

Ферменты-2

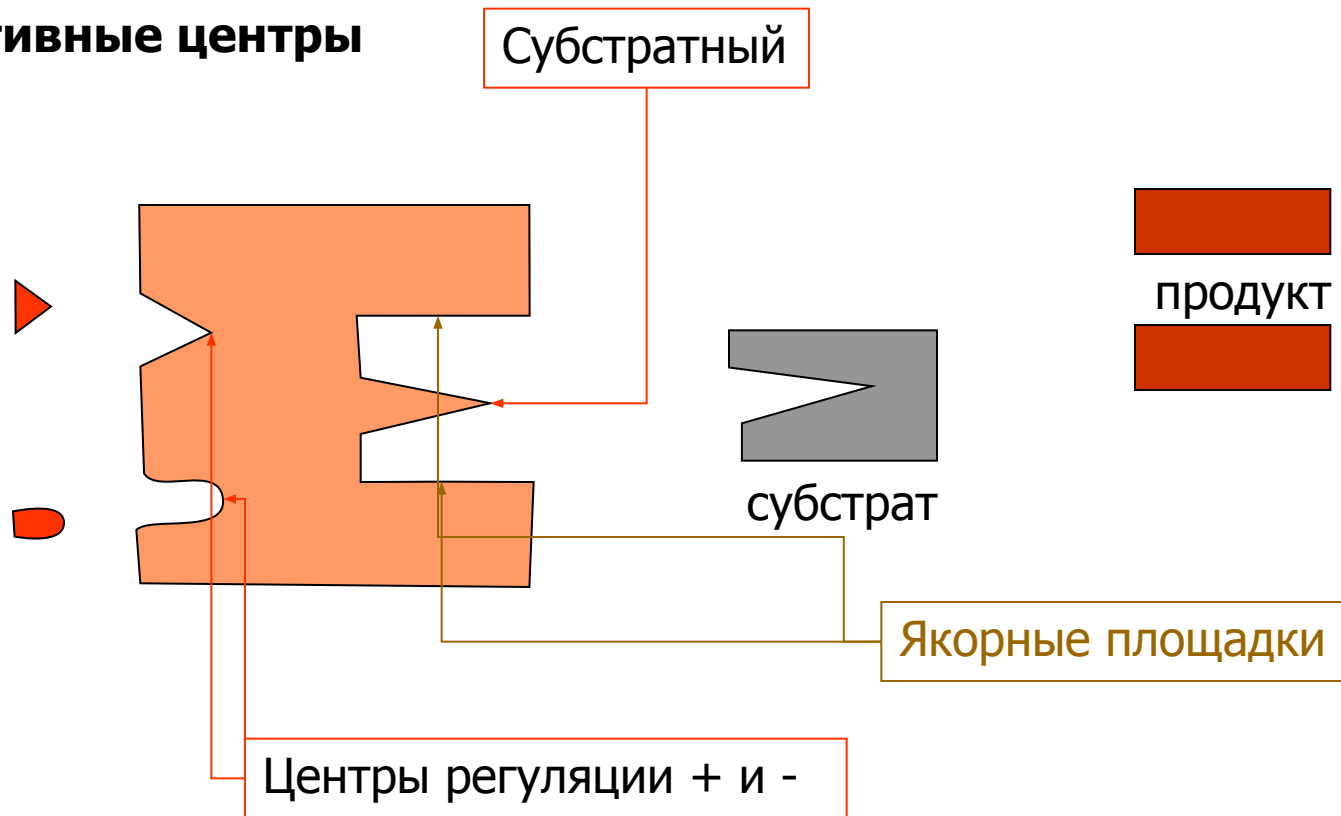
Содержание:

1. Механизм действия ферментов. Этапы ферментативного катализа.
2. Факторы, определяющие активность ферментов $[E]$, $[S]$, $[P]$, 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.

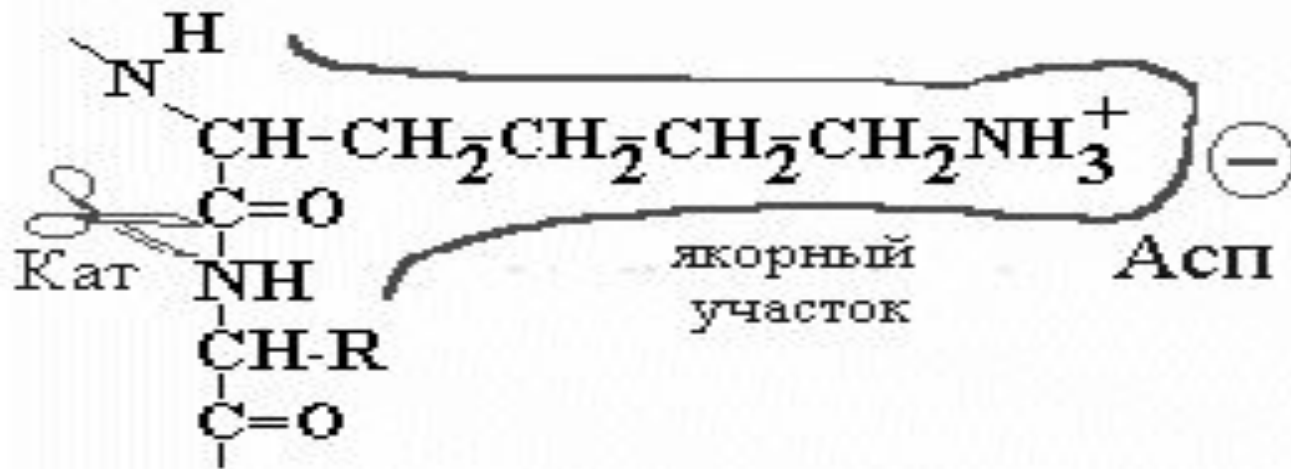
- **Активный (субстратный) центр** - это совокупность функциональных групп, расположенных в разных участках ПП цепи, но близко структурно и функционально ориентированных (в третичной структуре) и имеющих прямое отношение к катализу.
- Этот центр состоит из функциональных групп и радикалов: SH-(цистеина);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

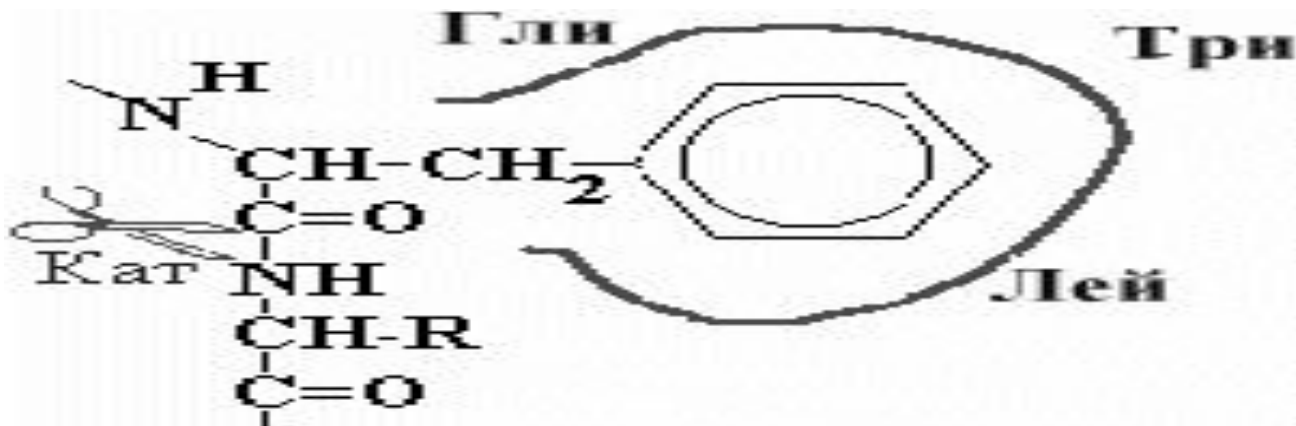
- Химические связи, действующие при этом:
- 1. Силы Ван дер Ваальса
- 2. Электростатическое взаимодействие
- 3. Водородные связи
- 4. Гидрофобные взаимодействия

