

ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава РФ
Кафедра биохимии

Дисциплина: Биохимия

ЛЕКЦИЯ № 2

Ферменты 2.

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

Екатеринбург, 2015г

План лекции

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

**Энзимология – наука,
изучающая ферменты**

1. Кинетика ферментативных реакций

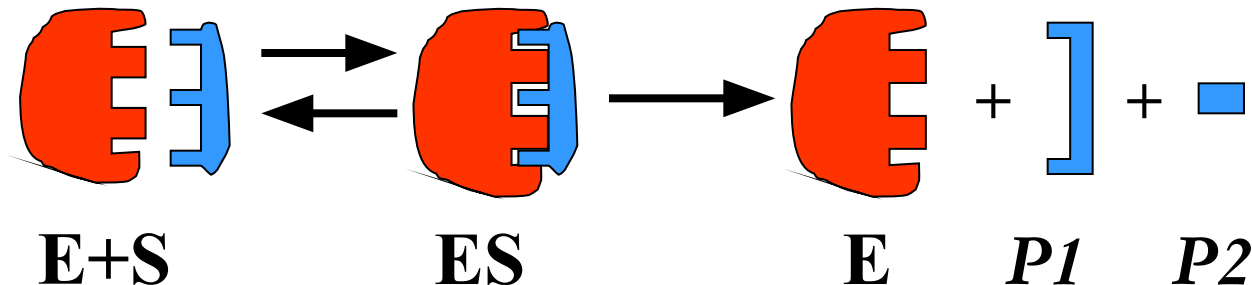
Кинетика ферментативных реакций - направление энзимологии, исследующее влияния реагирующих веществ (субстраты, продукты, ингибиторы, активаторы и т.д.) и условий (рН, t° , давление) на скорость ферментативной реакции.

Теории о механизмах действия ферментов

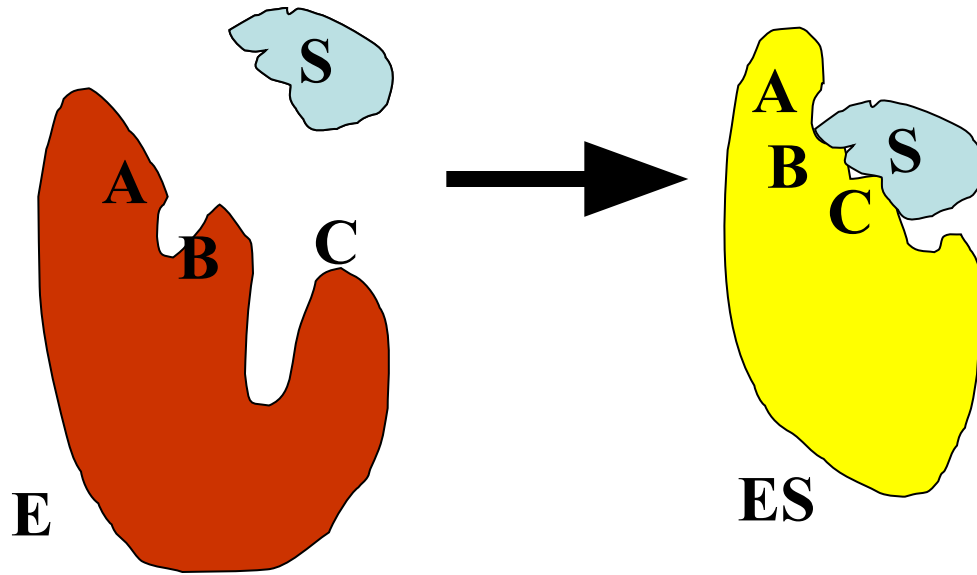
Теории о специфичности действия ферментов

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»



