

ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России
Кафедра биохимии

Дисциплина: Биохимия

ЛЕКЦИЯ № 2

Ферменты 2.

Лектор: Гаврилов И.В.
Факультет: лечебно-профилактический,
Курс: 2

Екатеринбург, 2018г

План лекции

1. Кинетика ферментативных реакций.
2. Регуляция скорости ферментативных реакций.
3. Клеточная сигнализация

1. Кинетика ферментативных реакций

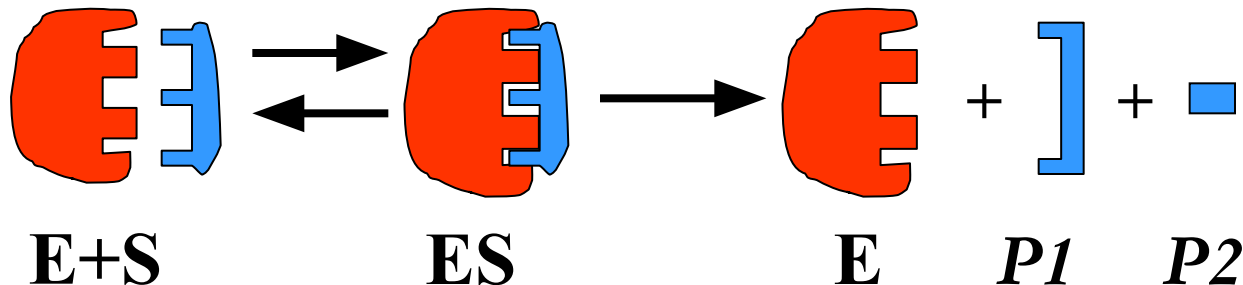
Кинетика ферментативных реакций - направление энзимологии, исследующее влияния реагирующих веществ (субстраты, продукты, ингибиторы, активаторы и т.д.) и условий (рН, t° , давление) на скорость ферментативной реакции.

Теории о механизмах действия ферментов

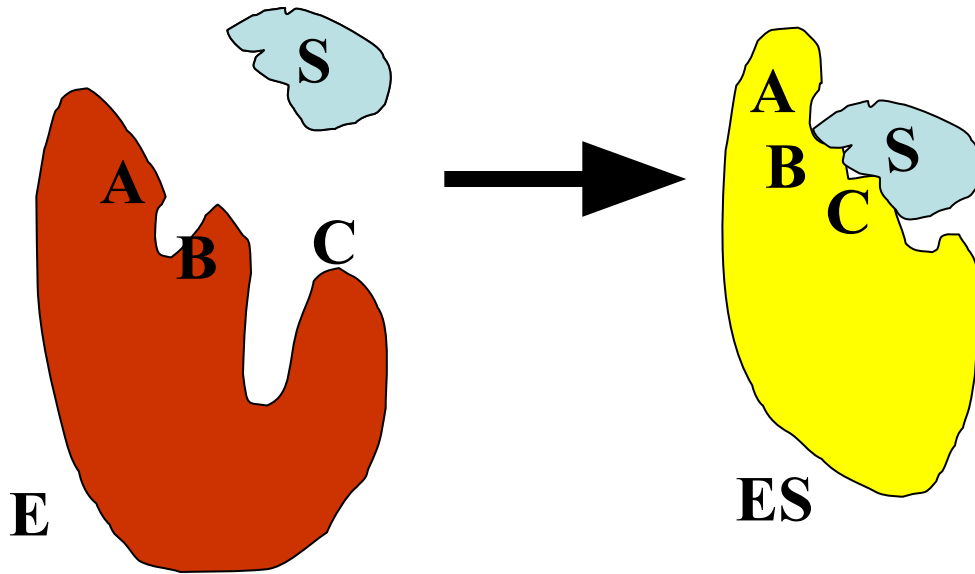
Теории о специфичности действия ферментов

1. Модель «ключ – замок»

Для объяснения высокой специфичности ферментов по отношению к субстратам Эмиль Фишер в 1894г выдвинул гипотезу о строгом соответствии геометрической формы субстрата и активного центра фермента.



2. Теория «индуцированного соответствия»



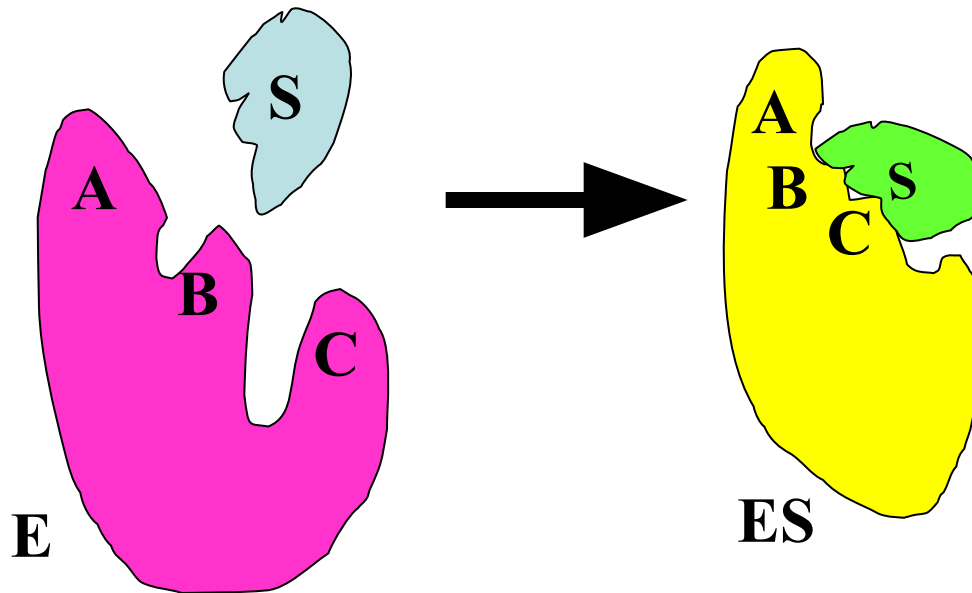
Существует не только геометрическое, но и электростатическое соответствие

Теория индуцированного (вынужденного) соответствия Дениеля Кошланда (1959г): полное соответствие фермента и субстрата наступает лишь в процессе их взаимодействия:

Субстрат индуцирует необходимые конформационные изменения фермента, после чего они соединяются.

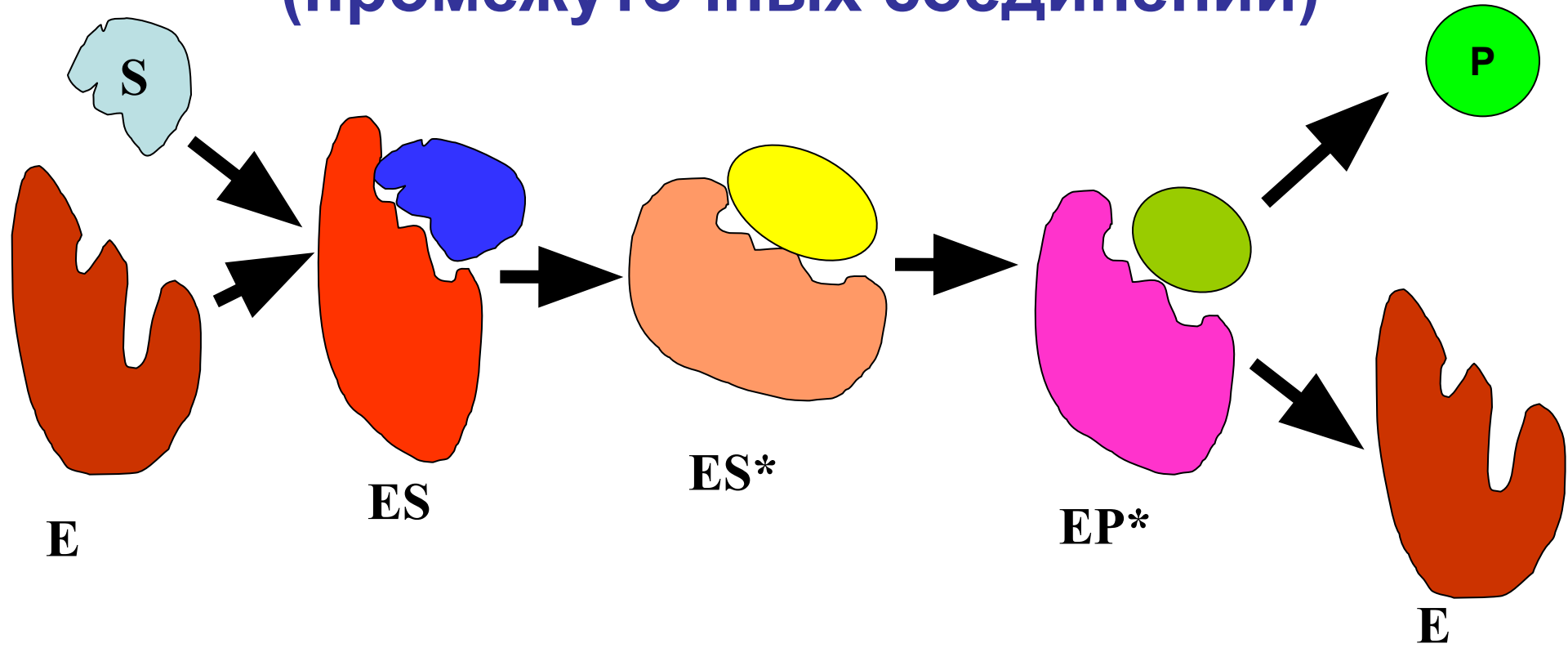
Теория основана на данных кинетического анализа, изучением фермент-субстратных комплексов методами рентгено-структурного анализа, спектрографии и кристаллографии и др.

3. Теория «индуцированного соответствия» (современные представления)



При взаимодействии фермента и субстрата оба подвергаются модификации и подстраиваются друг под друга. Возникающие в субстрате изменения способствуют превращению его в продукт.

Теория переходных состояний (промежуточных соединений)



при взаимодействии фермента **E** с субстратом **S** образует комплекс **ES***, в котором реакционная способность субстрата выше, чем в нативном состоянии. Через ряд промежуточных соединений происходит превращение субстрата в продукт реакции **P**

Механизмы ферментативных реакции

При ферментативном катализе реализуются те же механизмы, которые возможны без участия ферментов:

