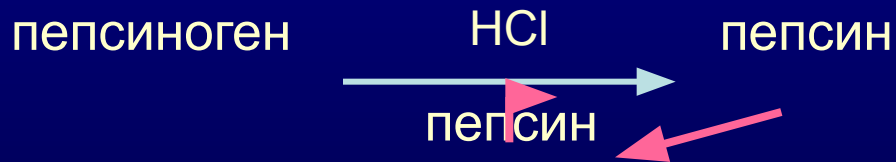


Активация ферментов

- 1) Ионами металлов
- 2) Восстановленными соединениями



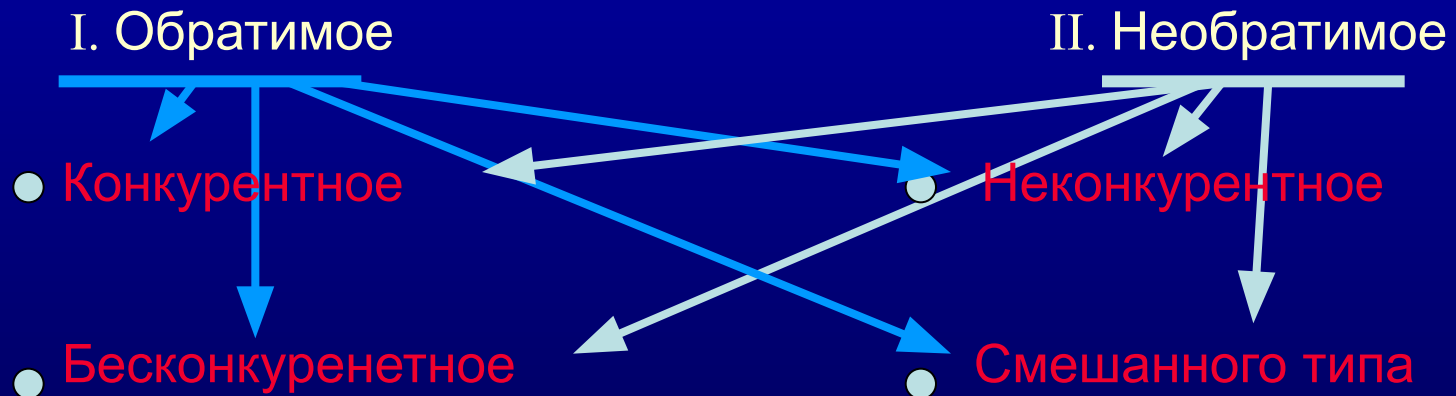
- 3) Частичный протеолиз



- 4) Аллостерическими активаторами (АДФ, АМФ)
- 5) Гормонами через посредников: цАМФ, цГМФ

Реакции ингибирования ферментативных процессов.

ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

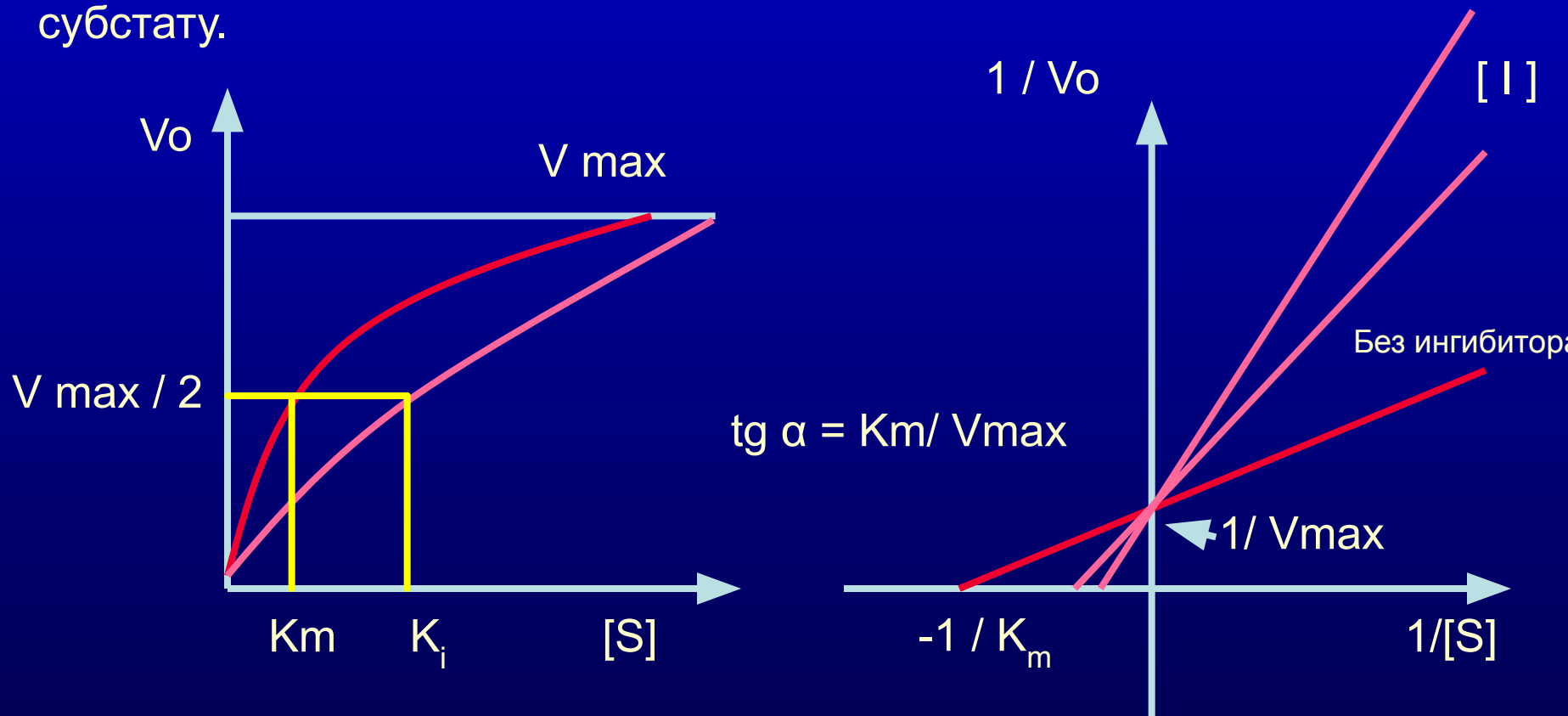


Для определения обратимости ингибирования проводят диализ среды, где есть фермент и ингибитор.