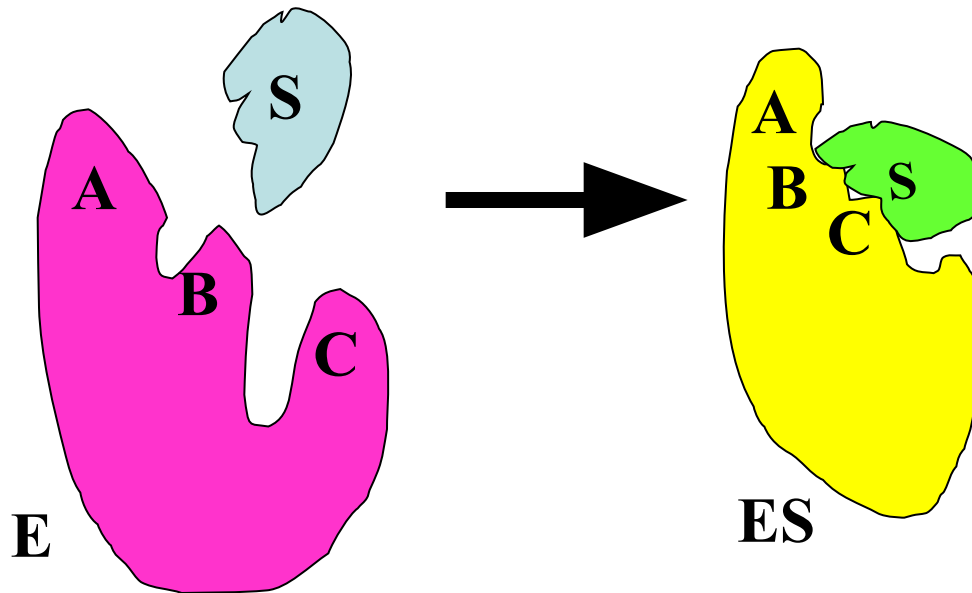
Существует не только геометрическое, но и электростатическое соответствие

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.

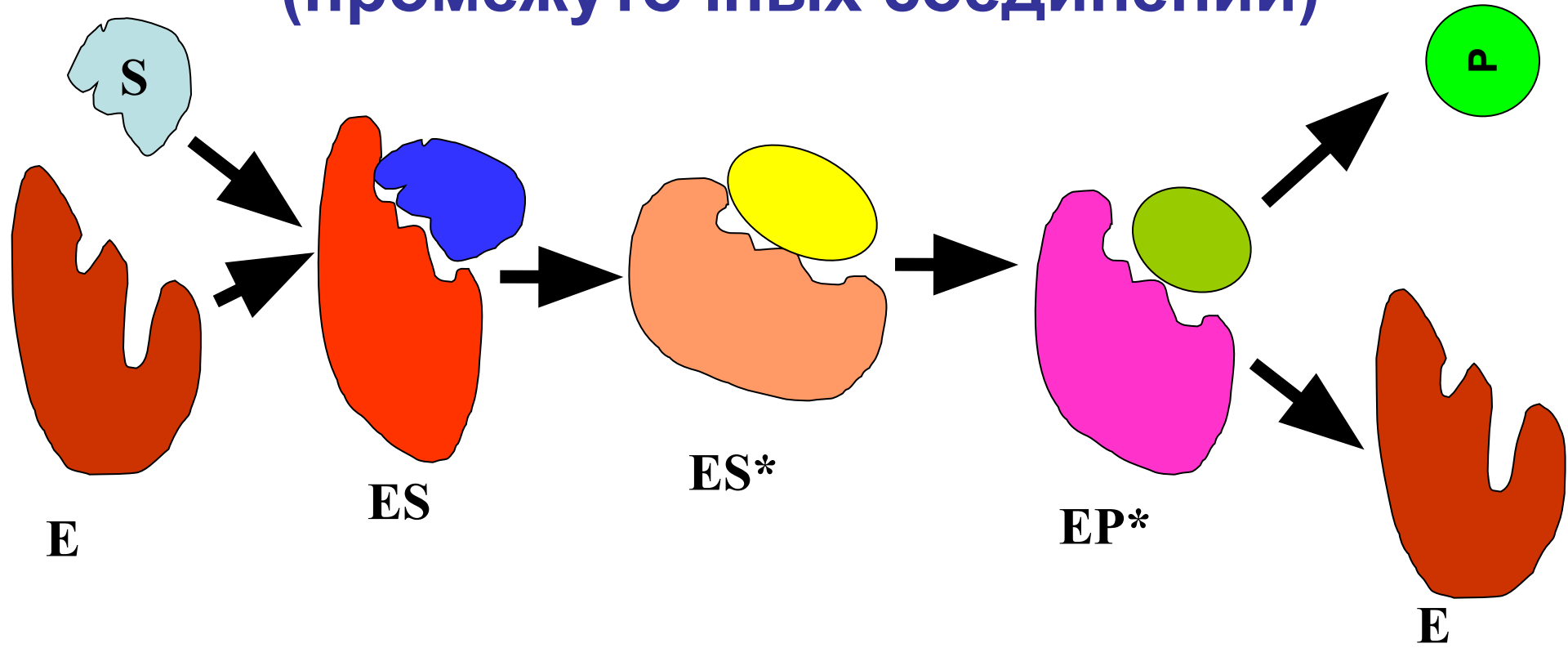
Теория основана на данных кинетического анализа, изучением фермент-субстратных комплексов методами рентгено-структурного анализа, спектрографии и кристаллографии и др.