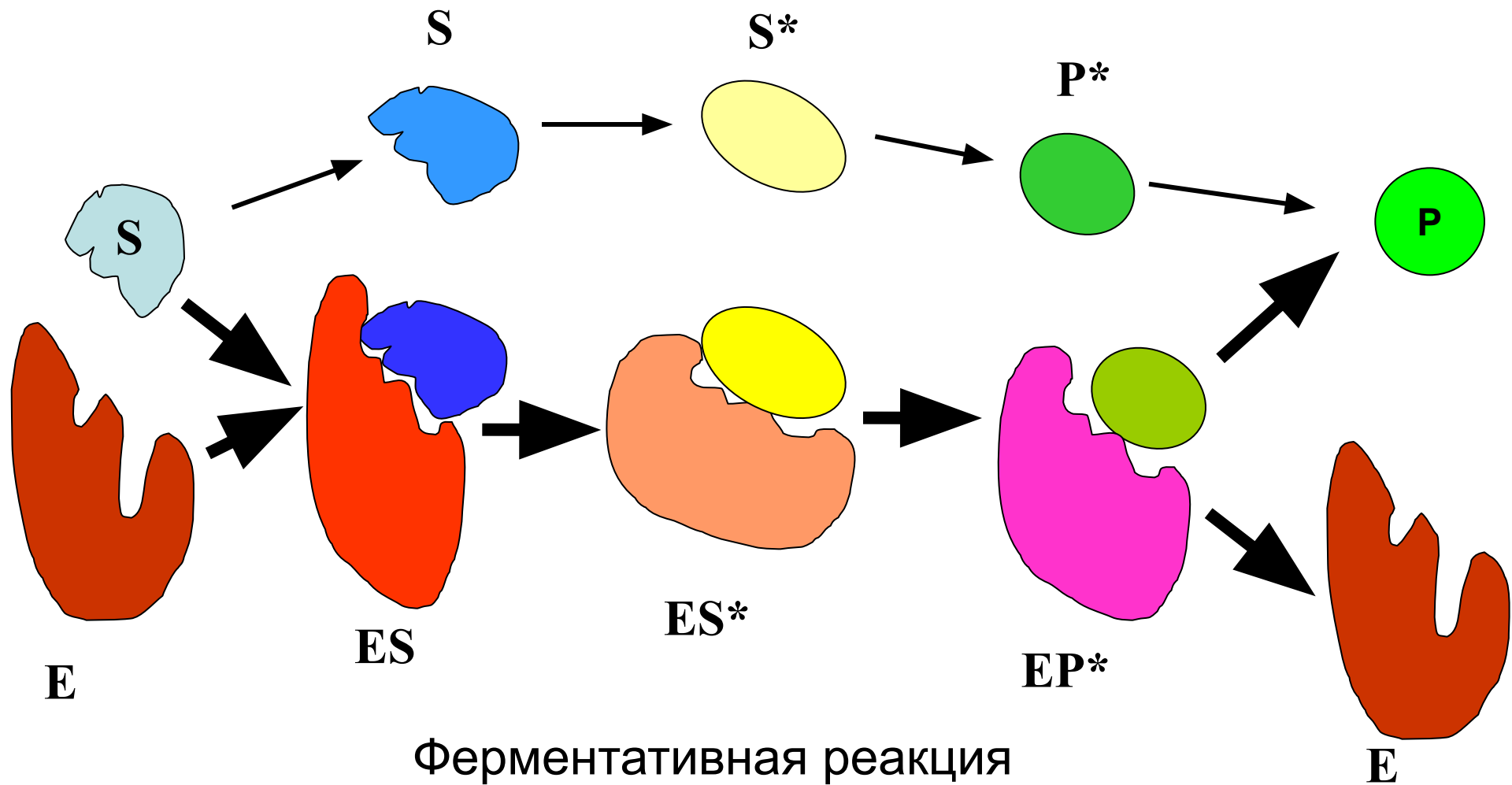
1. **Кислотно-основные реакции** – в активном центре фермента находятся группы $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$, которые способны присоединять и отдавать H.
2. **Реакции присоединения (отщепления, замещения)** электрофильные, нуклеофильные – в активном центре фермента находятся гетероатомы смещающие электронную плотность.
3. **Окислительно-восстановительные реакции** – в активном центре фермента находятся атомы, имеющую разную электроотрицательность
4. **Радикальные реакции.**

Энергетика ферментативных реакций

Ферменты снижают энергию активации

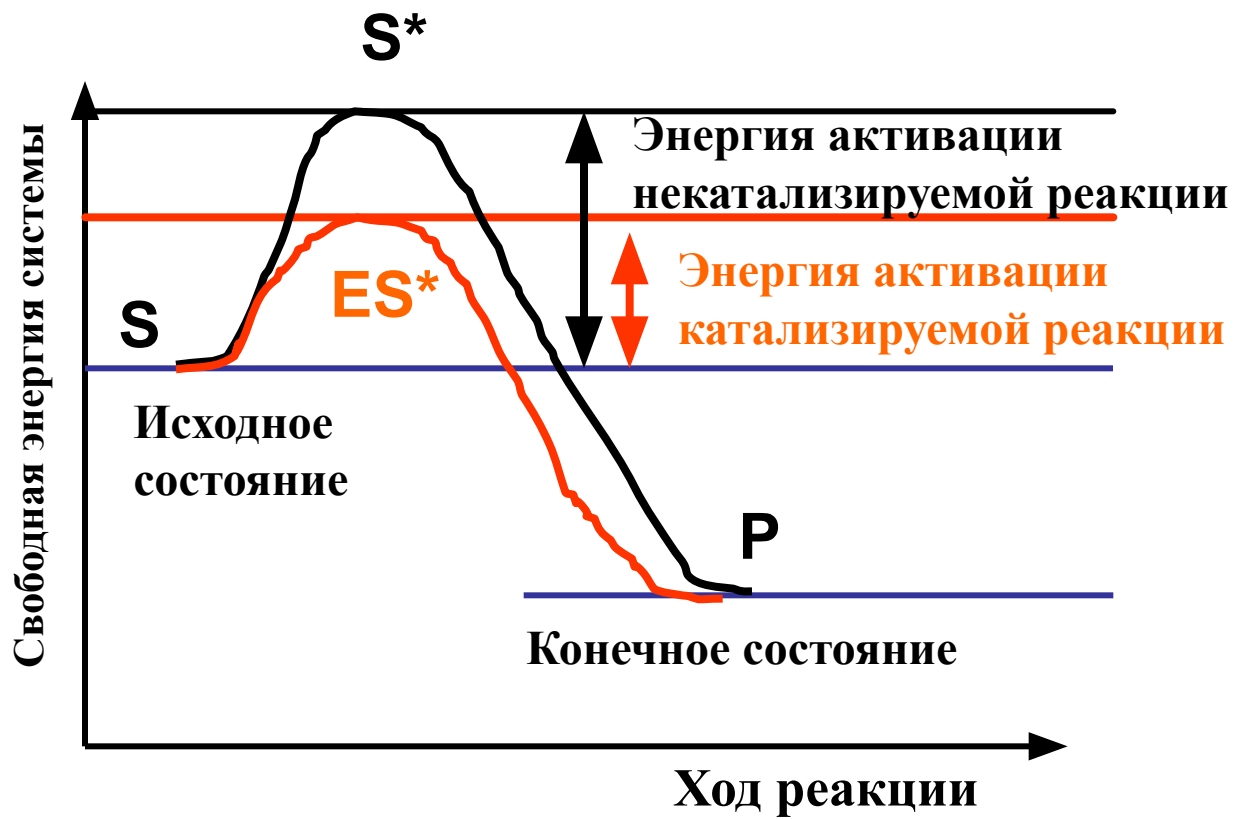
- Скорость химической реакции зависит от концентрации реагирующих веществ
- В комплексе с ферментами субстраты превращаются в более устойчивые промежуточные соединения, за счет чего их концентрация резко повышается, что способствует ускорению реакции

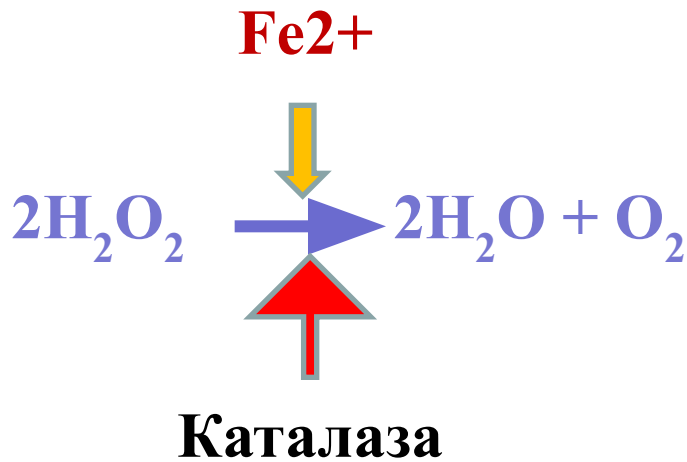
Неферментативная реакция



Ферментативная реакция

- **ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАРЬЕР РЕАКЦИИ** – кол-во энергии, которое необходимо молекуле, чтобы вступить в химическую реакцию.
- **ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ** - кол-во энергии, которое необходимо сообщить молекуле для преодоления энергетического барьера.





Энергия активации:

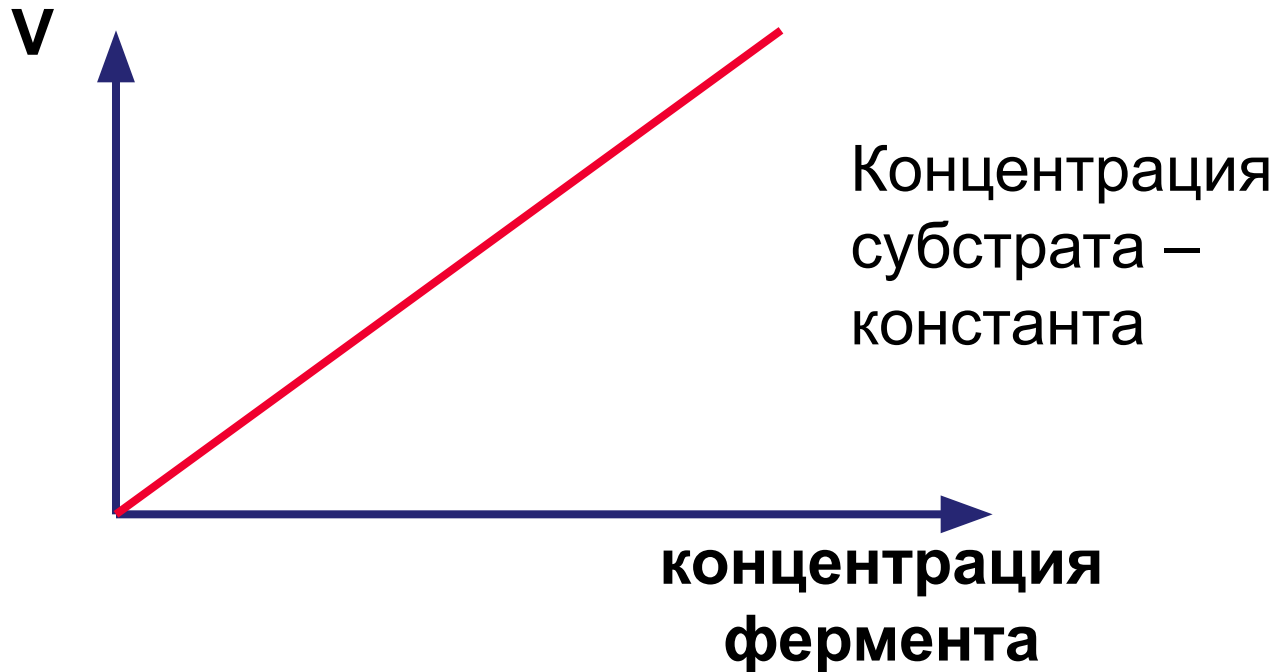
1. В спонтанной реакции – 18 ккал/моль
2. При использовании катализатора Fe^{2+} – 12 ккал/моль
3. В присутствии фермента каталазы – 5 ккал/моль

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости реакции
от концентрации субстрата

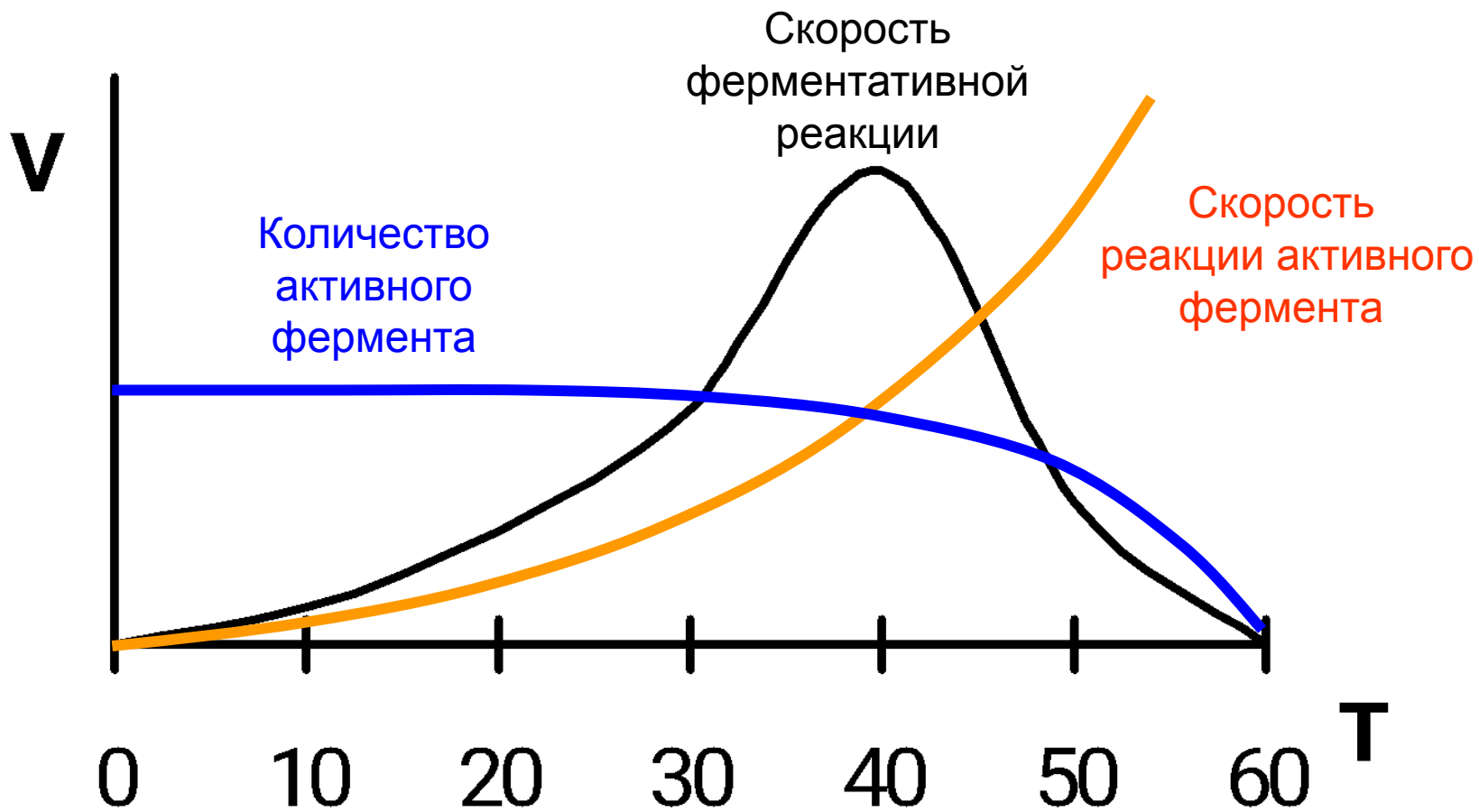


Зависимость скорости реакции от концентрации фермента



Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

- Повышение температуры на 10 градусов повышает скорость химической реакции в 2-4 раза.
- При повышении температуры фермент подвергается денатурации и теряет свою активность.