- 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 COOH 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 аминогруппы, гидроксильные группы, имидазольные группы и сульфгидрильные группы аминокислот. Нуклеофильные формы этих групп одновременно являются основаниями. Связываясь с H^+ - они основания, реагируя с другими электрондефицитными центрами – они нуклеофилы

- **Электрофильные реагенты :**

Наиболее известными электрофилами в биохимических реакциях являются H^+ , ионы металлов, 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

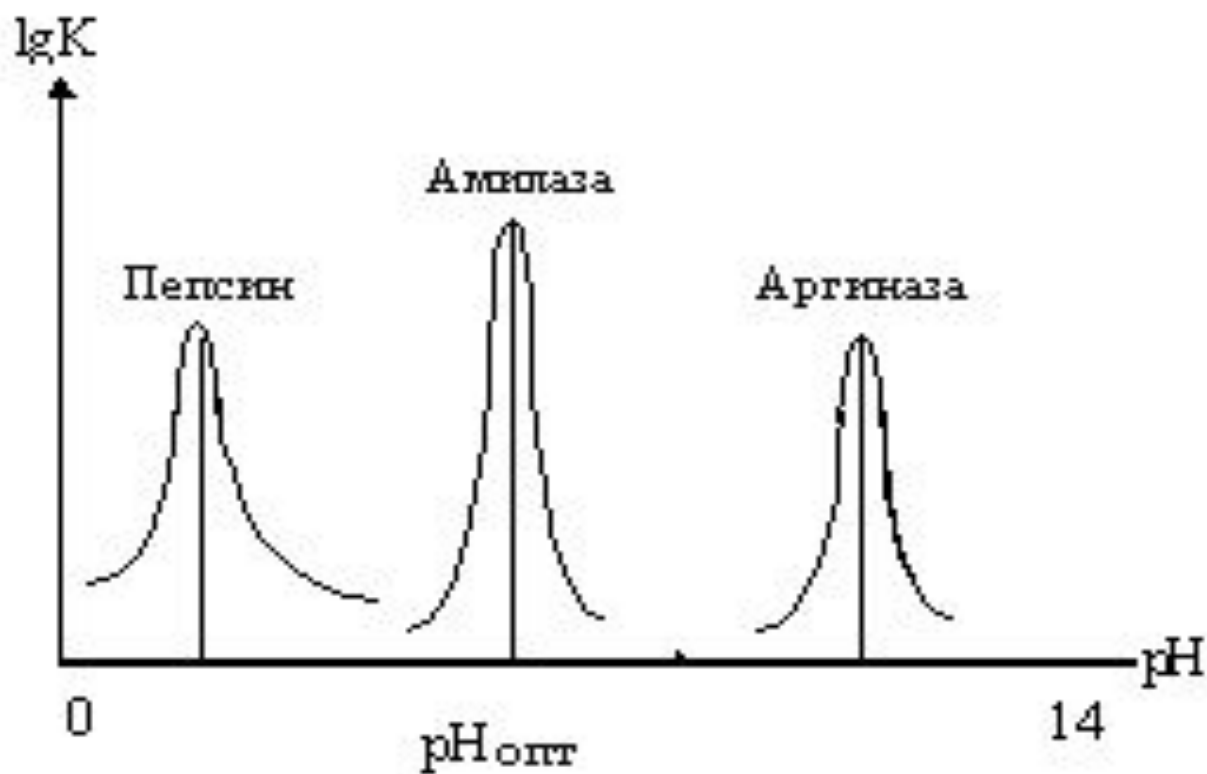
- **2. Реакции кислотно- основного взаимодействия**
- **3. Реакции замещения**
- **4. Реакции отщепления**
- **5. Реакции перегруппировки**
- **6. реакции, сопровождающиеся образованием двойной связи**

- 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 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

8-8.77

Уреаза

7.0

Инвертаза

4.5

Мальтаза

6.1-6.8

Амилаза (подж.железа)

6.7-7.0

Амилаза (солод)