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:

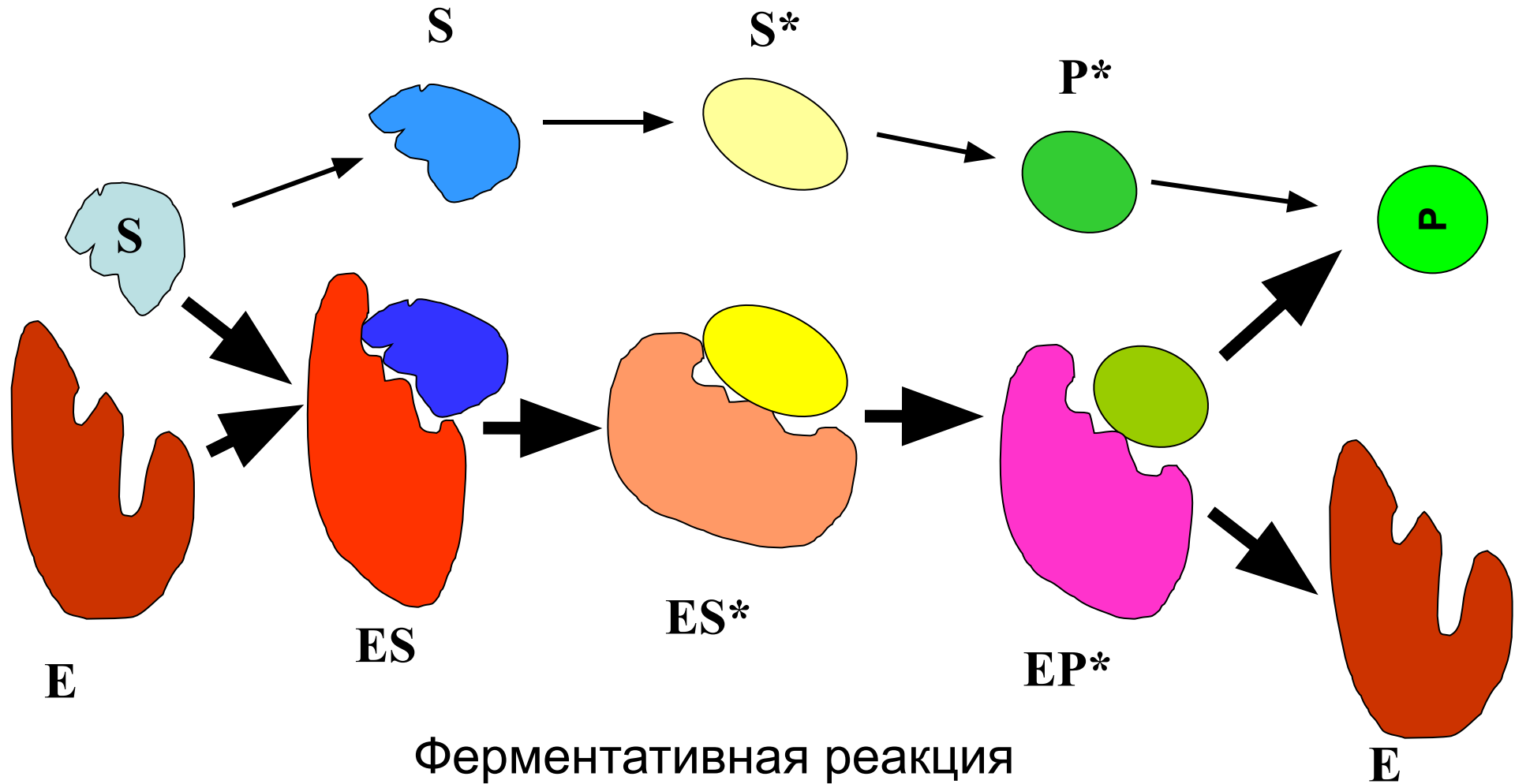
- 1. Кислотно-основные реакции** – в активном центре фермента находятся группы $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$, которые способны присоединять и отдавать H.
- 2. Реакции присоединения (отщепления, замещения)** электрофильные, нуклеофильные – в активном центре фермента находятся гетероатомы смещающие 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