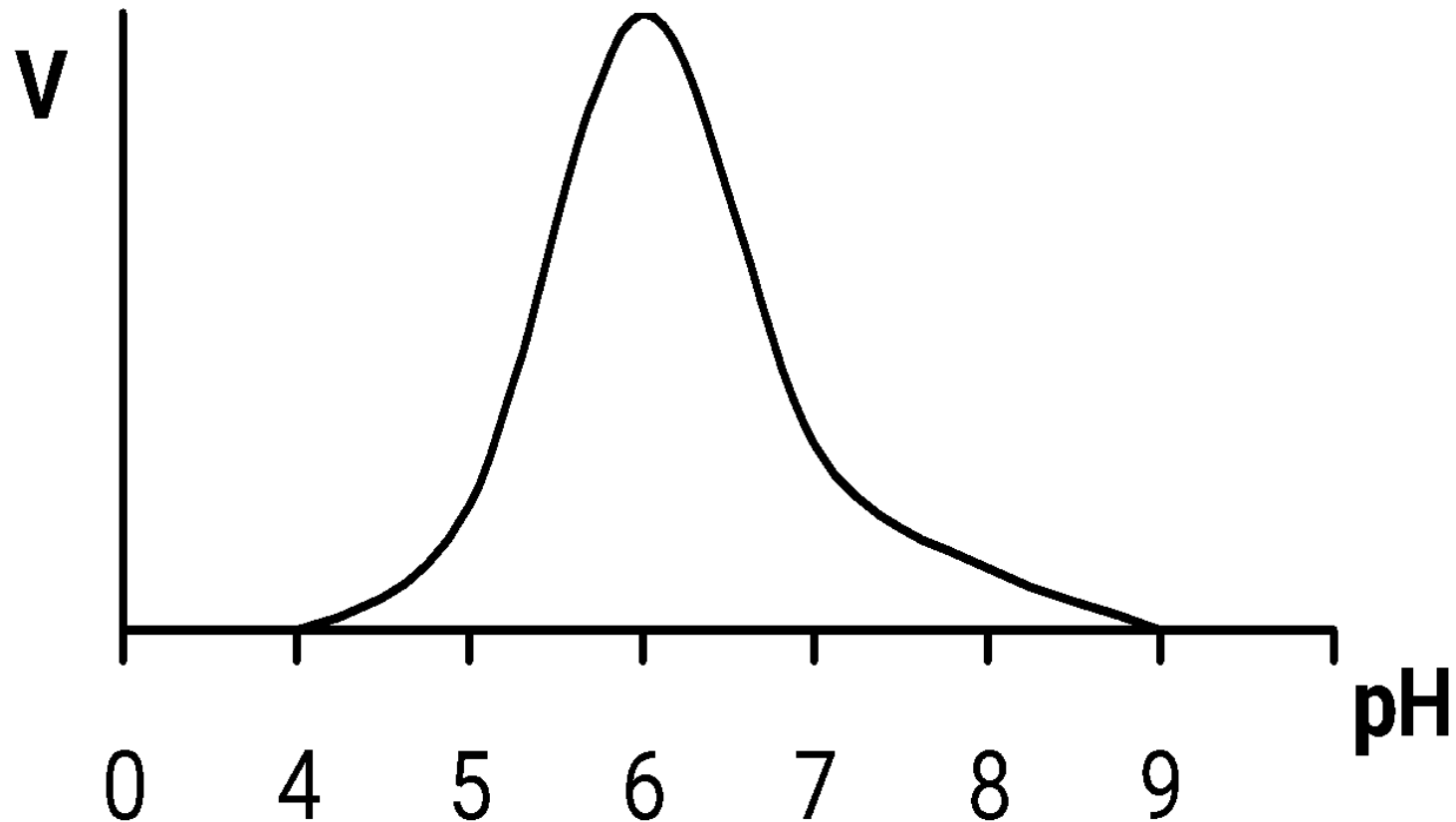


Группа микроорганизмов	Температура, С		
	Минимальная	Оптимальная	Максимальная
Психрофильные	-8 ... 0	10 ... 20	25 ... 30
Мезофильные	5 ... 10	20 ... 40	40 ... 45
Термофильные	25 ... 40	50 ... 60	70 ... 80

Влияние pH на скорость ферментативной реакции

- Изменение концентрации H^+ меняет химический состав фермента, его строение и каталитическую активность.
- Изменение концентрации H^+ меняет химический состав субстрата, его строение и способность вступать в ферментативную реакцию.
- Денатурацией фермента при очень высоких или очень низких pH.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH



Ферменты разной локализации в организме имеют различные оптимумы pH

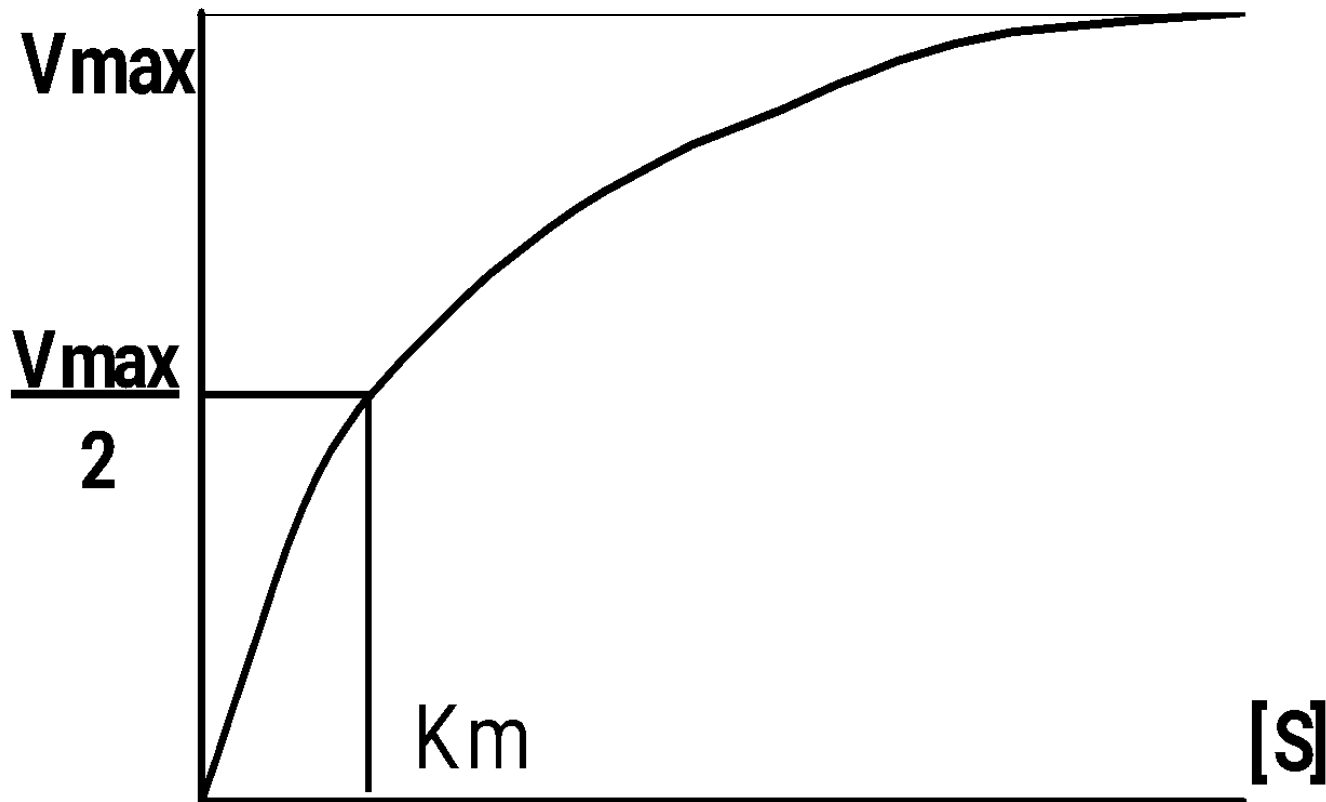
ЗНАЧЕНИЯ pH
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Среда	Значение pH	Возможные отклонения
Желудочный сок	1,7	0,9—2,0
Желчь печеночная	7,4	6,2—8,5
Желчь пузырная	6,8	5,6—8,0
Кровь (плазма)	7,4	7,25—7,44
Моча	5,8	5,0—6,5
Пот	7,4	4,2—7,8
Слезная жидкость	7,7	7,6—7,8
Слюна	6,8	5,6—7,9
Спинномозговая жидкость	7,6	7,4—7,8
Сок верхнего отдела толстого кишечника	6,1	—
Сок поджелудочной железы	8,8	8,6—9,0
Сок тонкого кишечника	6,5	5,1—7,1



Константа Михаэлиса-Ментона

- K_m – концентрация субстрата $[S]$, при которой скорость ферментативной реакции V равна половине от максимальной