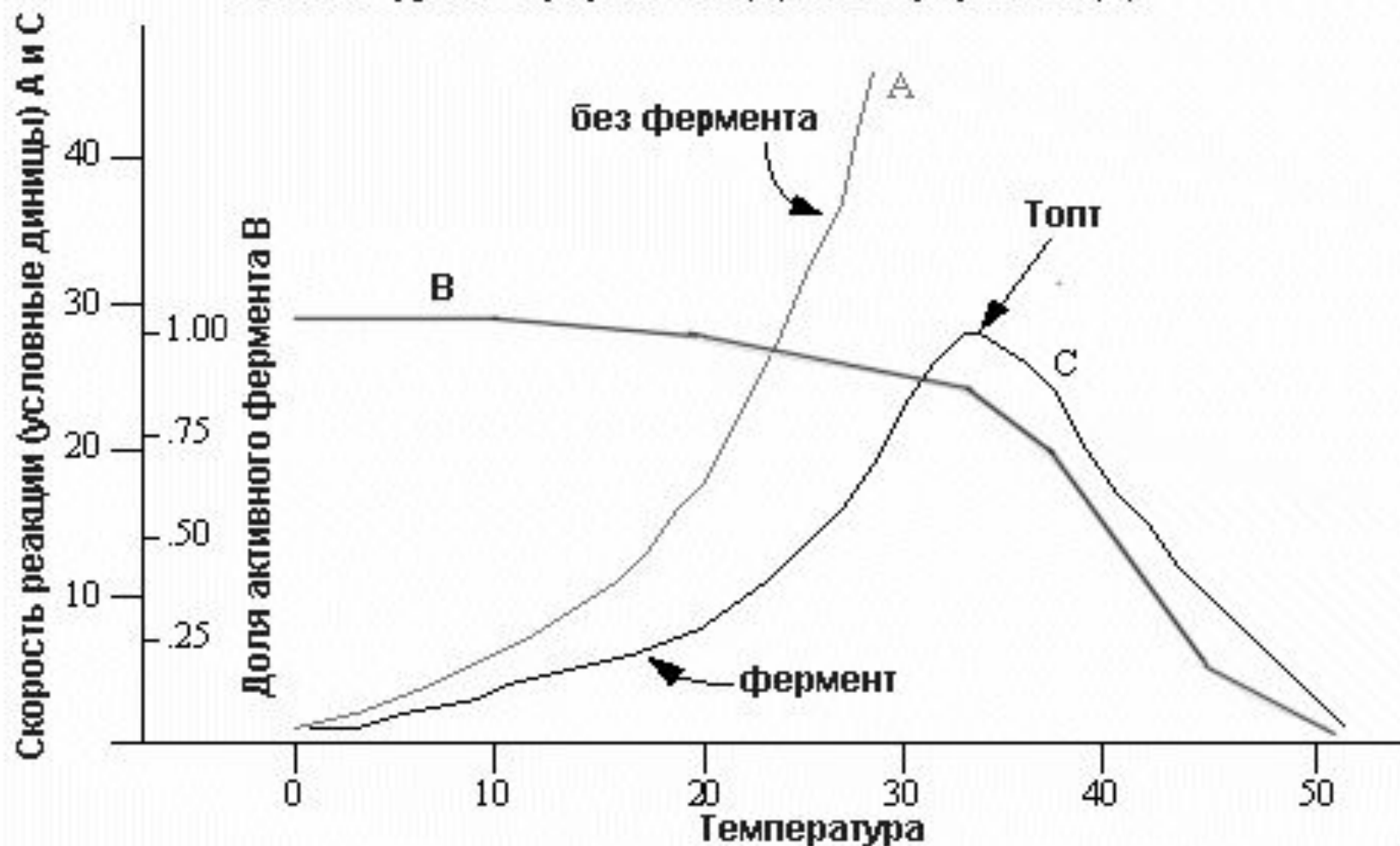
4.6-5.2

Каталаза

7.0

Влияние температуры

Влияние температуры на скорость реакций 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 и продукта, P и S
- **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 → Б → В → 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 (эффе́кторы), 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.