Если после диализа восстанавливается активность фермента, то торможение - **обратимое**.

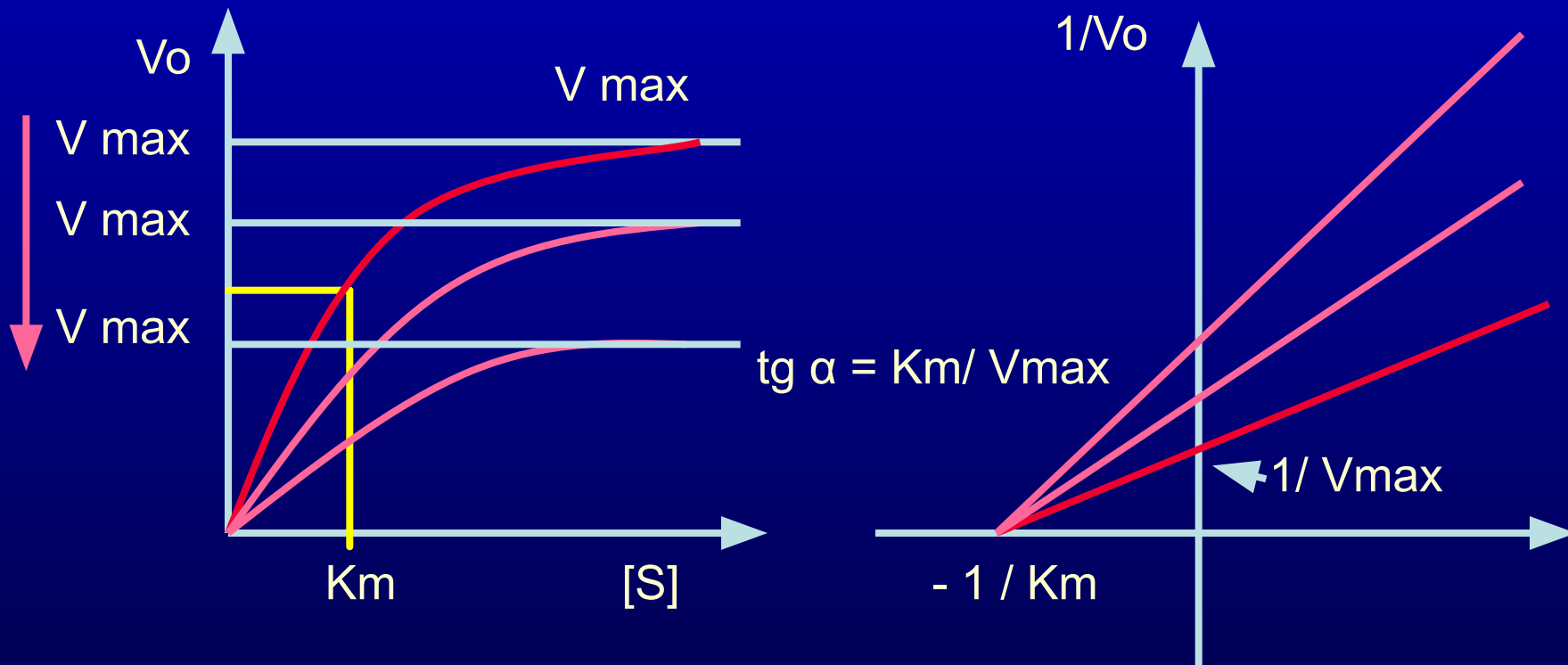
1. Конкурентный тип ингибирования

Осуществляется веществом, близким по химическому строению к субстрату.



2. Неконкурентное торможение

Ингибитор реагирует с ферментом иным образом, чем субстрат, и поэтому повышение концентрации субстрата не может вытеснить ингибитор и восстановить активность фермента