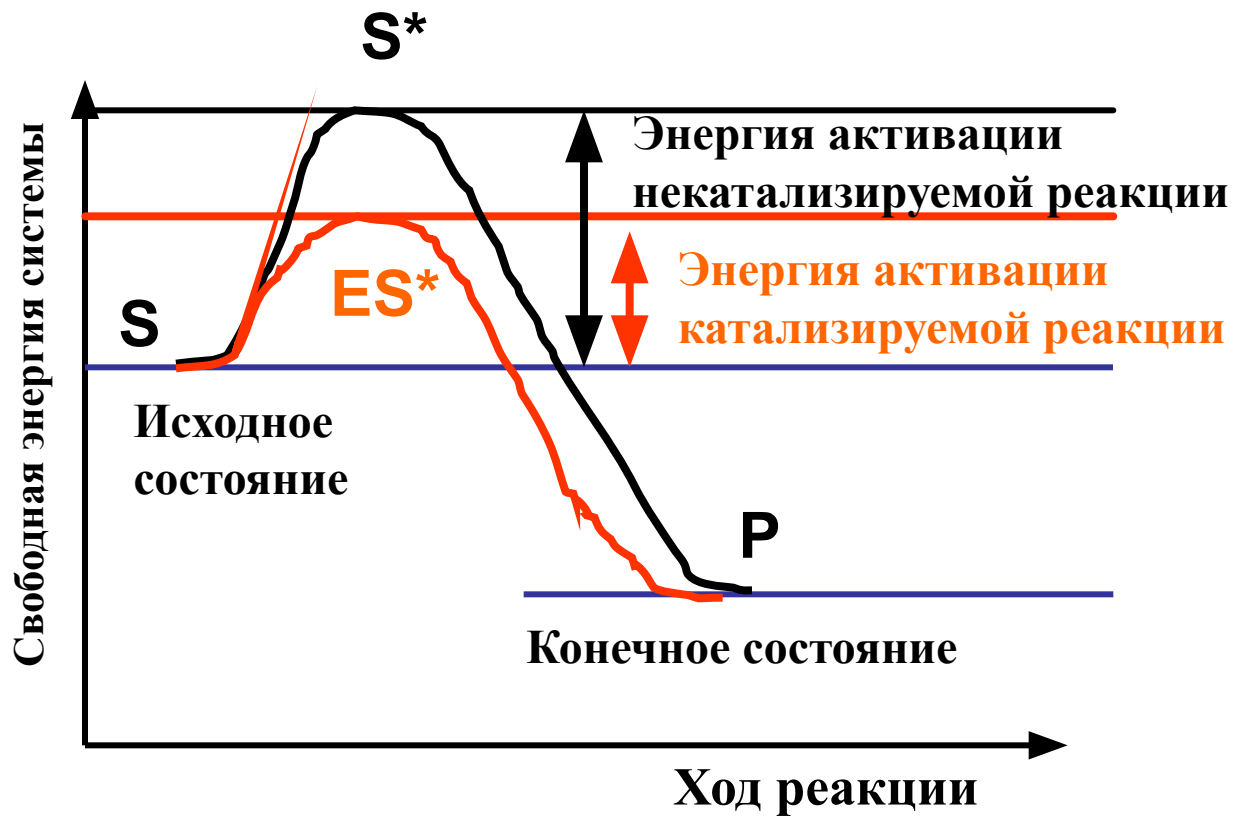
- Скорость химической реакции зависит от концентрации реагирующих веществ
- В комплексе с ферментами субстраты превращаются в более устойчивые промежуточные соединения, за счет чего их концентрация резко повышается, что способствует ускорению реакции

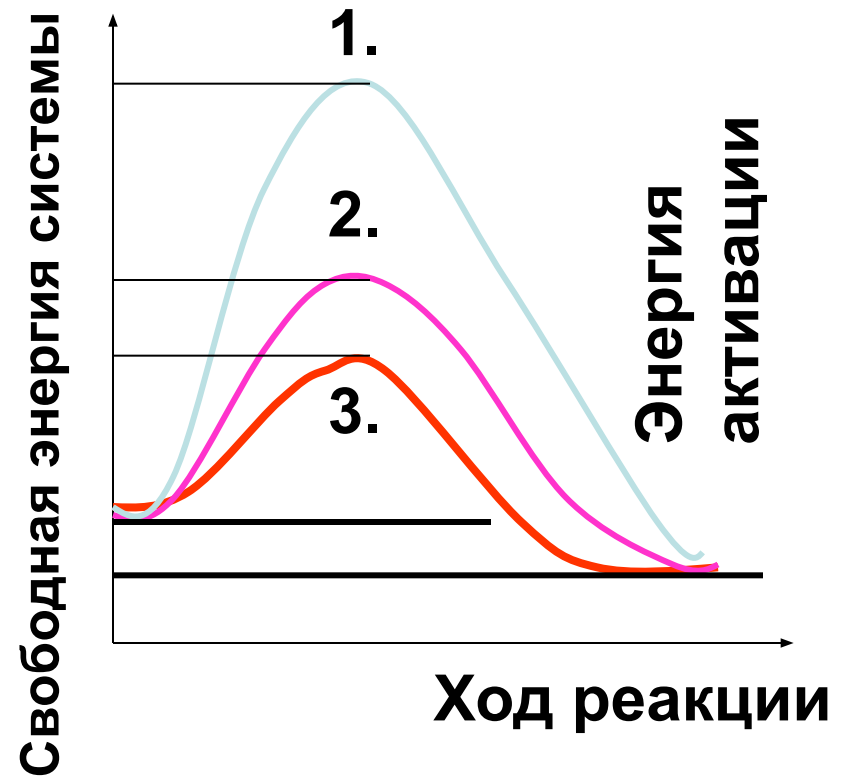
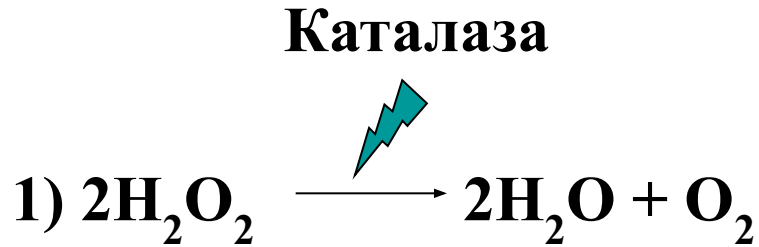
Неферментативная реакция