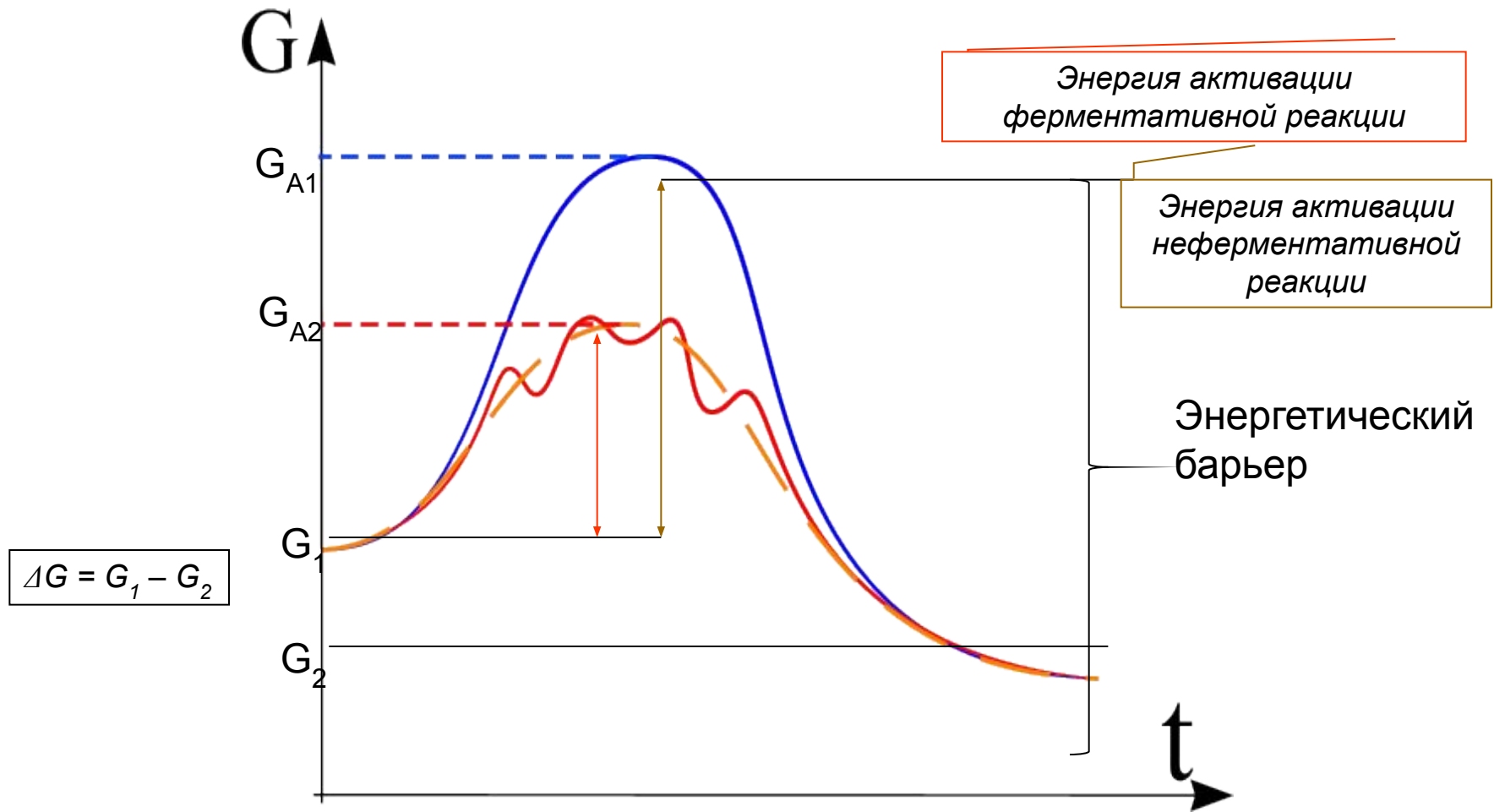
Основы термодинамики катализа

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

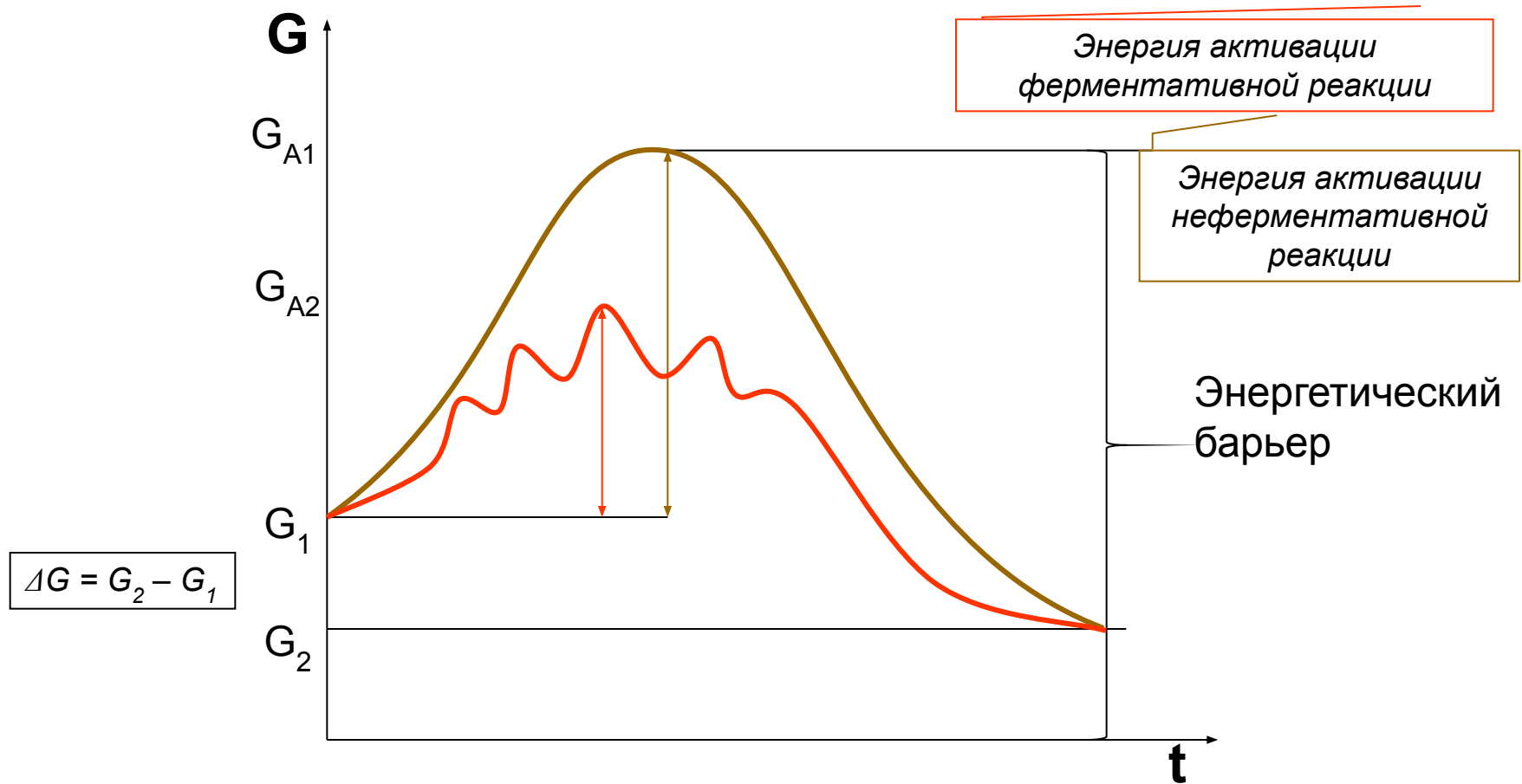
Энергия активации

- **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.