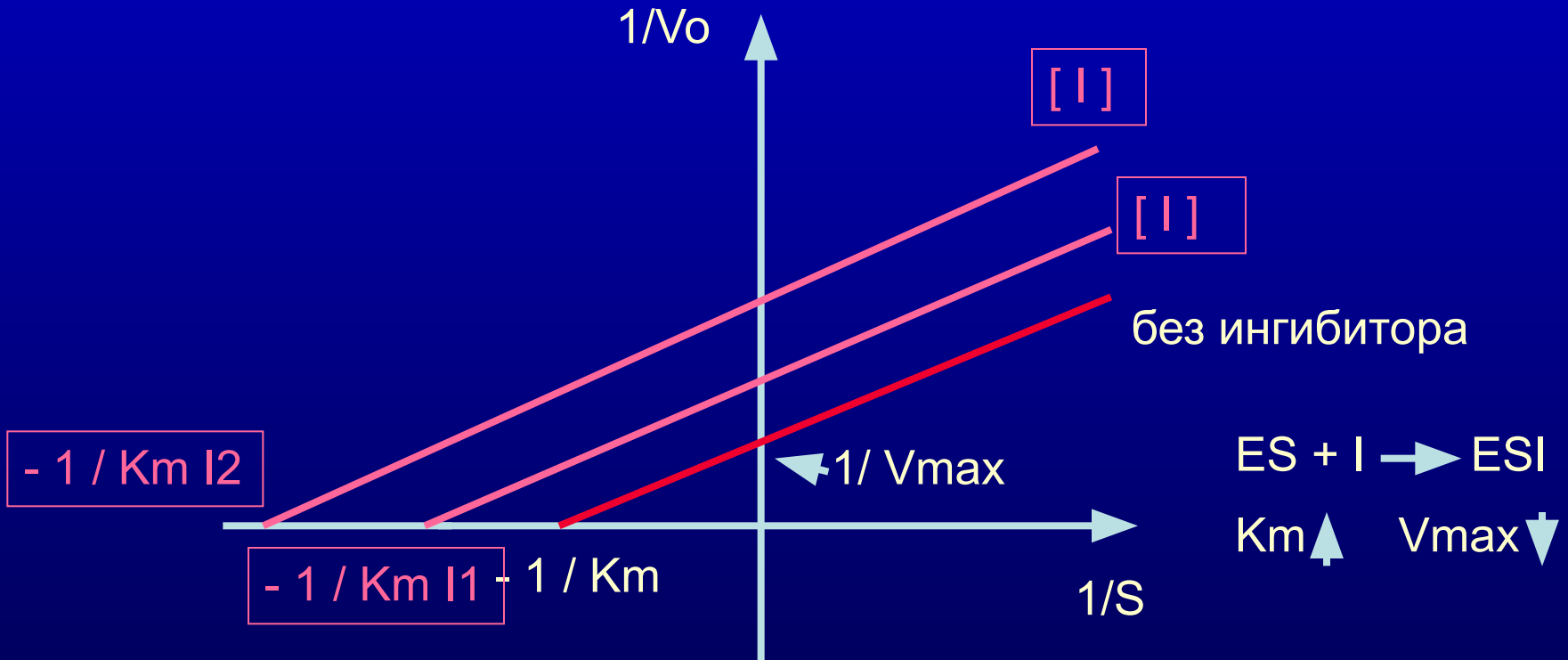
$K_m = \text{const}$

V_{max}



3. Бесконкурентное торможение

Ингибитор взаимодействует с фермент – субстратным комплексом.



4. Смешанный тип торможения

Ингибитор взаимодействует с ферментом в различных участках молекулы.

Ингибиторы взаимодействуют с ферментами различными путями, они могут:

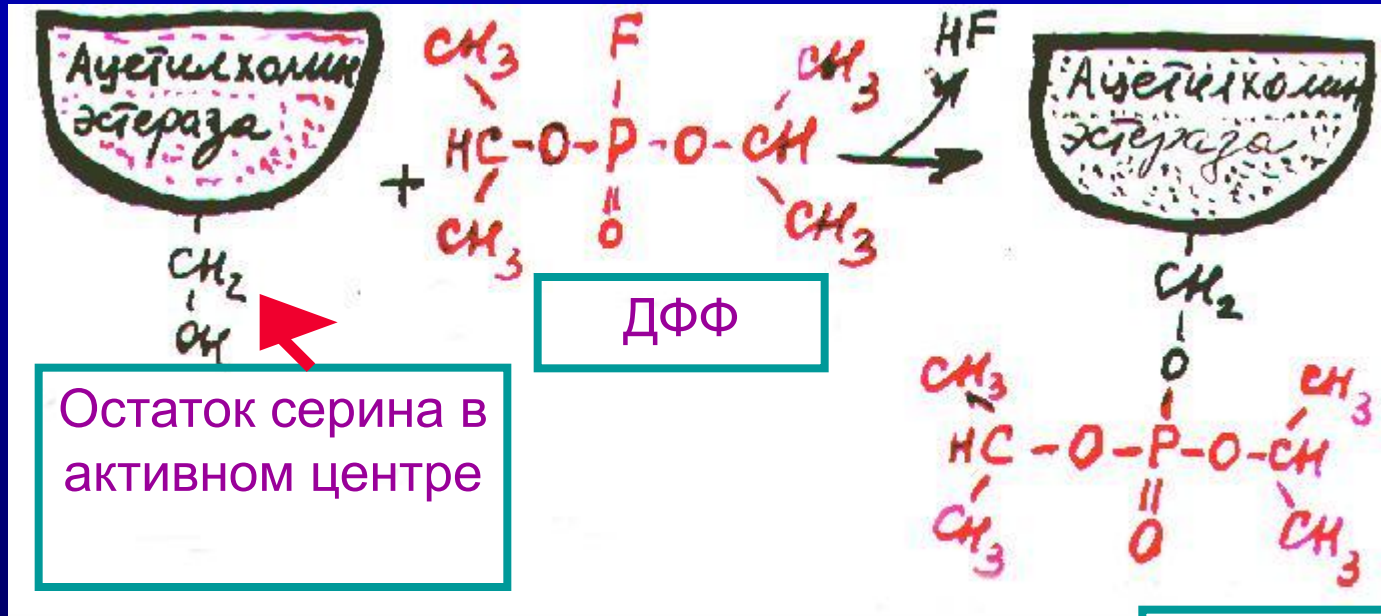
- Блокировать активный центр фермента
- Менять четвертичную структуру фермента
- Блокировать часть фермента, соединяющуюся с коферментом, активатором
- Нарушать взаимодействие фермента с субстратом
- Соединяться с коферментом, активатором
- Вызывать денатурацию фермента (неспецифические ингибиторы)
- Связываться с аллостерическим центром

Классификация ингибиторов

ИНГИБИТОРЫ



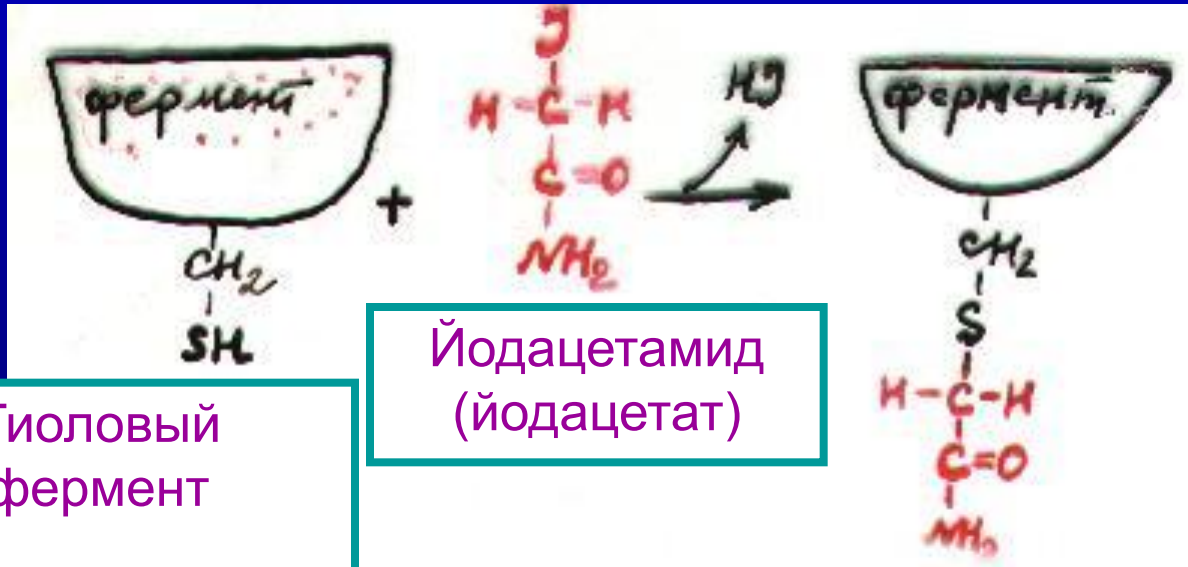
Ингибирование сериновых гидролаз (АХЭ) диизопропилфторфосфатом (ДФФ)