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:

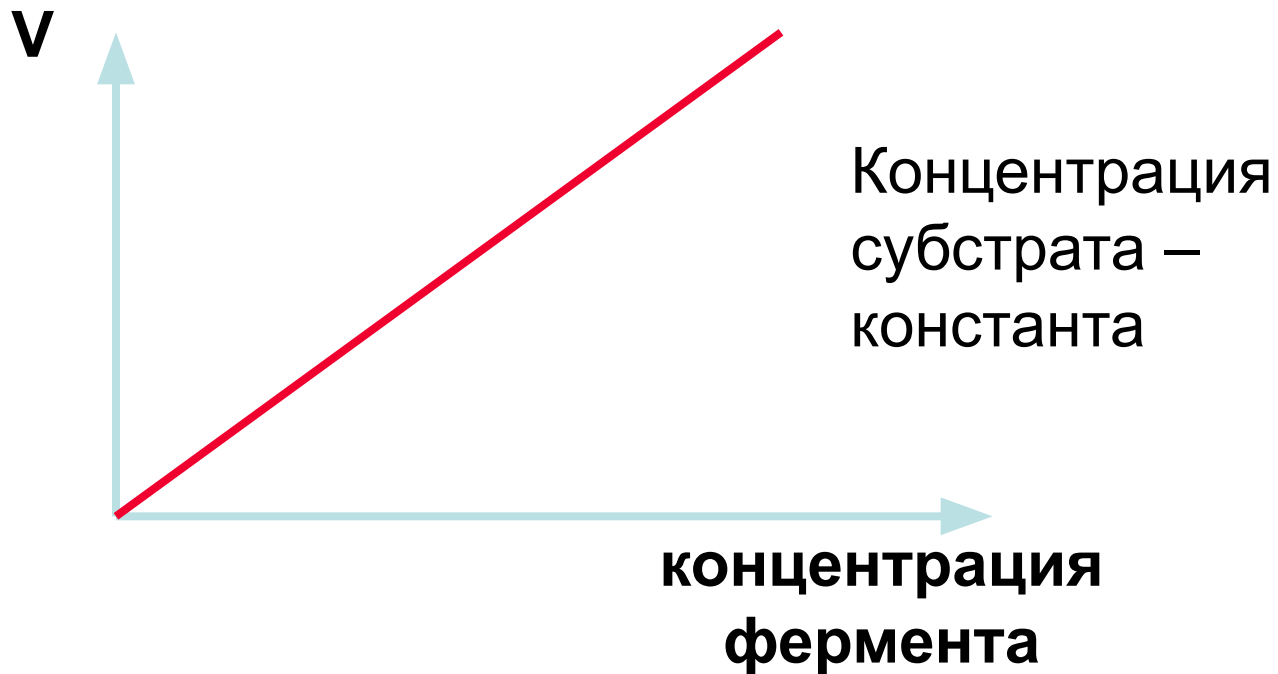
1. В спонтанной реакции – 18 ккал/моль
2. При использовании катализатора Fe^{2+} – 12 ккал/моль
3. В присутствии фермента каталазы – 5 ккал/моль

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости реакции
от концентрации субстрата