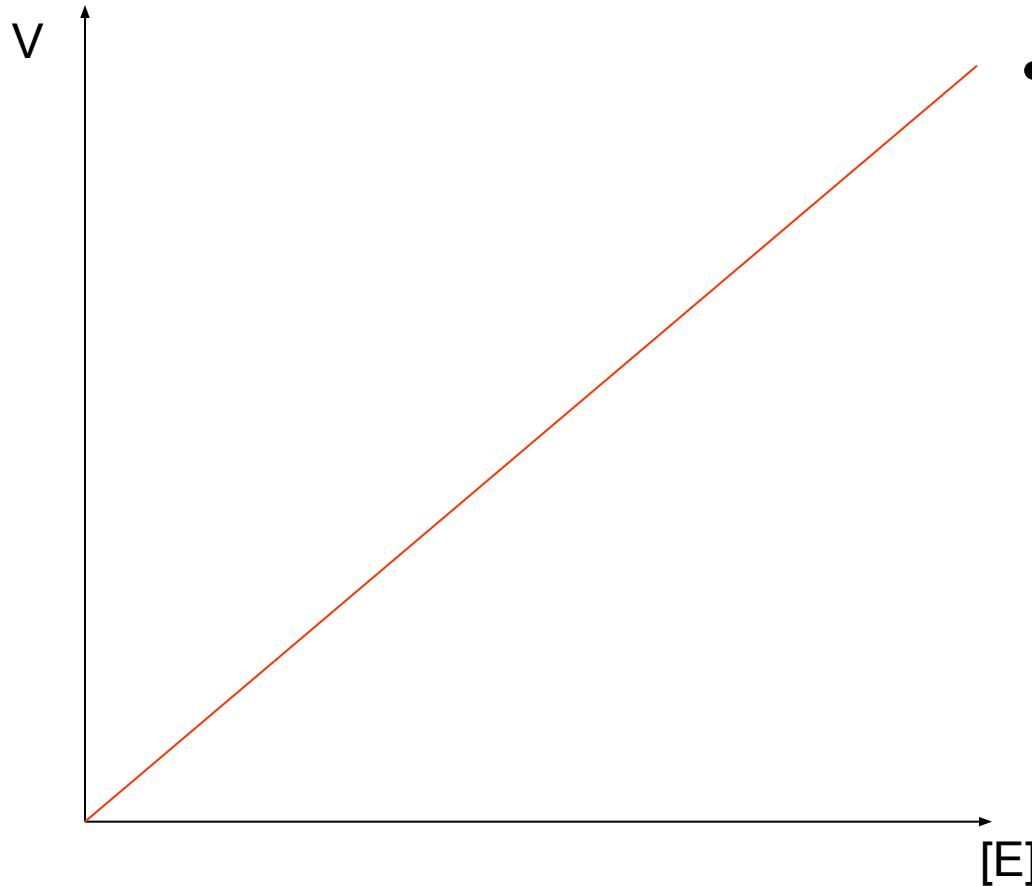
Термодинамика ферментативных реакций



Термодинамика ферментативных реакций

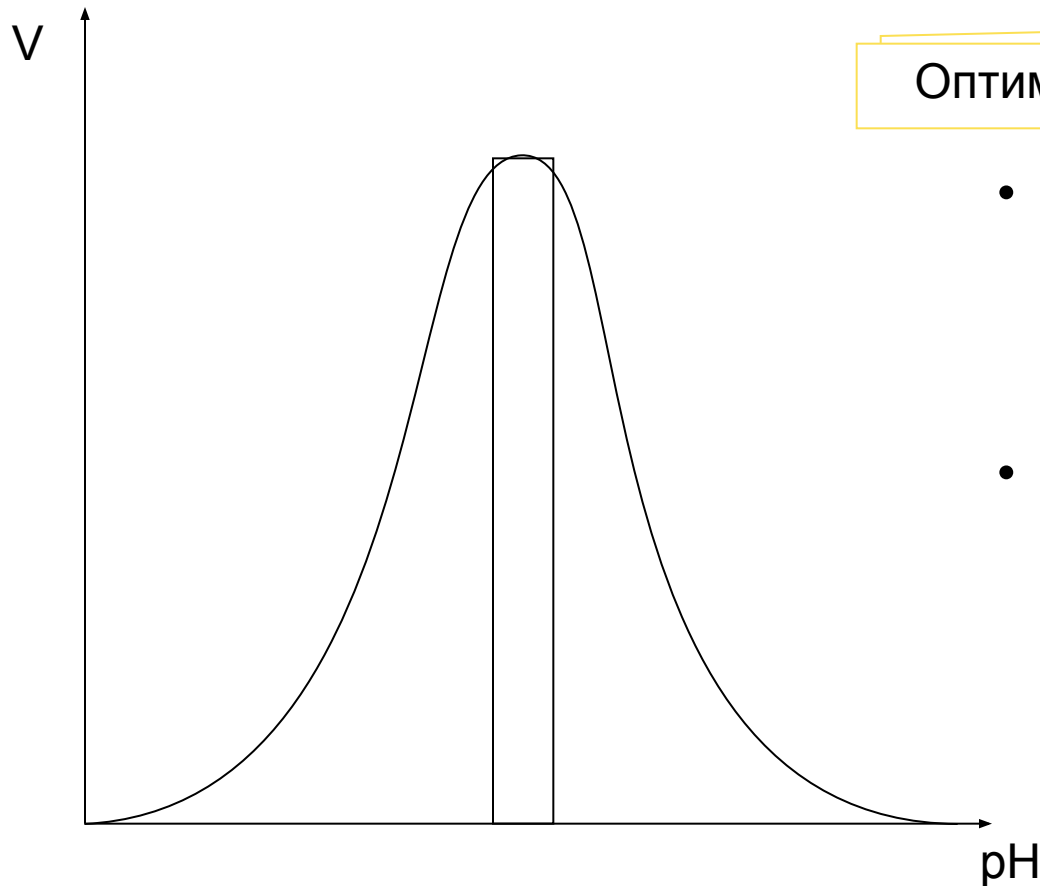


Кинетика ферментативных реакций. Концентрация фермента.



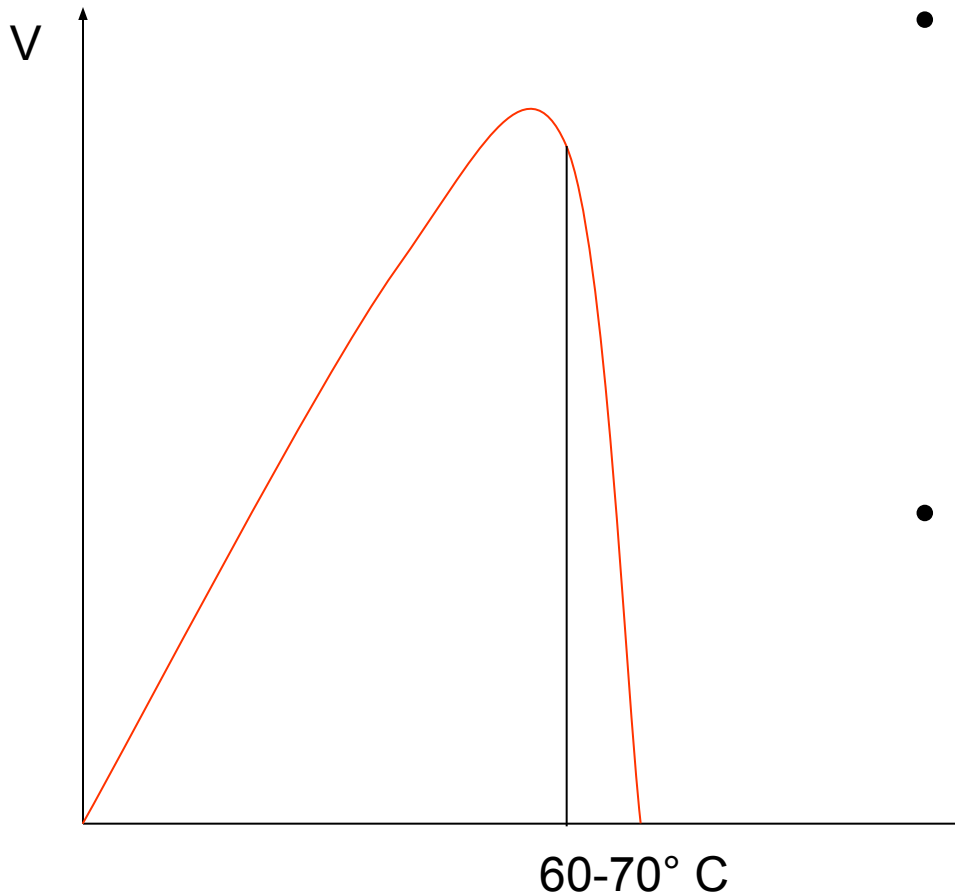
- Чем выше концентрация E , тем выше скорость реакции.

Кинетика ферментативных реакций. pH



- Для каждого фермента существует оптимальная область pH (6,9 – 7,0 для большинства ферментов).
- Сдвиг pH приводит к изменению
 - Поверхностного заряда фермента
 - Степень ионизации активного центра и субстрата.