Сериновые протеиназы:

Химотрипсин, трипсин, эластаза, тромбин,
субтилизин

Необратимое ингибирование



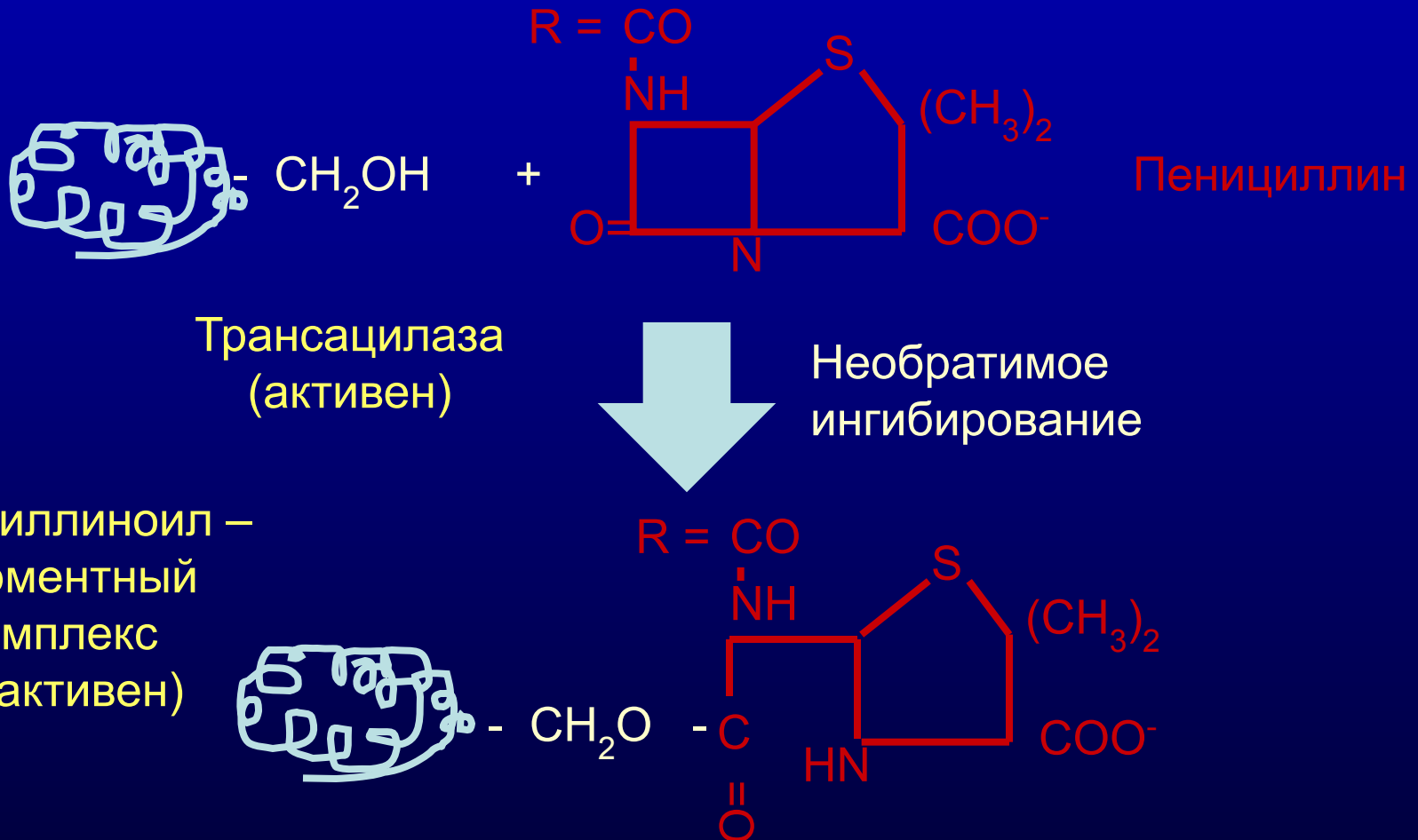
Тиоловый
фермент

Йодацетамид
(йодацетат)