Уравнение скорости ферментативной реакции

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

V – скорость реакции

V_{\max} – максимальная скорость реакции

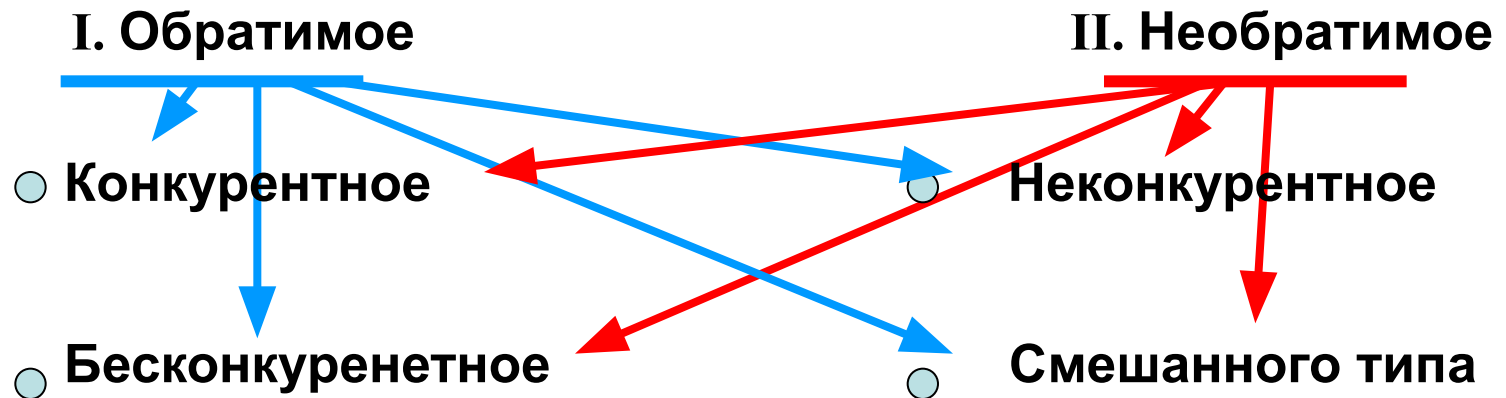
K_m – константа Михаэлиса

$[S]$ – концентрация субстрата

Влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативных реакций

Реакции ингибирования ферментативных процессов

ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ



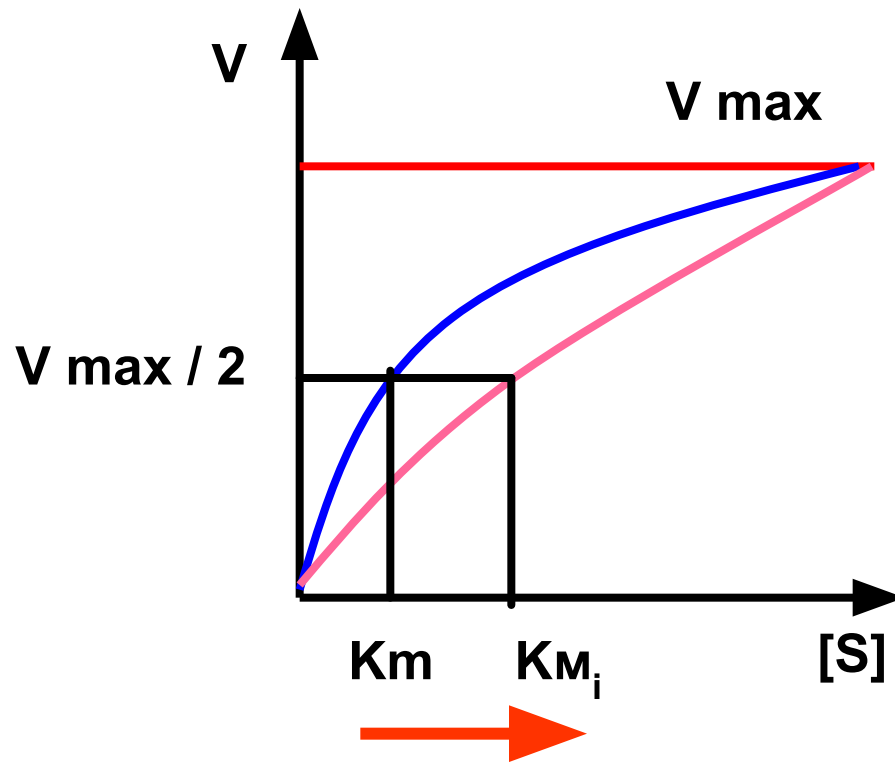
- Для определения обратимости ингибирования проводят диализ среды, где есть фермент и ингибитор.
- Если после диализа восстанавливается активность фермента, то ингибирование обратимое

Варианты взаимодействия ингибитора с ферментом

1. Блокируют активный центр фермента
2. Меняют четвертичную структуру фермента
3. Соединяются с коферментом, активатором
4. Блокируют часть фермента, соединяющуюся с коферментом
5. Нарушают взаимодействие фермента с субстратом
6. Вызывают денатурацию фермента (неспецифические ингибиторы)
7. Связываются с аллостерическим центром

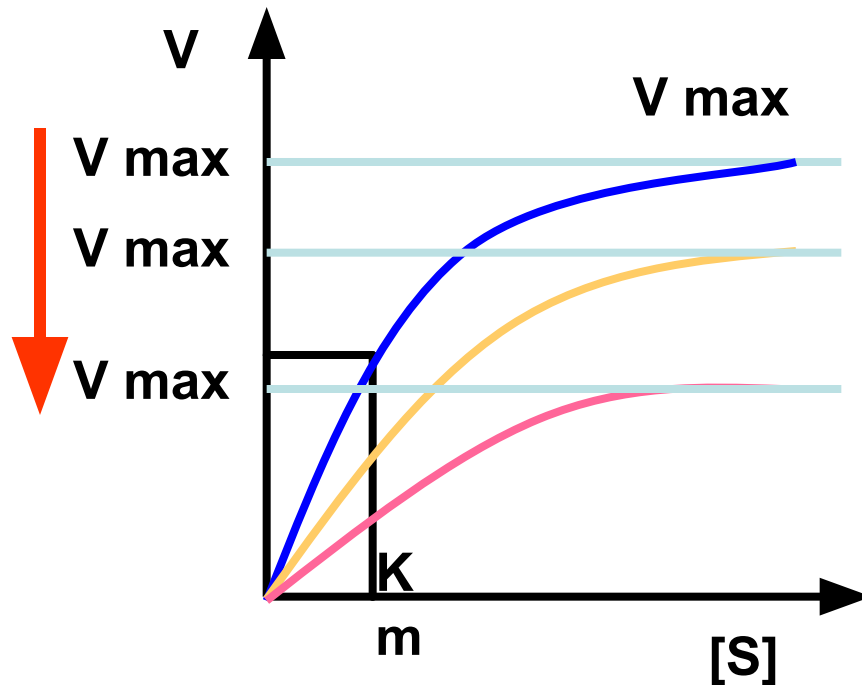
Конкурентный тип ингибирования

Осуществляется веществом, близким по химическому строению к субстрату



Неконкурентный тип ингибирования

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

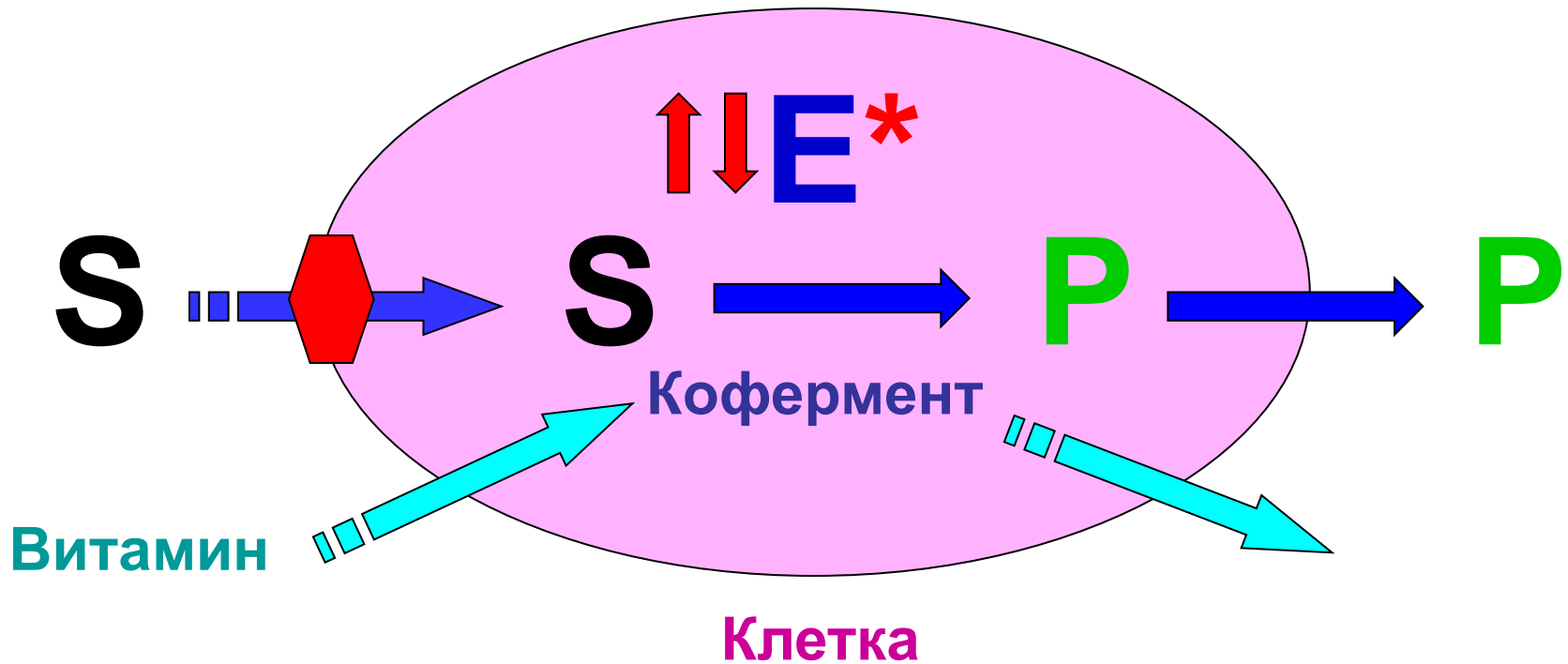


2. Регуляция скорости ферментативных реакций в организме

Важнейшим свойством живых организмов является способность к поддержанию **гомеостаза**.

Гомеостаз в организме поддерживается за счет регуляции скорости ферментативных реакций, которая осуществляется за счет изменения:

- I). Доступности молекул субстрата и кофермента;
- II). Каталитической активности молекул фермента;
- III). Количества молекул фермента.