Кинетика ферментативных реакций. Температура

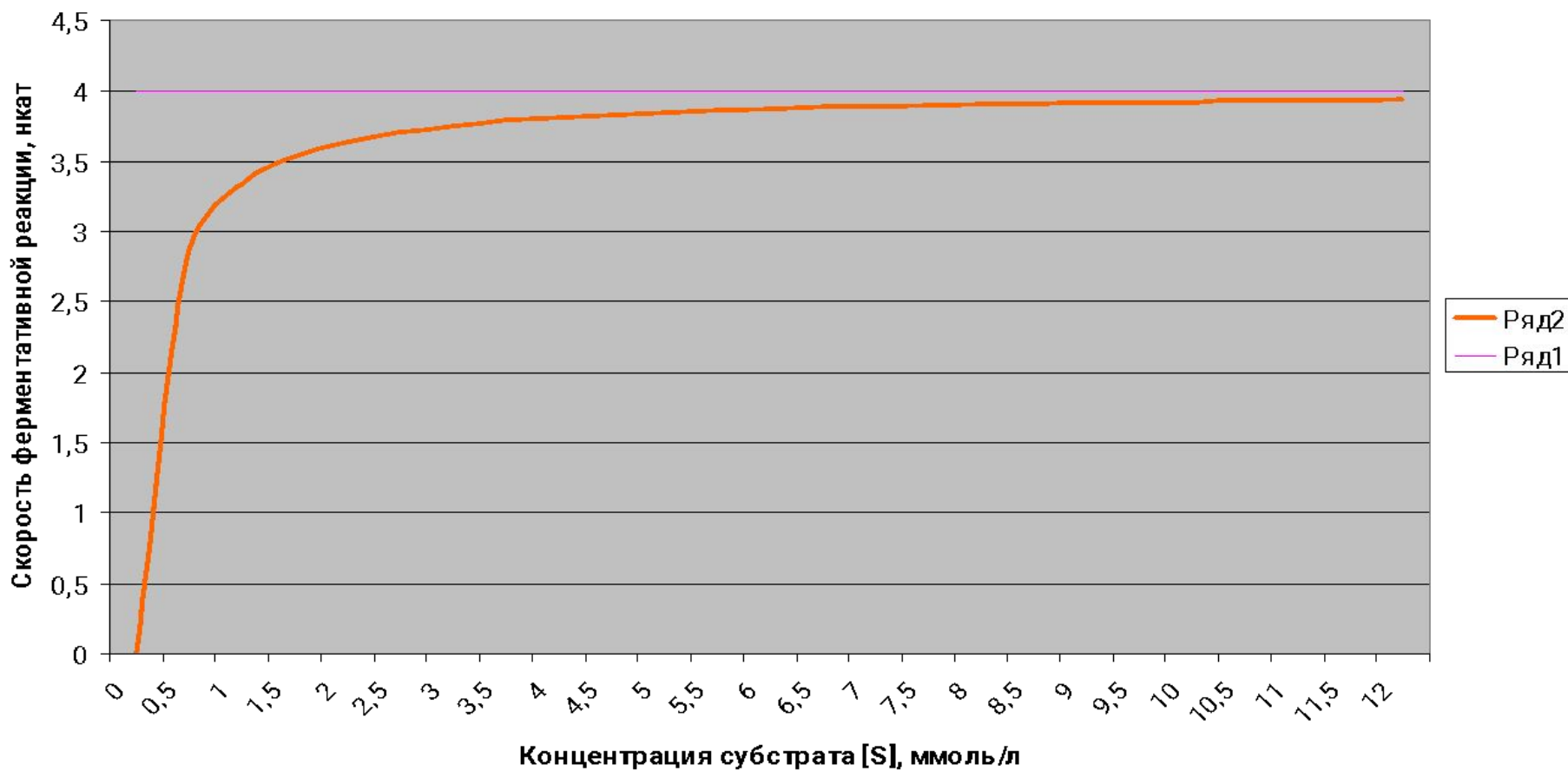


- С увеличением температуры на 10°C скорость реакции возрастает в 2 раза (правило **Вант-Гоффа**).
- После $60-70^{\circ}\text{C}$ происходит денатурация фермента с потерей его каталитической активности.

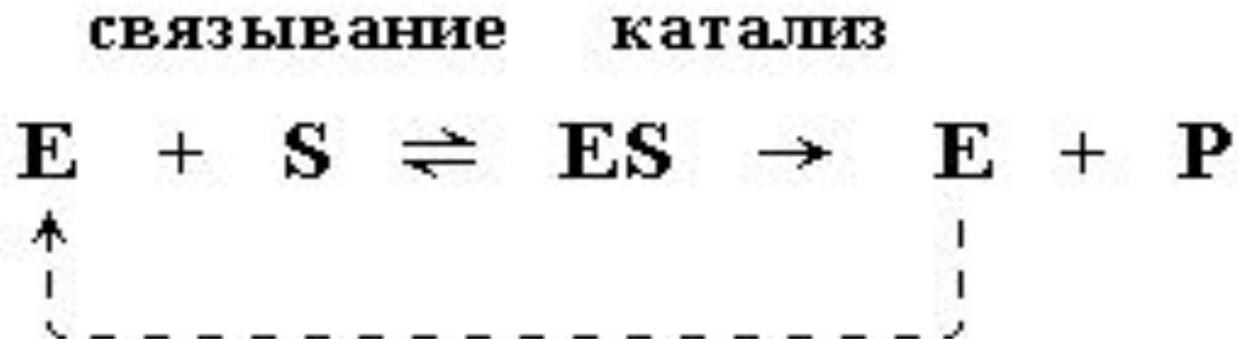
- **Активность фермента зависит от концентрации субстратов.**
- Исследование зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации реагирующих веществ стало одним из главных путей изучения механизма действия ферментов. В 1905 году французский исследователь Генри впервые высказал ряд предположений,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

Кинетика ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций



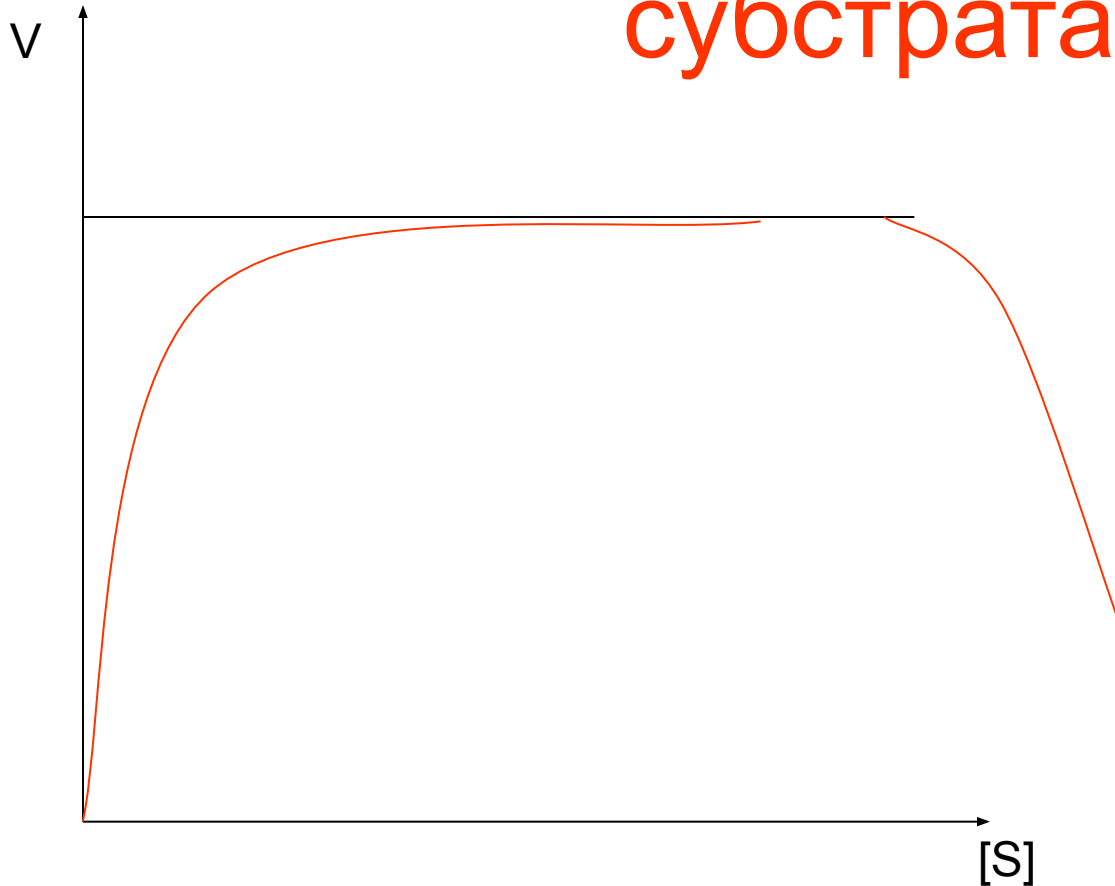
- Если концентрация субстрата $[S]$ очень низкая, ограничивающим скорость реакции становится этап образования комплекса ES (связывание) и реакция проявляет свойства реакции первого порядка



- 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.
- $[E]_{\text{общ}} = [E] + [ES]$ Общее 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
-

$$[E_t] = [ES] + [E]$$

$[E_t]$ общее количество фермента

$[ES]$ связанный фермент

$[E]$ свободный фермент

- тогда, количество свободного фермента: $[Et] - [ES]$
- так как $[S] \gg [Et]$, $[S]_{связ} \ll [S]$ свобод
- [этап 1] скорость образования $ES = k_1$
 $([Et] - [ES]) [S]$ (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 $[ES] = \text{const}$, и следовательно (1) = (2)**