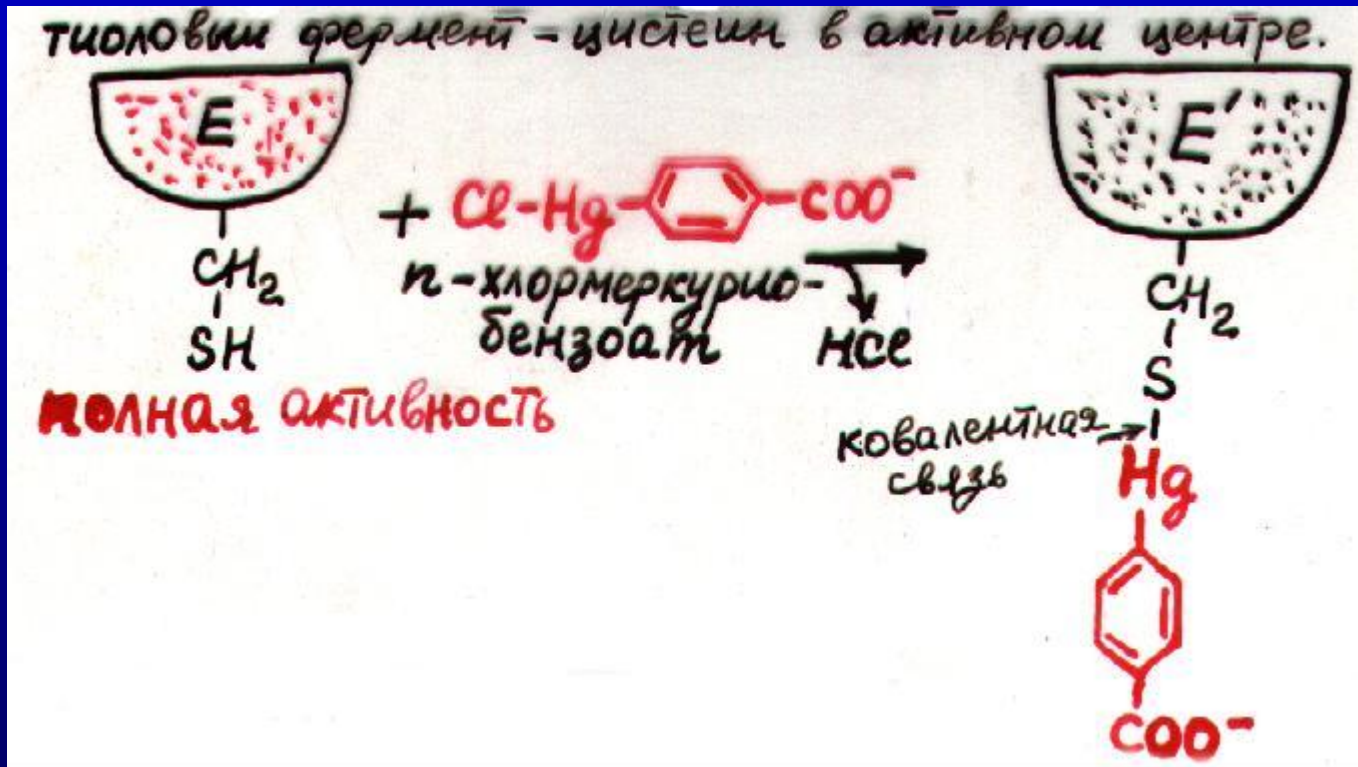
Химически
модифицированный
фермент (неакт.)

Необратимое ингибирование

Трансацилаза – один из ферментов, участвующих в биосинтезе клеточной стенки бактерий.



Необратимое ингибирование цистеина



- ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ Hg^{++} Pb^{++} , соединений мышьяка объясняется образованием ковалентной связи фермента с ингибитором -> необратимое изменение конформации

Химически
модифицированный
фермент (неакт.)

Неконкурентное ингибирование