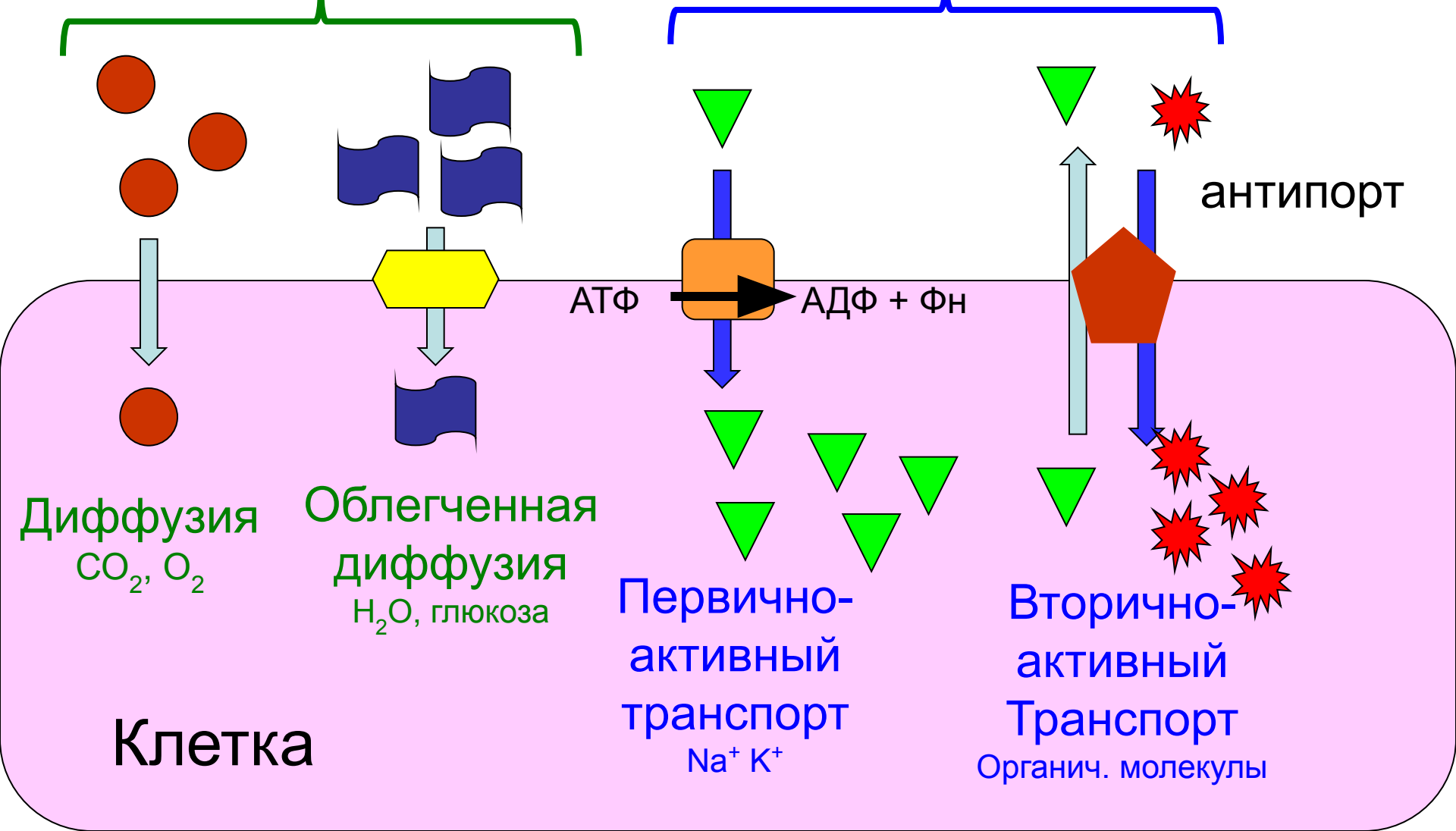


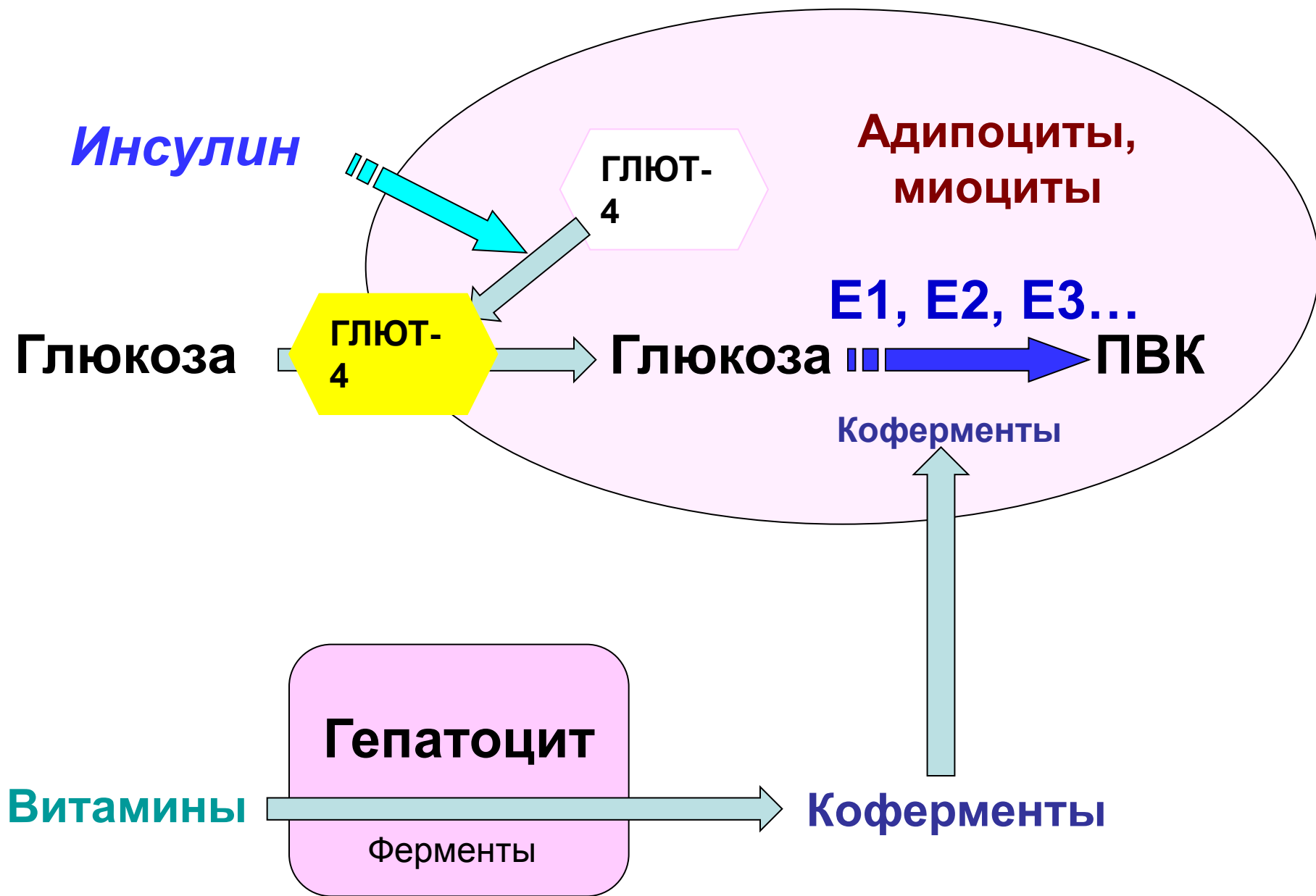
I. Доступность молекул субстрата и кофермента

Транспорт веществ через мембрану

Пассивный

Активный

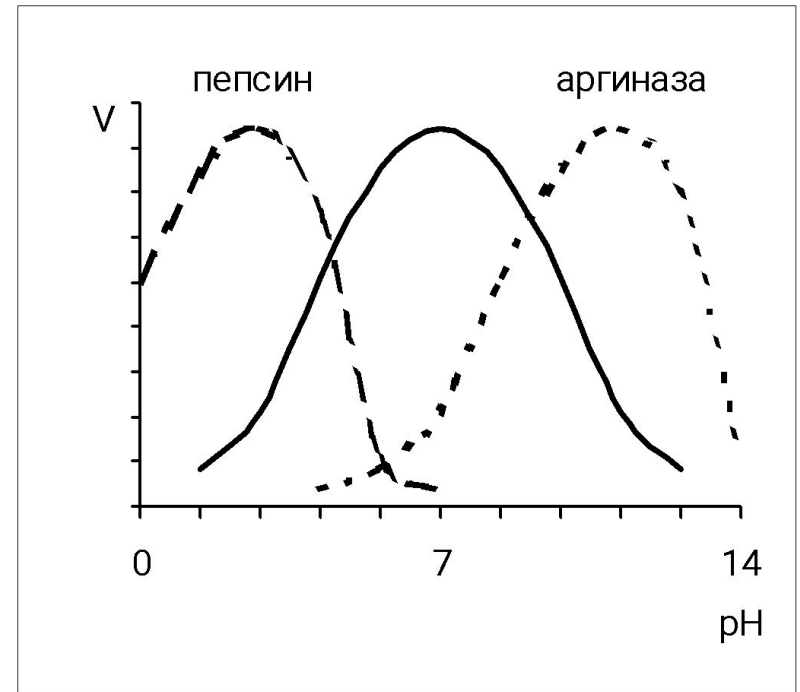
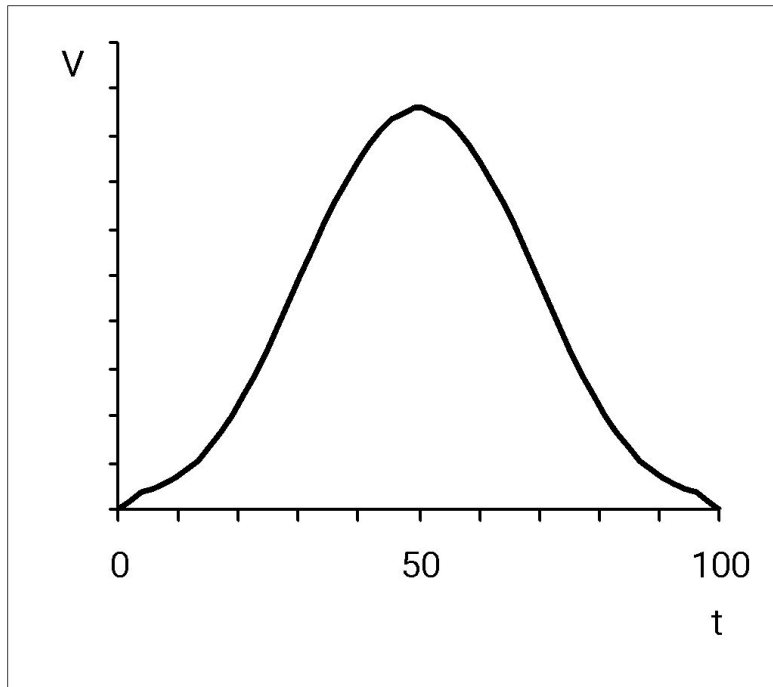




II. Регуляция каталитической активности фермента

Регуляция каталитической активности ферментов бывает:

1). Неспецифической. Каталитическая активность всех ферментов зависит от температуры, рН и давления.



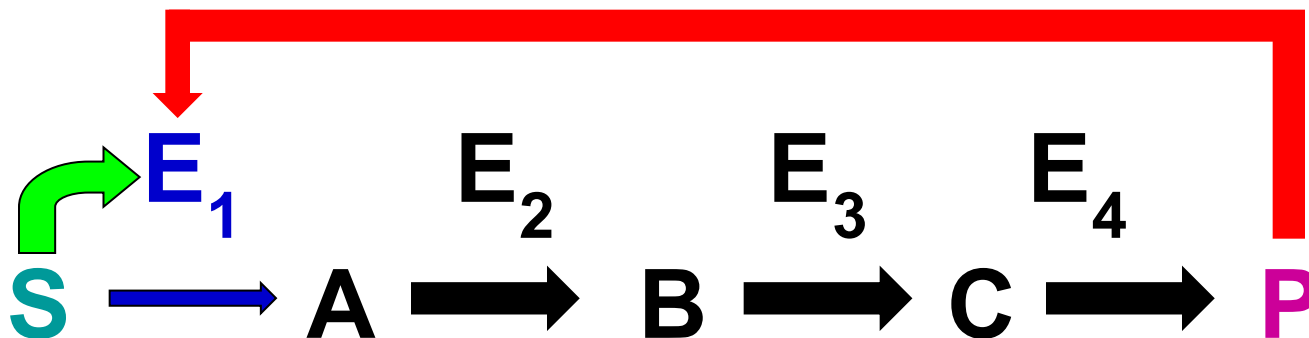
2). Специфической. Под действием специфических активаторов и ингибиторов изменяется активность регуляторных ферментов, которые контролируют скорость метаболических процессов в организме.

Механизмы специфической регуляции каталитической активности ферментов:

- 1). Аллостерическая регуляция;
- 2). Регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий;
- 3). Регуляция через ковалентную модификацию.
 - а). Регуляция путем фосфорилирования/дефосфорилирования фермента;
 - б). Регуляция частичным протеолизом.

1. Аллостерическая регуляция

Аллостерическими называют ферменты, активность которых регулируется обратимым нековалентным присоединением модулятора (активатора и ингибитора) к аллостерическому центру.

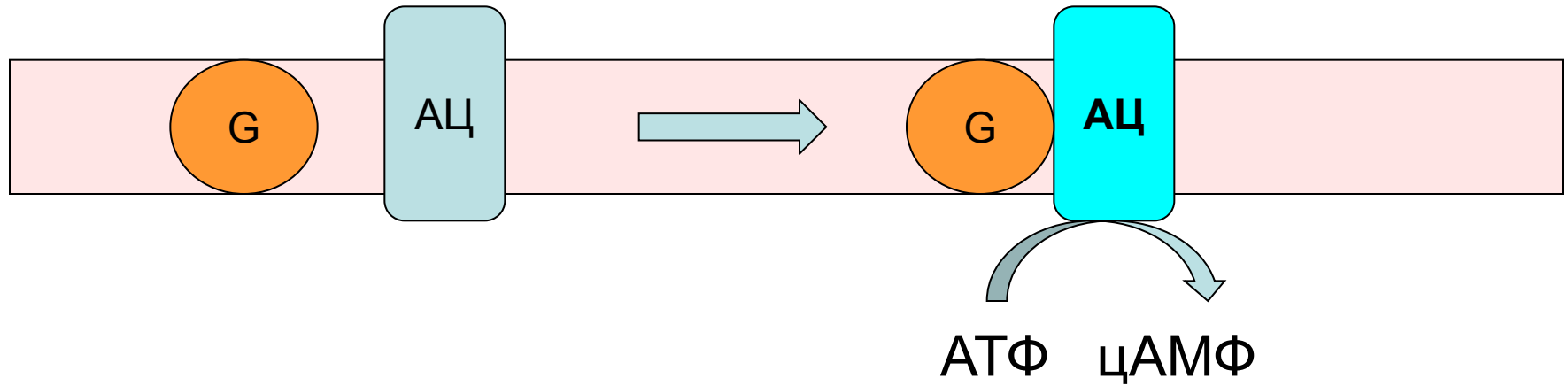


Активирование происходит по принципу прямой положительной связи, а ингибирование - по принципу отрицательной обратной связи.