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

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

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

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

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

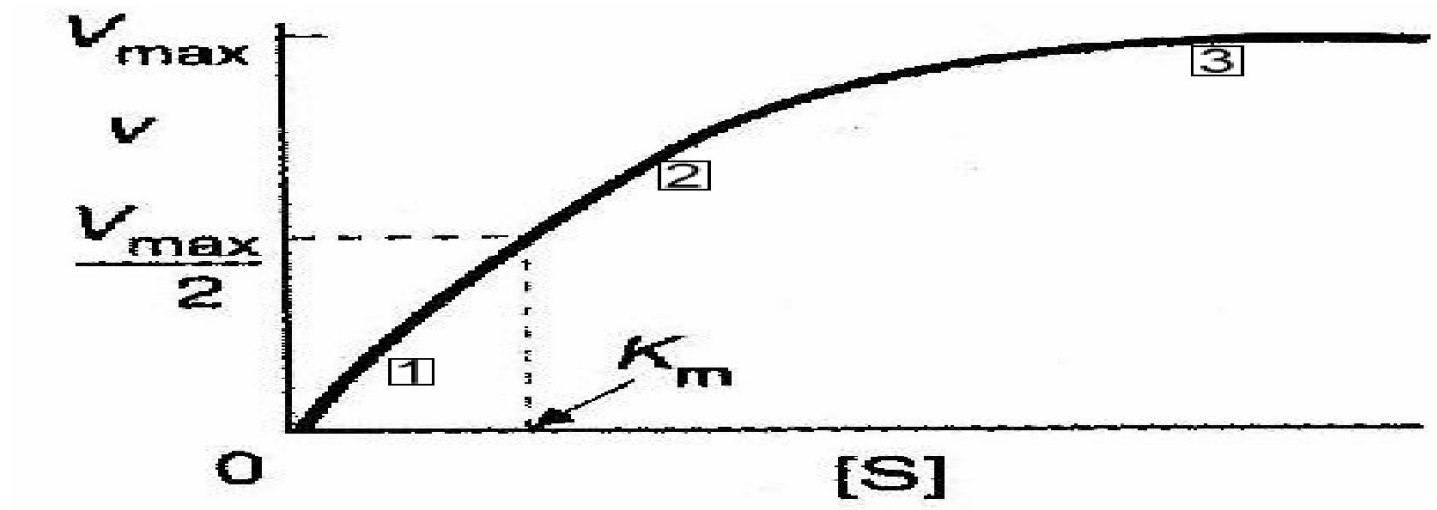
где $K_m = (k_2 + k_3) / k_1 = \text{константа Михаэлиса}]$

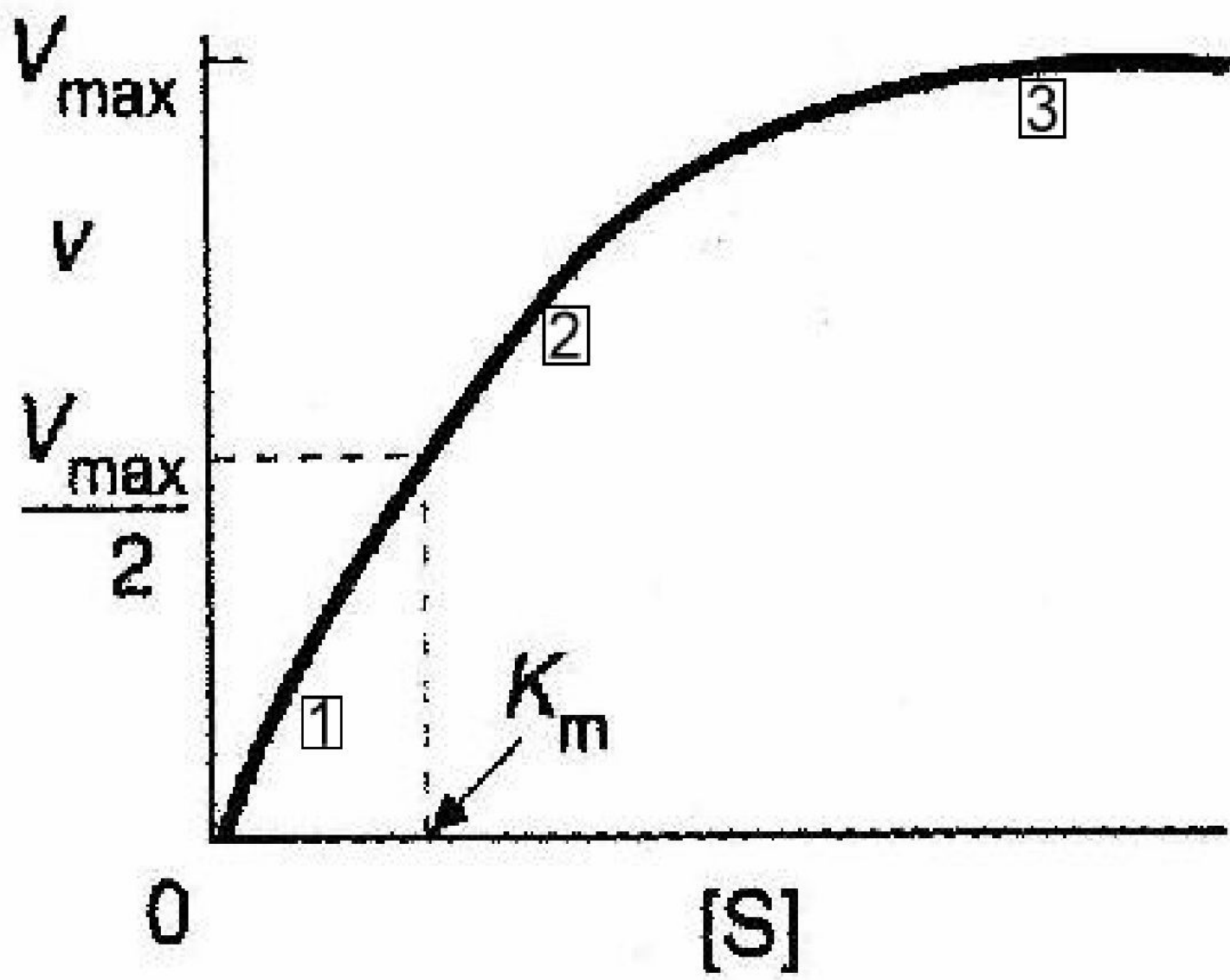
при условии $[ES] = [Et]$ скорость реакции становится максимальной
 $V_{\max} = k_3 [ES] = k_3 [Et]$