1. SH –групп ионами тяжелых металлов (Cu^{++} , Hg^{++} , Ag^{++} , As^{++} , Pb^{++})

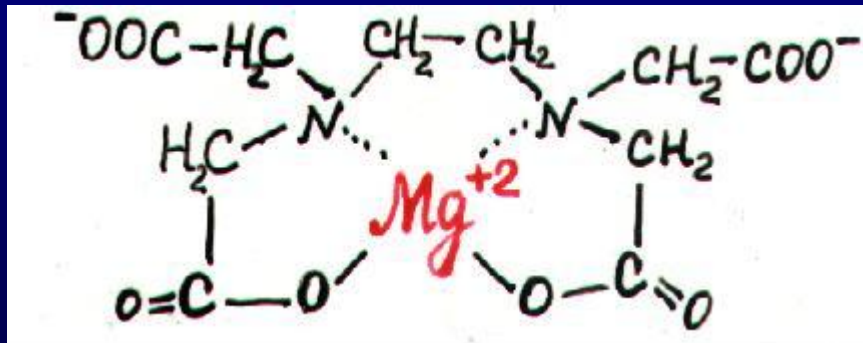


Активный

Неактивный

2. Агентами, связывающими Me^{++} , которые необходимы для активации фермента.

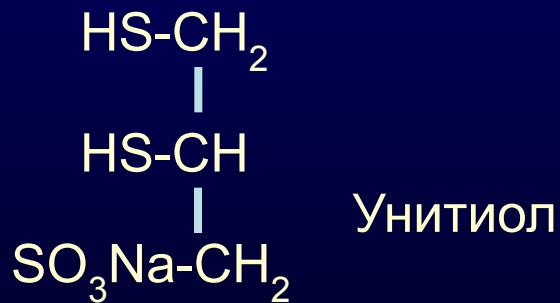
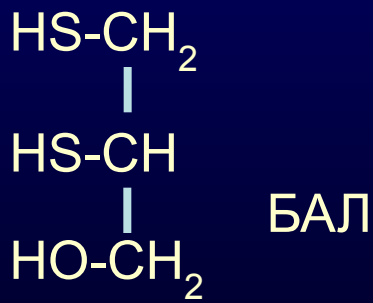
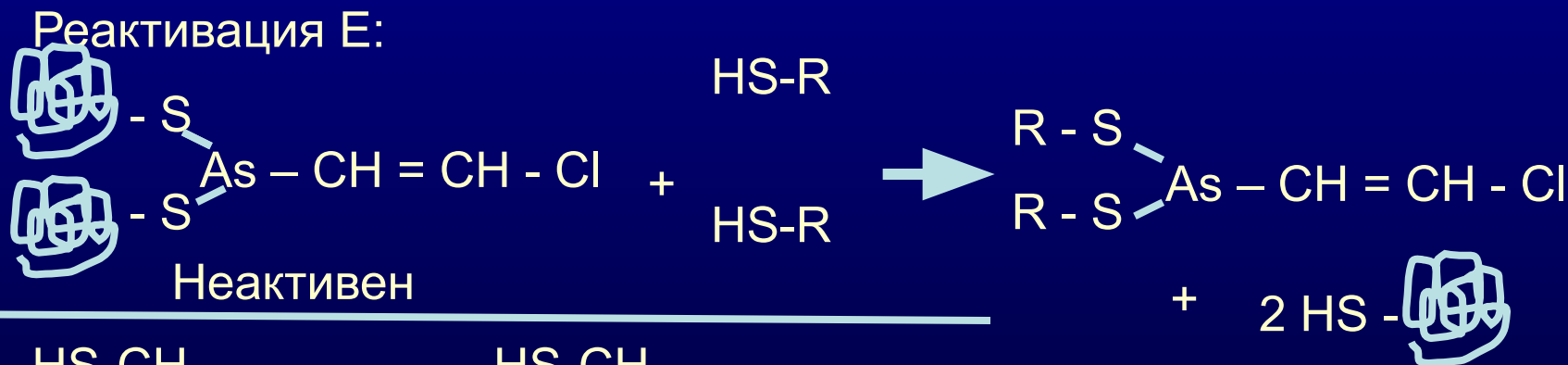
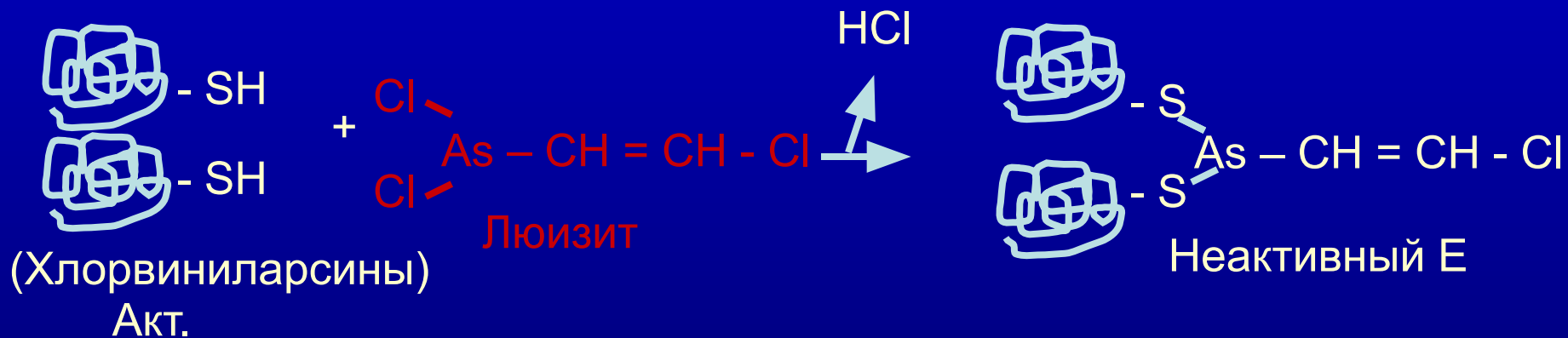
- цианиды образуют комплексы с Fe^{++} , Fe^{+++}
- ЭДТА с Me^{++} -> ингибирование ферментов