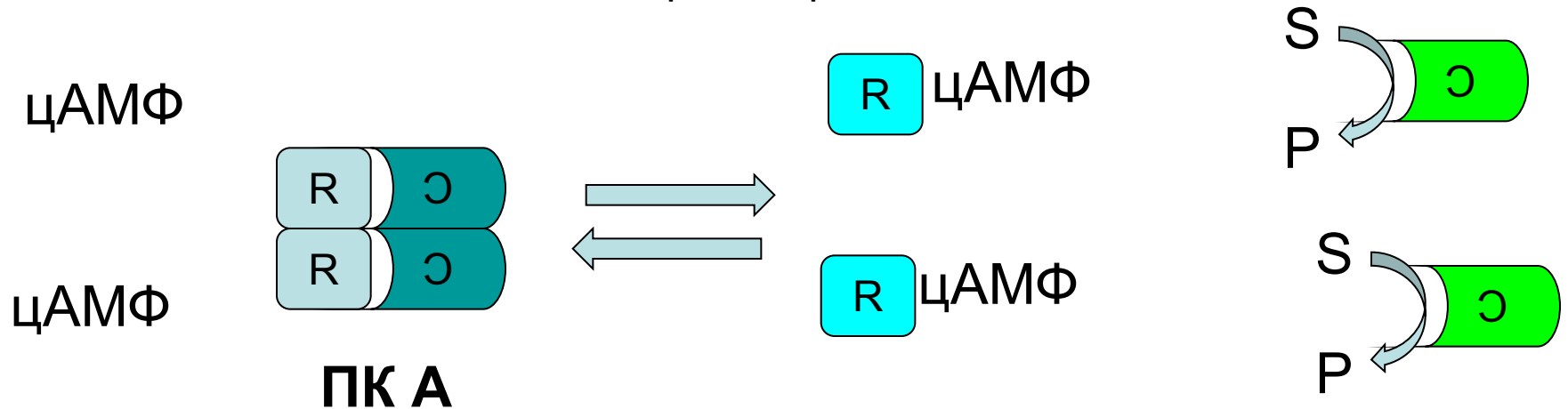
Активность аллостерических ферментов изменяется очень быстро

2. Регуляция каталитической активности ферментов с помощью белок-белковых взаимодействий

а). Активация ферментов в результате присоединения регуляторных белков.



б). Регуляция каталитической активности ферментов ассоциацией/диссоциацией протомеров

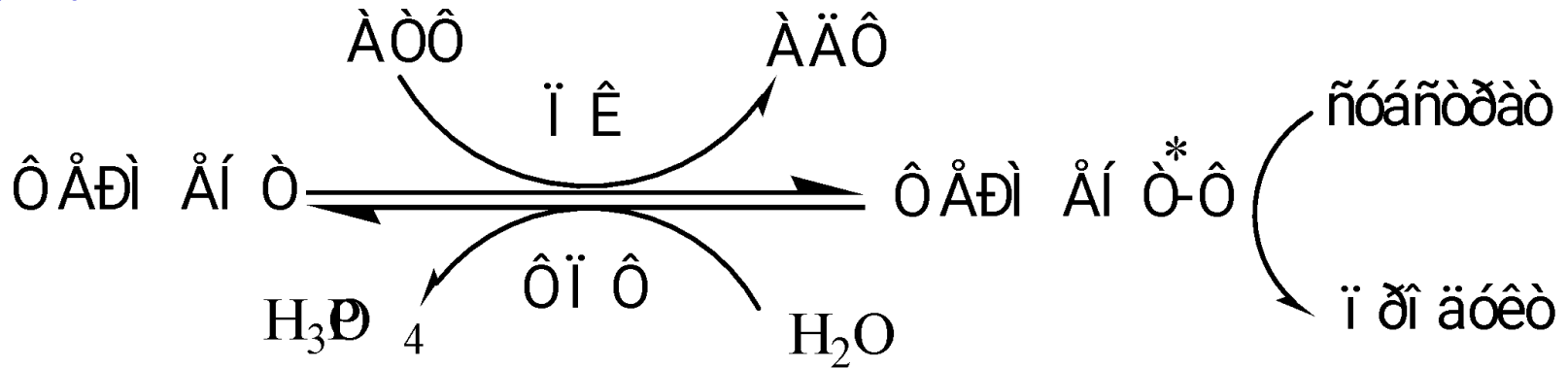


3). Регуляция каталитической активности ферментов путем их ковалентной модификации

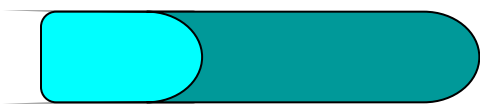
Регуляция активности фермента осуществляется в результате ковалентного присоединения или отщепления от него фрагмента.

Бывает 2 видов:

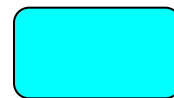
а). путем фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов; .



б). путем частичного протеолиза ферментов (внеклеточные)



Трипсиноген



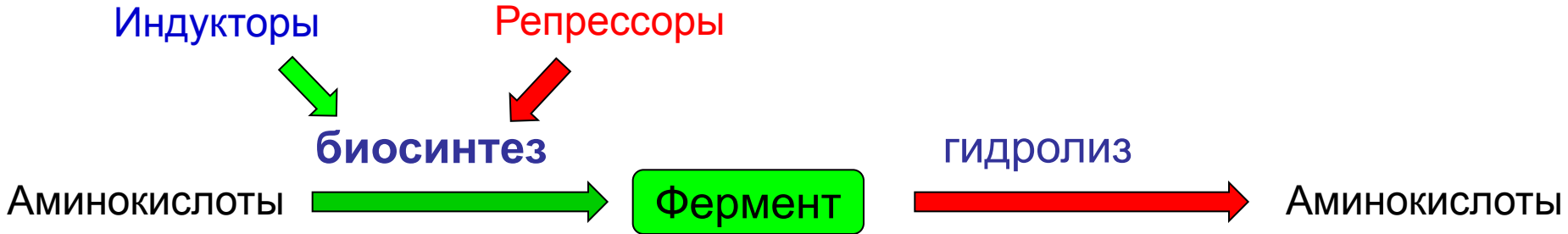
Субстрат

Продукт



Трипсин

III. Механизмы регуляции количества ферментов



- **Индукторы** - это вещества которые запускают синтез ферментов
 - Процесс запуска синтеза ферментов называется **индукцией**
 - Ферменты, концентрация, которых зависит от добавления индукторов, называются **индуцируемыми ферментами**
 - Ферменты, концентрация которых постоянна и не регулируется индукторами, называются **конститутивными ферментами**
- Базовый уровень** - это концентрация индуцируемого фермента при отсутствии индуктора.

- **Репрессоры** (точнее **корепрессоры**) - вещества, которые останавливают синтез ферментов.
- Процесс остановки синтеза ферментов называется **репрессией**.
- **Дерепрессией** – называется процесс возобновления синтеза ферментов после удаления из среды репрессора
- В качестве индукторов и репрессоров выступают некоторые метаболиты, гормоны и биологически активные вещества.

3. Клеточная сигнализация

В многоклеточных организмах поддержание гомеостаза обеспечивают 3 системы:

1). Нервная 2). Гуморальная 3). Иммунная

- Регуляторные системы функционируют с участием сигнальных молекул.
- **Сигнальные молекулы** – это вещества, которые переносят информацию.
- Для передачи сигнала:

А). ЦНС использует **нейромедиаторы**

Б). Гуморальная система использует **гормоны**

В). Иммунная система использует **цитокины**.

Гормоны - это сигнальные молекулы беспроводного системного действия
Истинные гормоны в отличии от других сигнальных молекул:

1. синтезируются в специализированных эндокринных клетках,
2. транспортируются кровью
3. действуют дистантно на ткани мишени.

Гормоны по строению делятся: на

1. **белковые** (гормоны гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной железы),
 2. **производные аминокислот** (из тирозина тиреоидные гормоны, катехоламины)
 3. **стероидные** (половые, кортикоиды).
- Пептидные гормоны и катехоламины растворимы в воде, они регулируют преимущественно **каталитическую активность ферментов**.
 - Стероидные и тиреоидные гормоны водонерастворимы, они регулируют преимущественно **количество ферментов**.

Каскадные системы

*Гормоны регулируют количество и каталитическую активность ферментов не напрямую, а опосредовано через **каскадные системы***



Каскадные системы:

1. Многократно усиливают сигнал гормона (повышают количество или каталитическую активность фермента) так что 1 молекула гормона способна вызвать изменение метаболизма в клетке
2. Обеспечивают проникновение сигнала в клетку (водорастворимые гормоны в клетку самостоятельно не проникают)

каскадные системы СОСТОЯТ ИЗ:

1. **рецепторов;**
2. **регуляторных белков** (G-белки, IRS, Shc, STAT и т.д.).
3. **вторичных посредников** (messenger - посыльный) (Ca²⁺, цАМФ, цГМФ, ДАГ, ИТФ);
4. **ферментов** (аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфодиэстераза, протеинкиназы A, C, G, фосфопроteinфосфотаза);

Виды каскадных систем:

1. аденилатциклазная,
2. гуанилатциклазная,
3. инозитолтрифосфатная,
4. RAS и т.д.),

Рецепторы

Рецепторы - это белки, встроенные в клеточную мембрану или находящиеся внутри клетки, которые, взаимодействуя с сигнальными молекулами, меняют активность регуляторных белков.

По локализации рецепторы делятся на:

- 1) цитоплазматические;
- 2) ядерные;
- 3) мембранные.

По эффекту рецепторы делятся на:

- **активаторные** (активируют каскадные системы)
- **ингибиторные** (блокируют каскадные системы).

По механизму передачи сигнала рецепторы делятся на 4 типа:

- 1). **Рецепторы, связанные с ионными каналами**
- 2). **Рецепторы, с ферментативной активностью.**

Бывают 3 видов:

а). Рецепторы, с тирозинкиназной активностью (тирозиновые протеинкиназы).

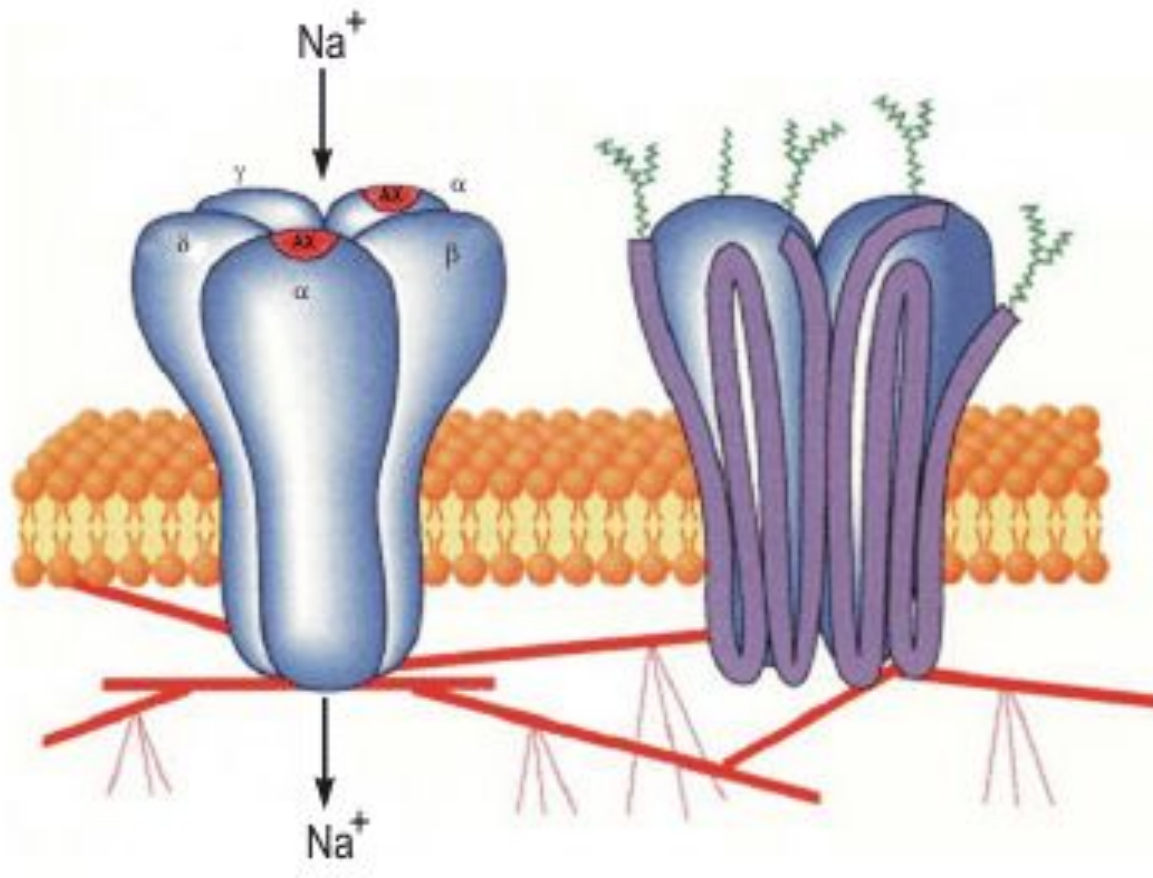
б). Рецепторы, с фосфатазной активностью (тирозиновые протеинфосфотазы) (например, ФПФ).