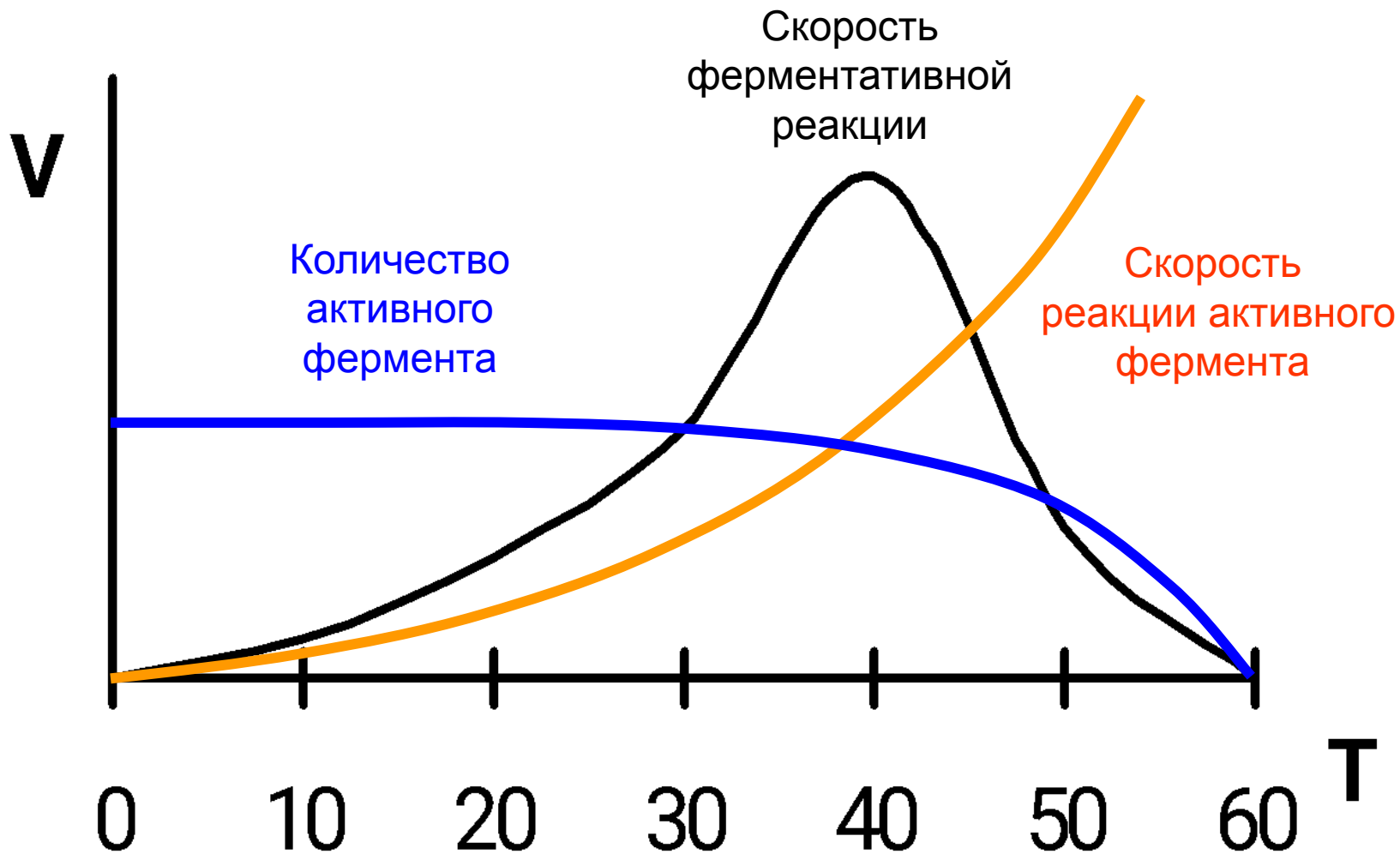


Зависимость скорости реакции от концентрации фермента



Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

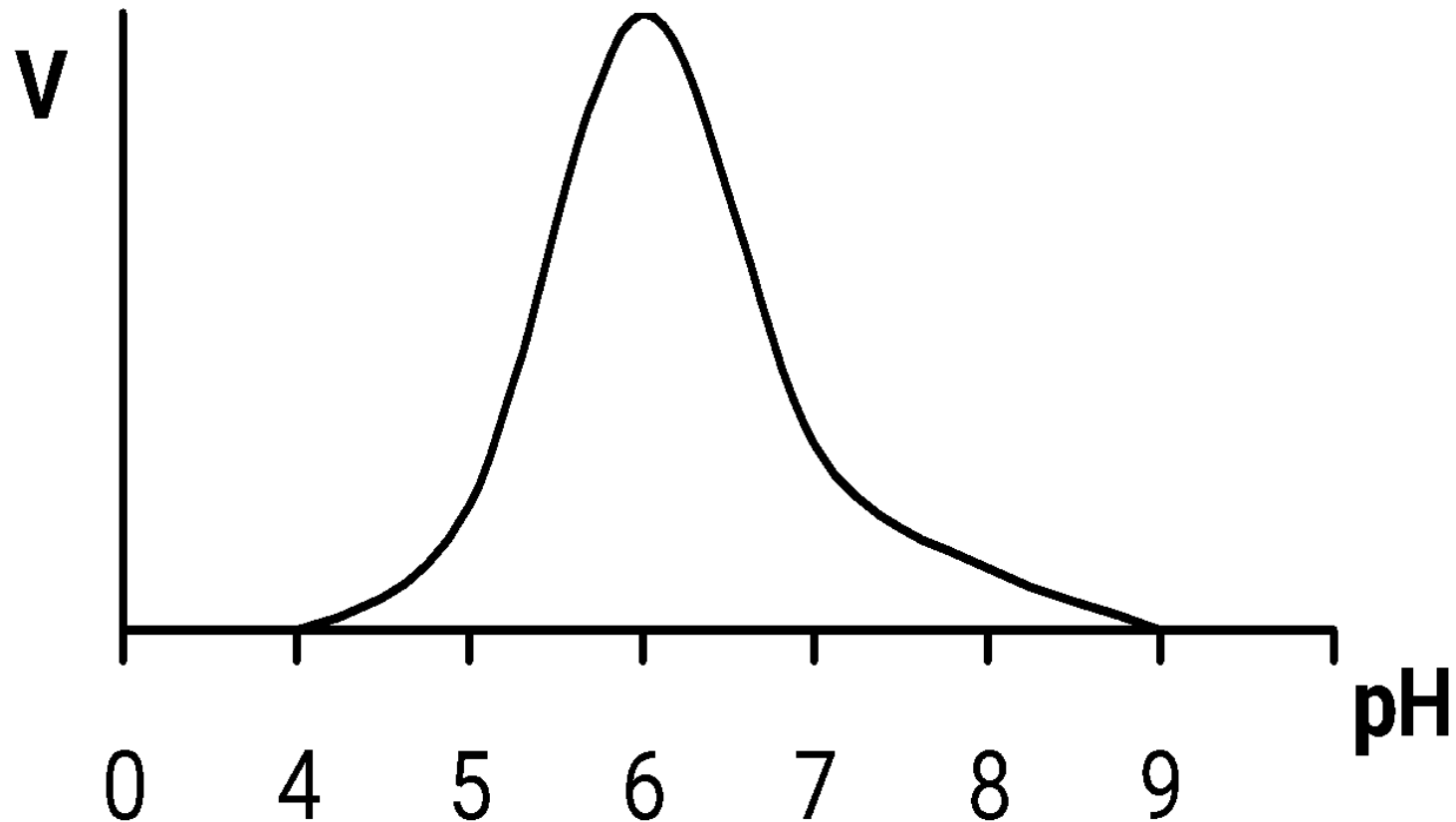
- Повышение температуры на 10 градусов повышает скорость химической реакции в 2-4 раза.
- При повышении температуры фермент подвергается денатурации и теряет свою активность.