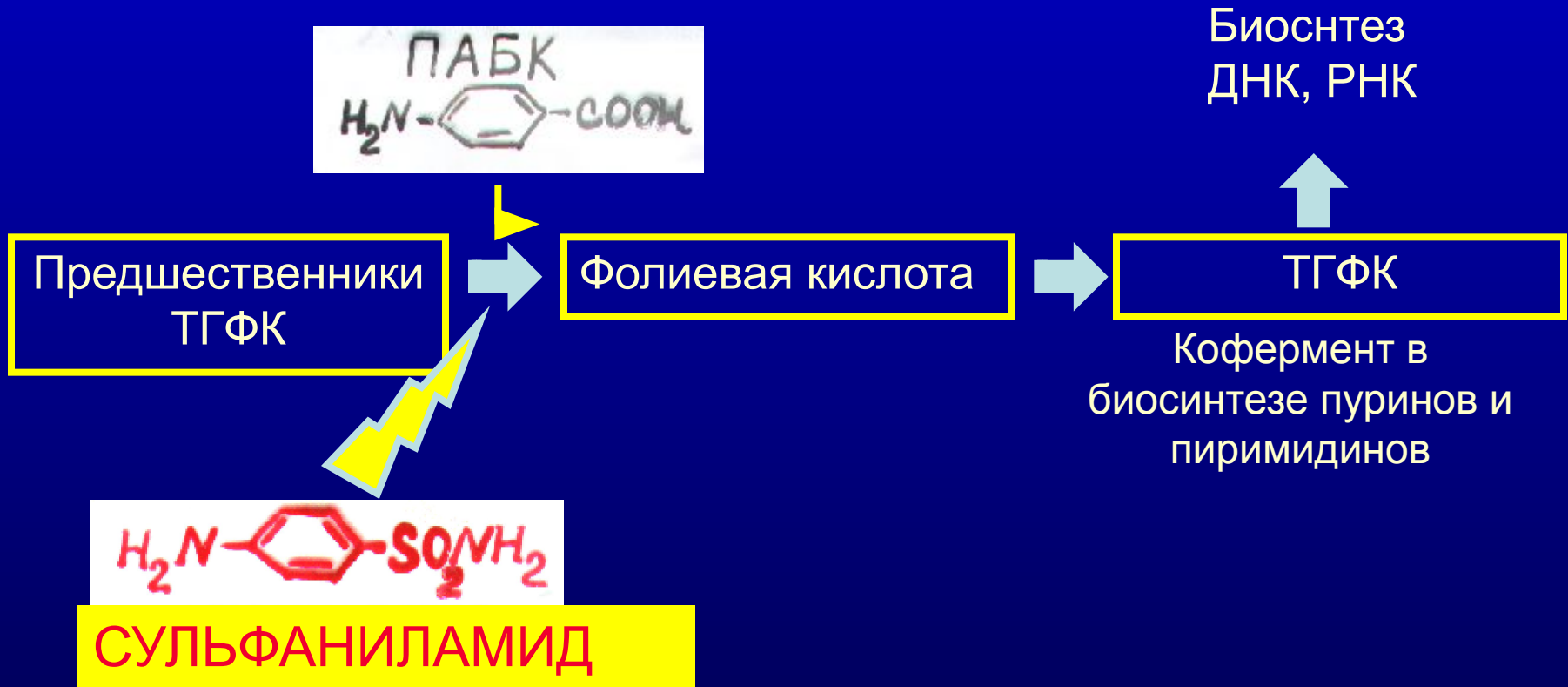
- тетрациклины связывают ионы Me

3. Синильная кислота, CO связывают Fe^{++} в цитохромоксидазе

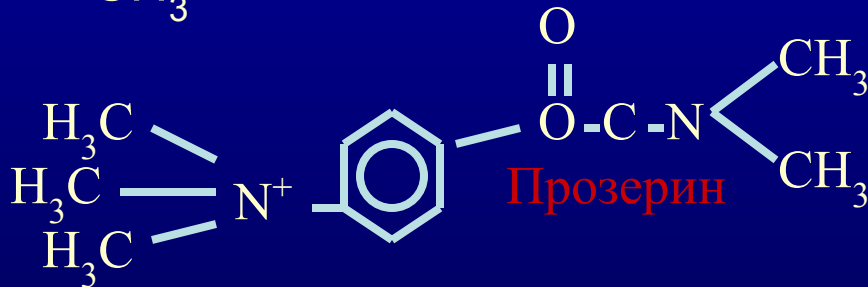
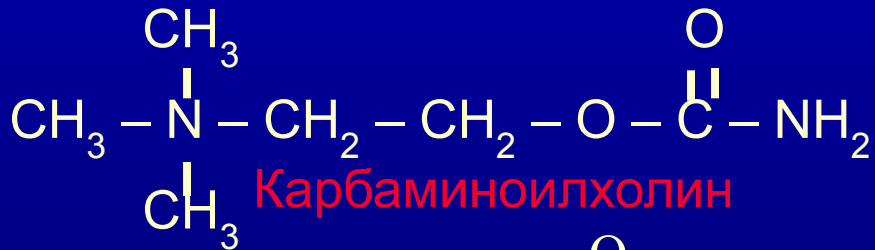
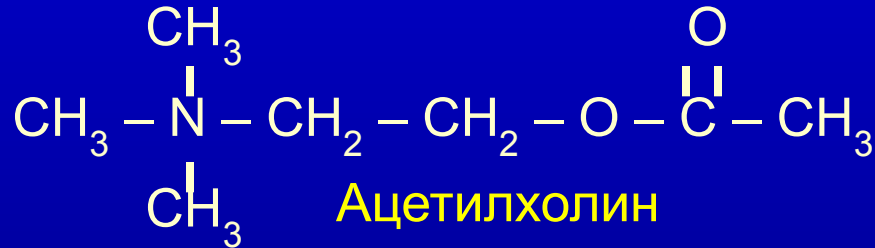
Неконкурентное ингибирование монотиоловых ферментов



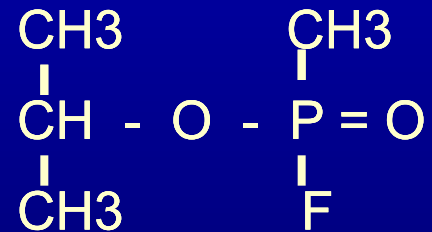
Конкурентное ингибирование



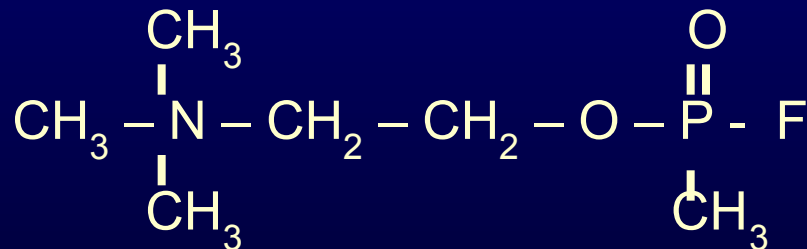
Структуры основных ингибиторов АХэ



Ингибиторы обратимого типа



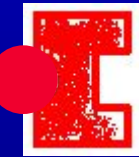
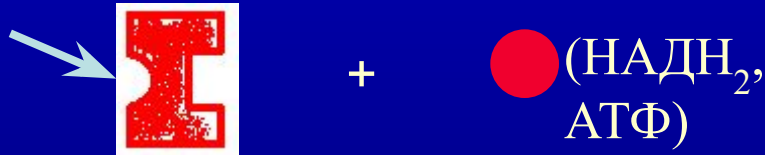
Зарин (образует продукт фосфорилирования АХЭ)



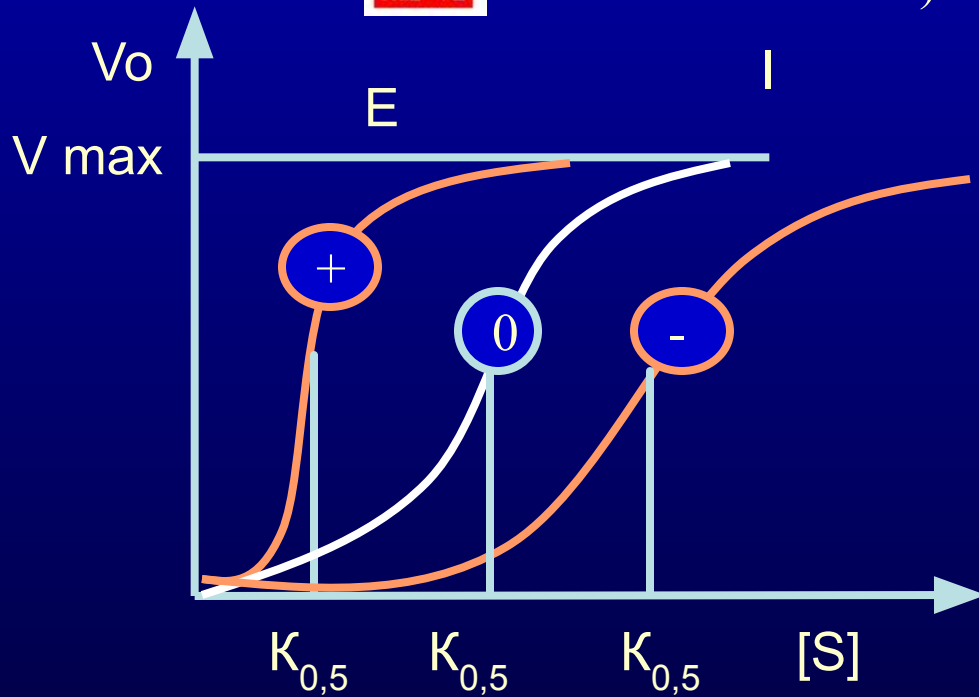
Метилфторфосфорилхолин (исключительно сильное антиАХЭ действие)