в). Рецепторы с гуанилатциклазной активностью (ГЦ).

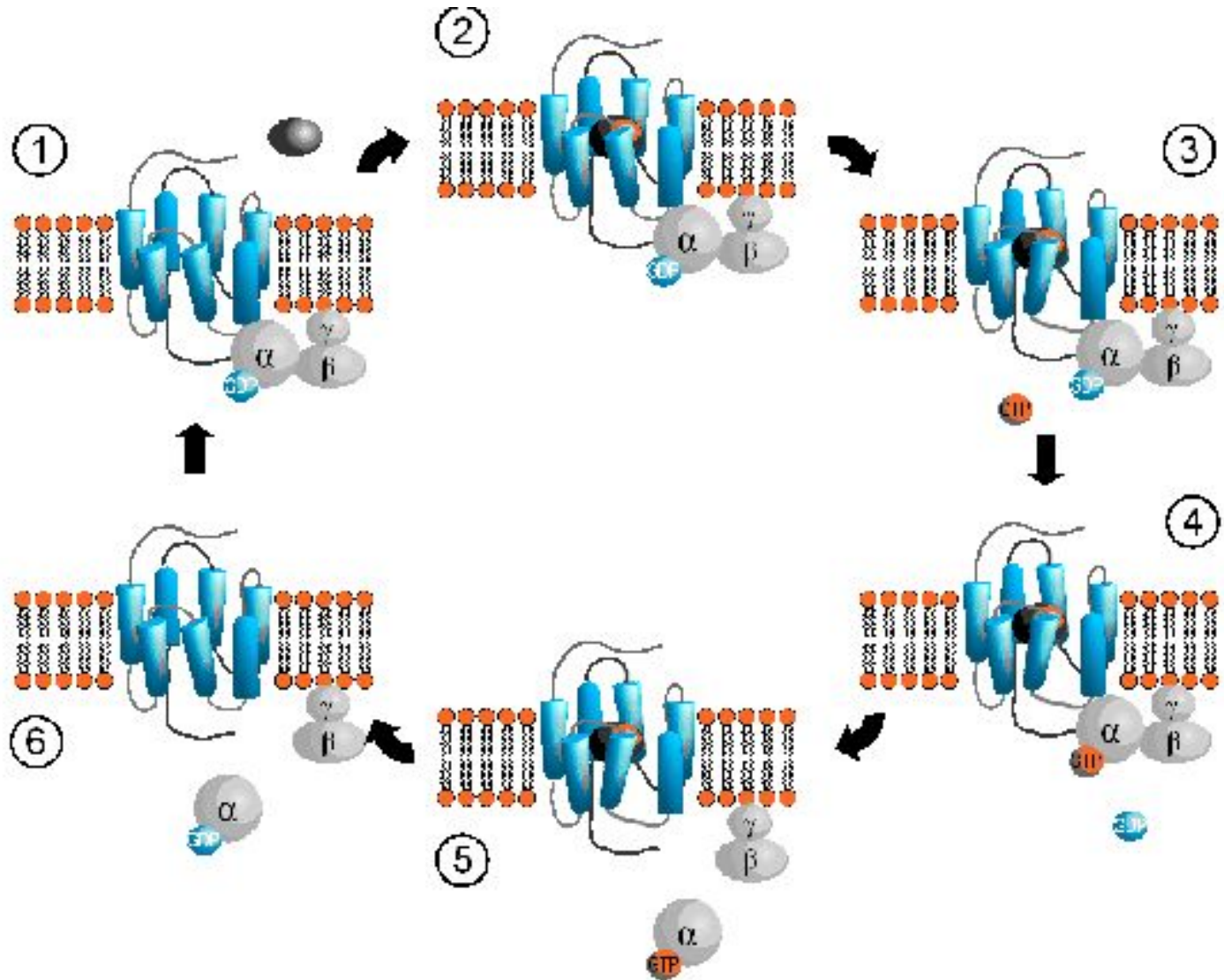
3). **Рецепторы, сопряженные с G-белками** по строению их еще называют **серпантинными**.

4). **Ядерные и цитоплазматические рецепторы.**

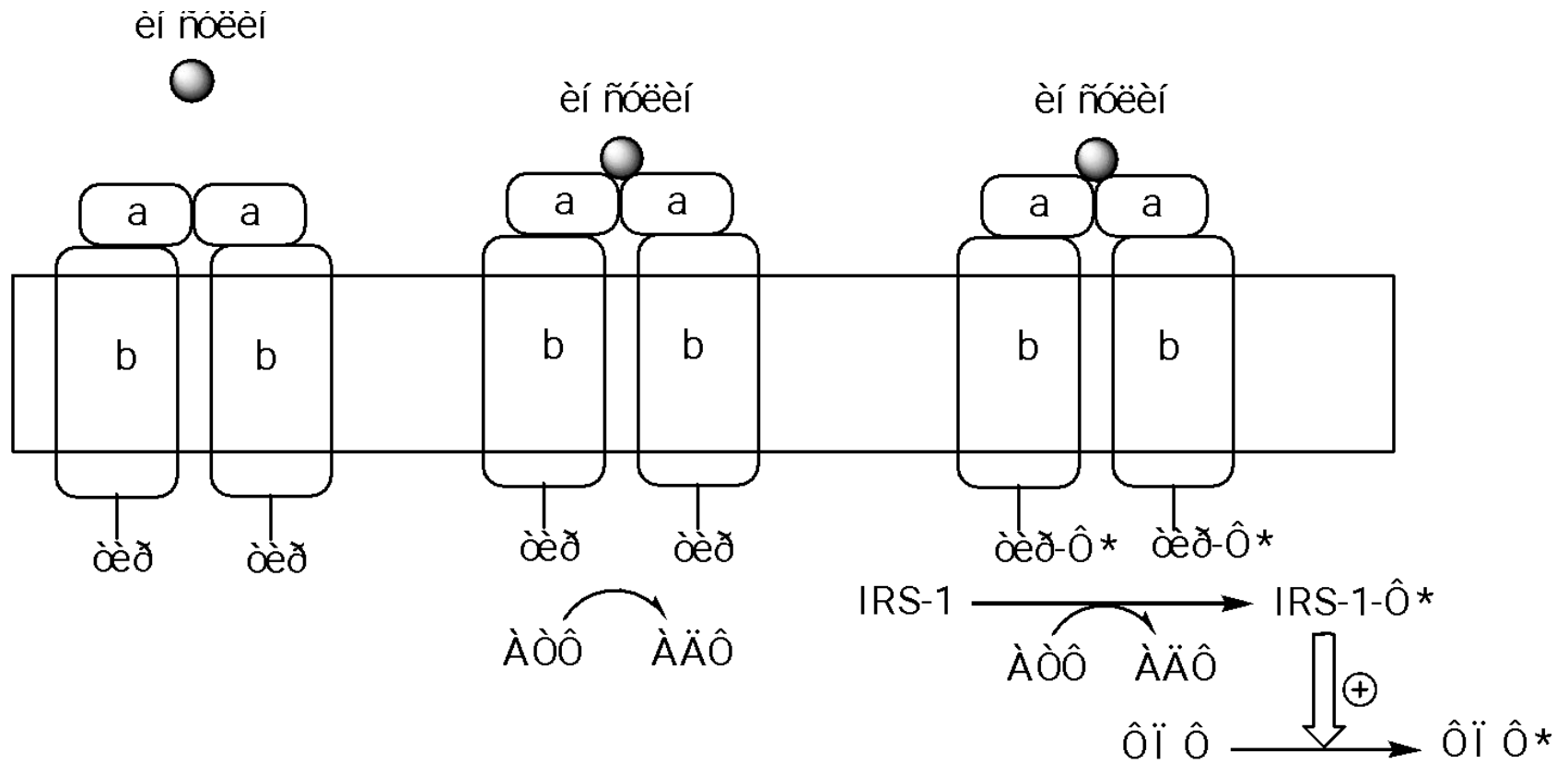
Рецептор, связанный с ионным каналом



Работа рецептора связанная с G-белком (серпантинный)



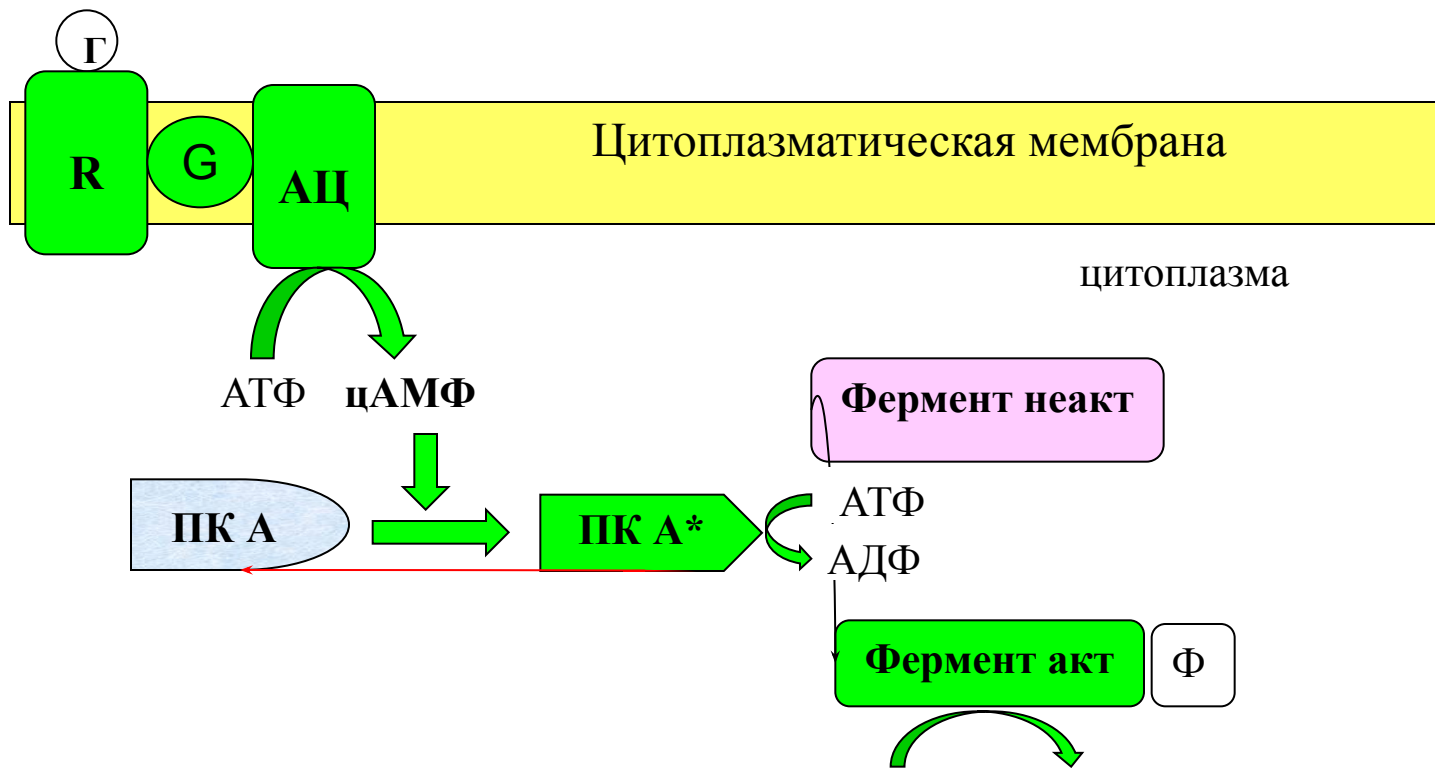
Рецептор с ферментативной активностью (тирозинкиназный)



Аденилатциклазная система

Гормоны:

- Глюкагон, Вазопресин, Катехоламины (через β 2-адренэргические рецепторы)
- Гормоны гипофиза (АКТГ, ЛДГ, ФСГ, ЛТ, МСГ, ТТГ), паратгормон, Фактор роста нервов
- PGE_1