- 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

- 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 отлаживаете исследование

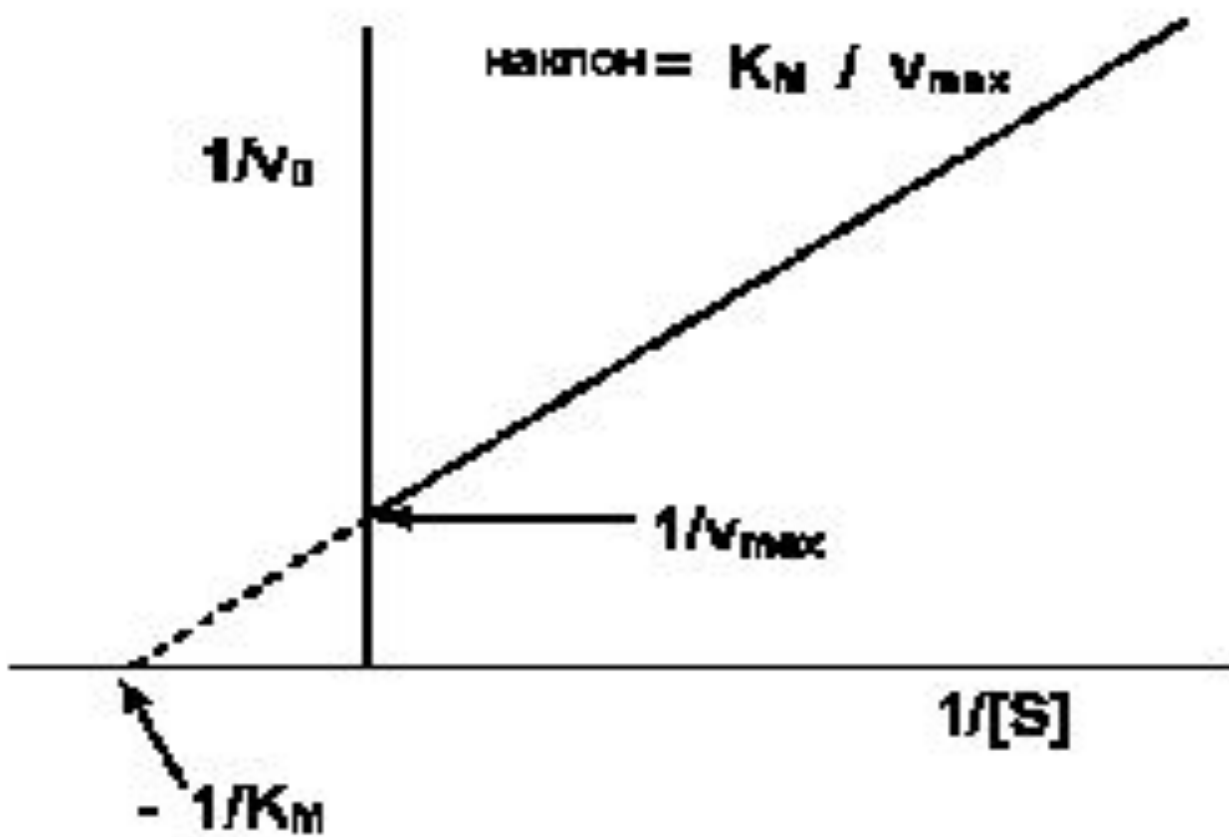
- фермента или в клинической лаборатории или исследовательской лаборатории, следует насыщать фермент субстратом. Знание K_m позволит Вам оценивать концентрацию субстрата, необходимую для гарантии насыщения. Эта концентрация должна быть равна по крайней мере двум K_m .

- 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 Михаэлиса 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.
-

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



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.

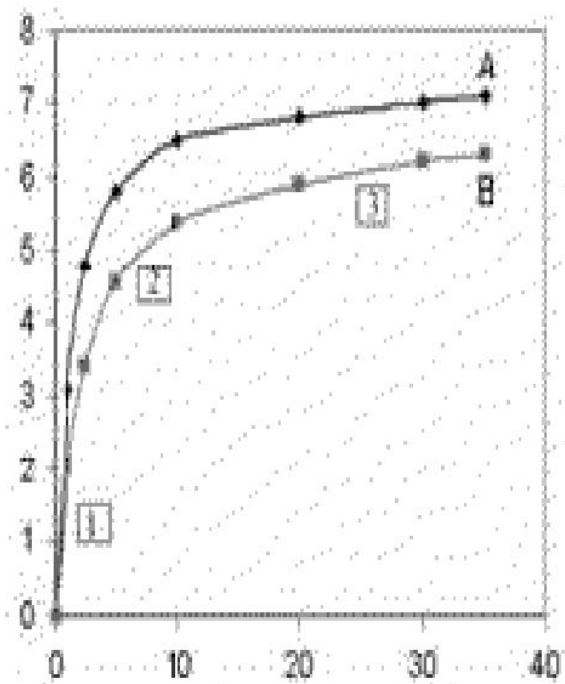
- Альдегиддегидрогеназа обычно существует в двух формах, с высоким сродством (низкие значения K_m) к альдегиду и с низким сродством (высокие значения K_m) к альдегиду. У людей, чувствительных к этиловому спирту отмечен недостаток формы с высоким сродством и уксусный альдегид, накапливаясь, вызывает у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

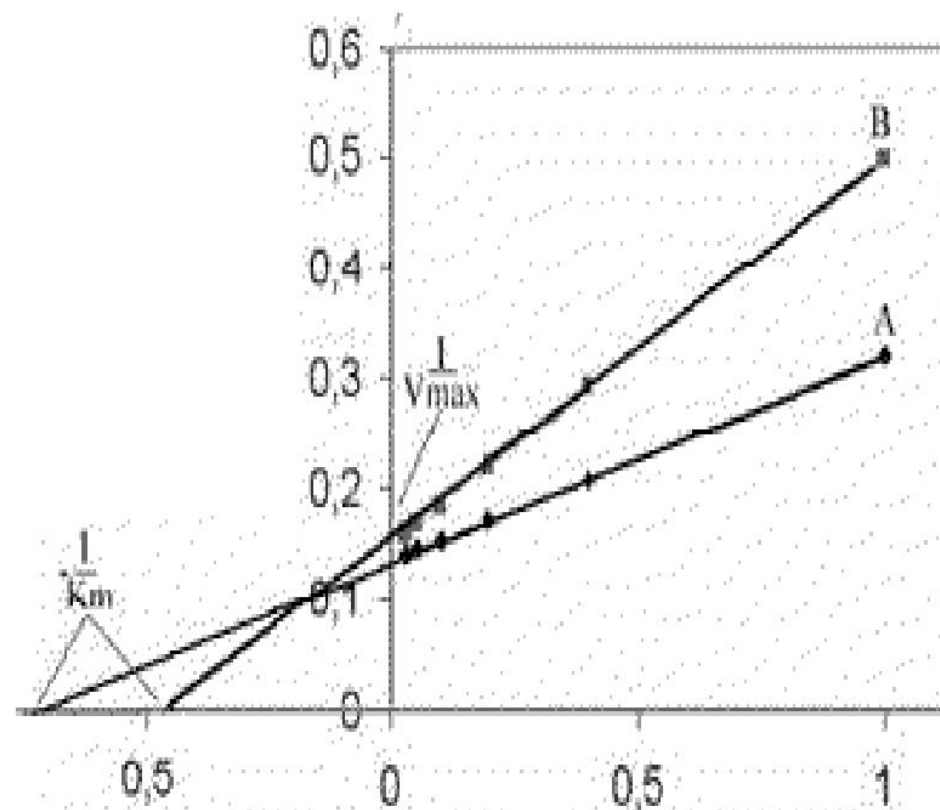
- Если сфингомиэлин не распадается должным образом, нарушается нейронная передача. Физиологические последствия болезни Наймана-Пика - олигофрения и ранняя смерть. Выяснение качественных характеристик фермента с последующими рекомендациями по продолжению беременности- это только один из примеров широкого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

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