Аллостерическое ингибирование

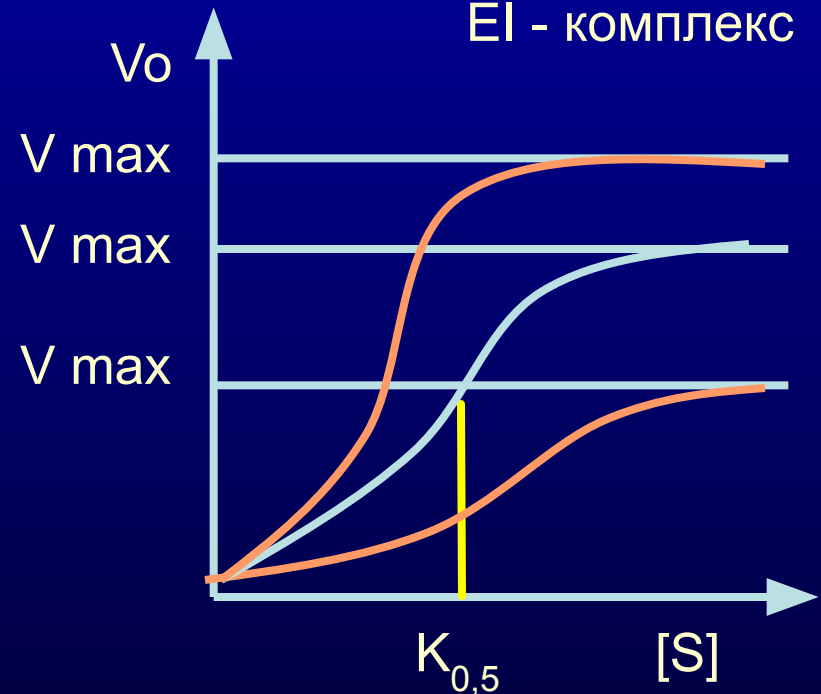
Аллостерический центр



EI - комплекс

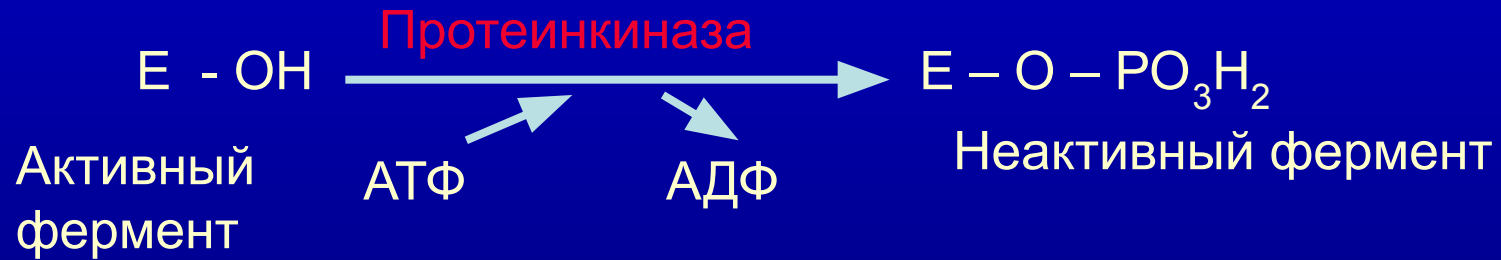


$K_{0,5}$ возрастает под действием отрицательного кодулятора

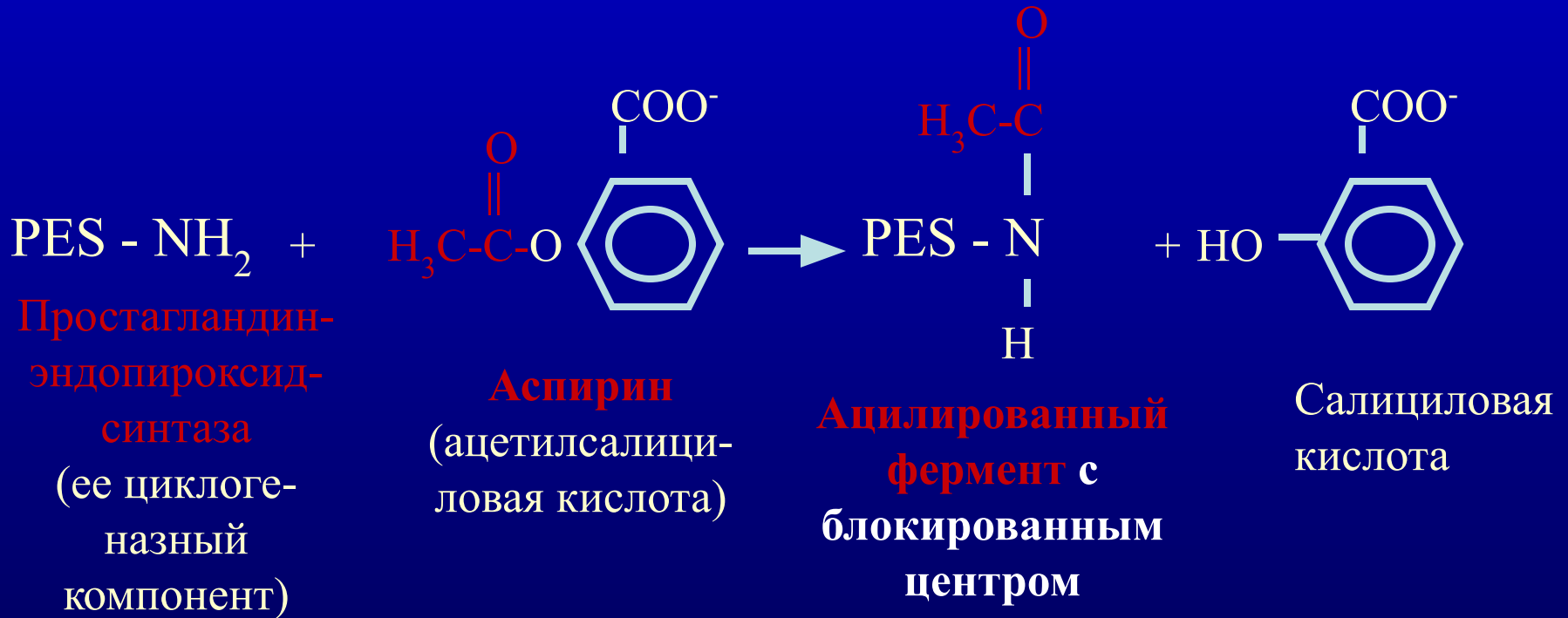


V_{max} изменяется, а $K_{0,5}$ почти const

Фосфатная модификация ферментов



Ингибирование фермента путем ацетатной модификации



Спасибо за внимание