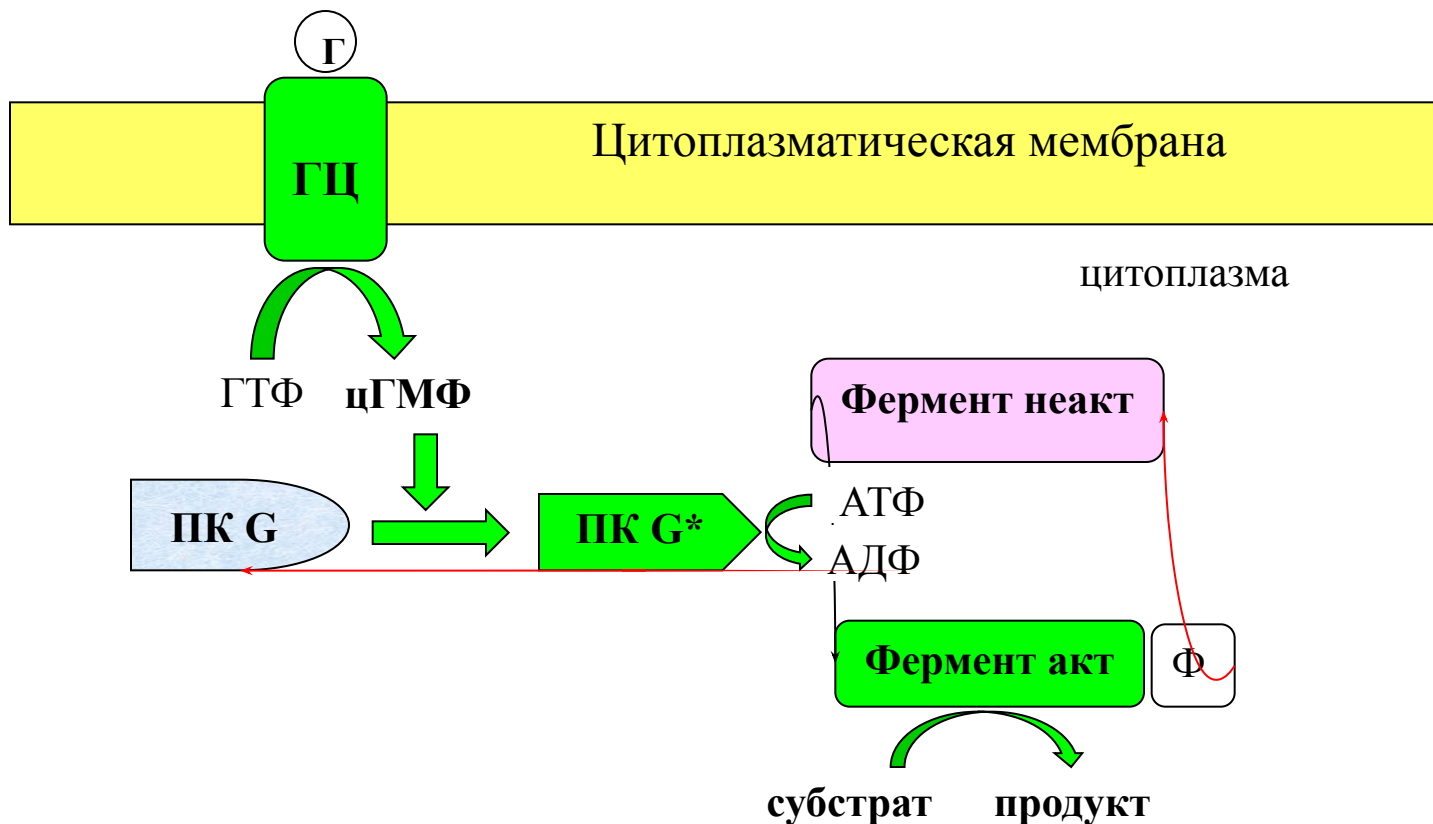


Имеются α - и β -адренэргические рецепторы. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах клеток. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах клеток печени, мышц.

Гуанилатциклазная система

Сигнальные молекулы:

- ПНФ (расслабление тонуса сосудов),
- Катехоламины (через α -адренэргические рецепторы)
- Бактериальный эндотоксин (блокирует всасывание воды вызывает диарею)
- NO, продукты ПОЛ (цитоплазматическая ГЦ)

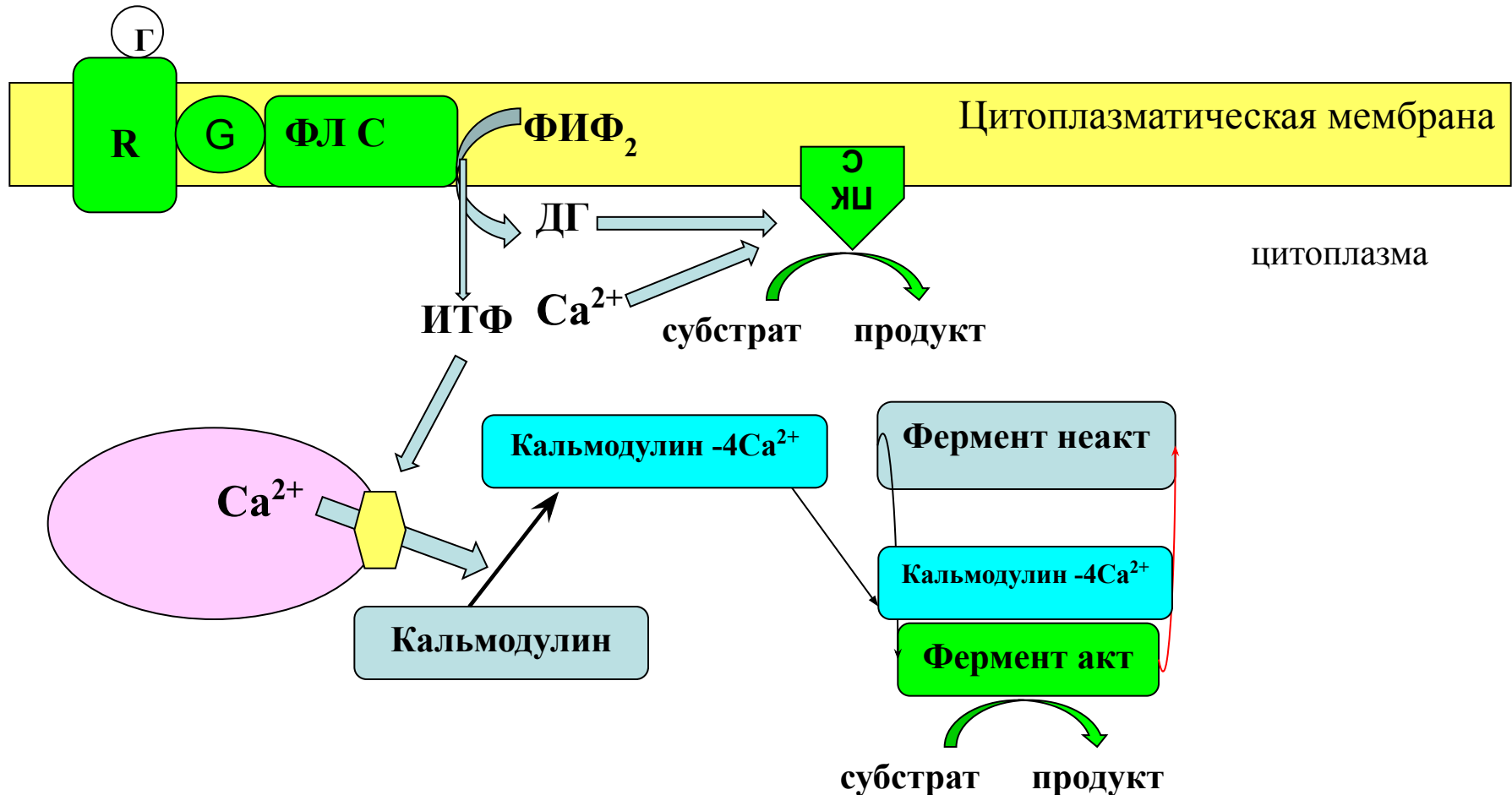


Гуанилатциклазная система функционирует в легких, почках, эндотелии кишечника, сердце, надпочечниках, сетчатке и др. Она участвует в регуляции водно-солевого обмена и тонуса сосудов, вызывает релаксацию и т.д.

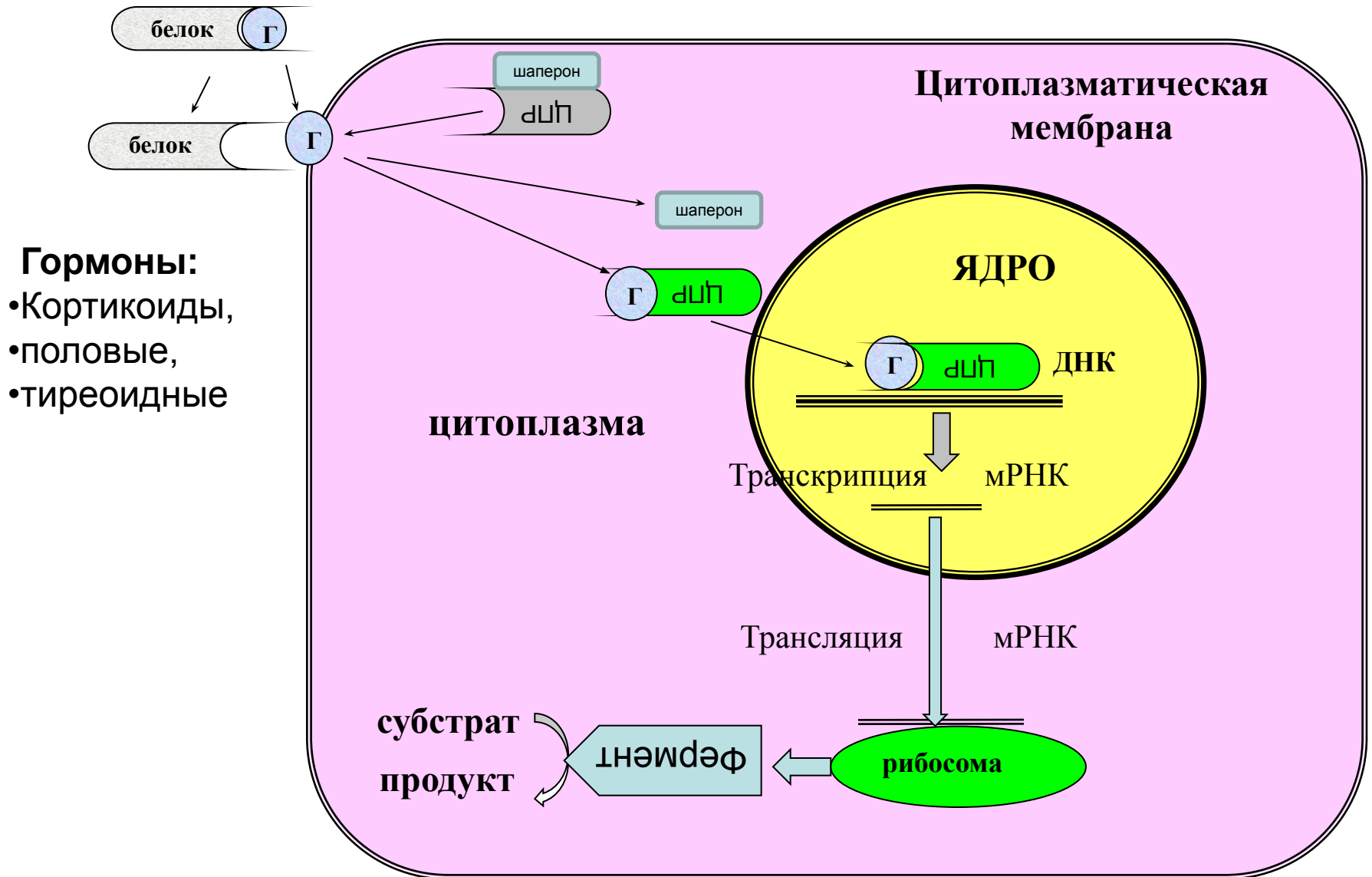
Инозитолтрифосфатная система

Гормоны:

- гонадолиберин, тиролиберин, дофамин, тромбоксаны A₂, эндоперекиси,
- лейкотриены, ангиотензин II, эндотелин, паратгормон, нейропептид Y,
- адренергические катехоламины (через α₁ рецепторы), ацетилхолин,
- брадикинин, вазопрессин (через V₁ рецепторы).



Трансмембранная передача информации с участием цитоплазматических рецепторов



Спасибо за внимание!