Влияние pH на скорость ферментативной реакции

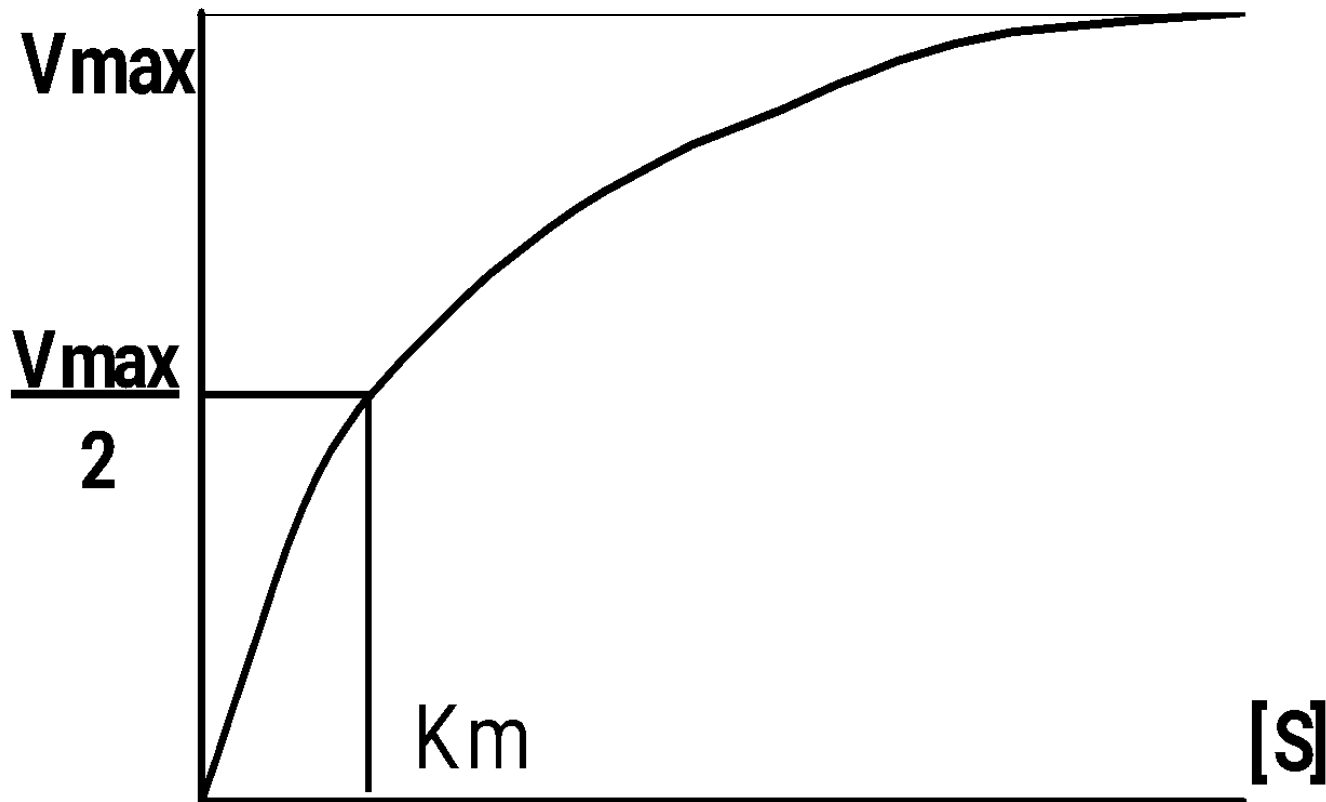
- Изменение концентрации H^+ меняет химический состав фермента, его строение и каталитическую активность.
- Изменение концентрации H^+ меняет химический состав субстрата, его строение и способность вступать в ферментативную реакцию.
- Денатурацией фермента при очень высоких или очень низких pH.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH



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

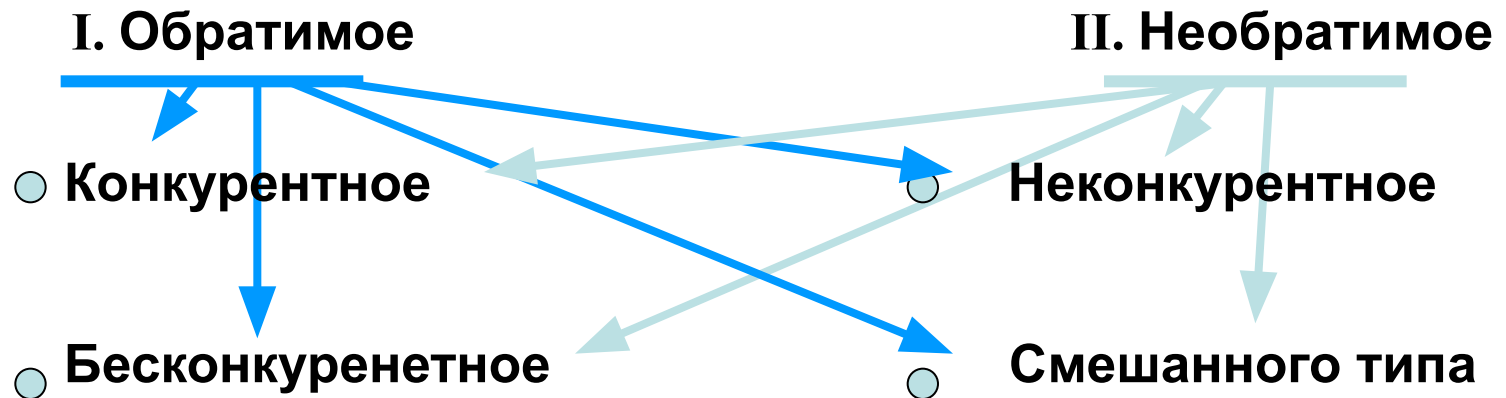
K_m – константа Михаэлиса

$[S]$ – концентрация субстрата

Влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативных реакций

Реакции ингибирования ферментативных процессов

ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ



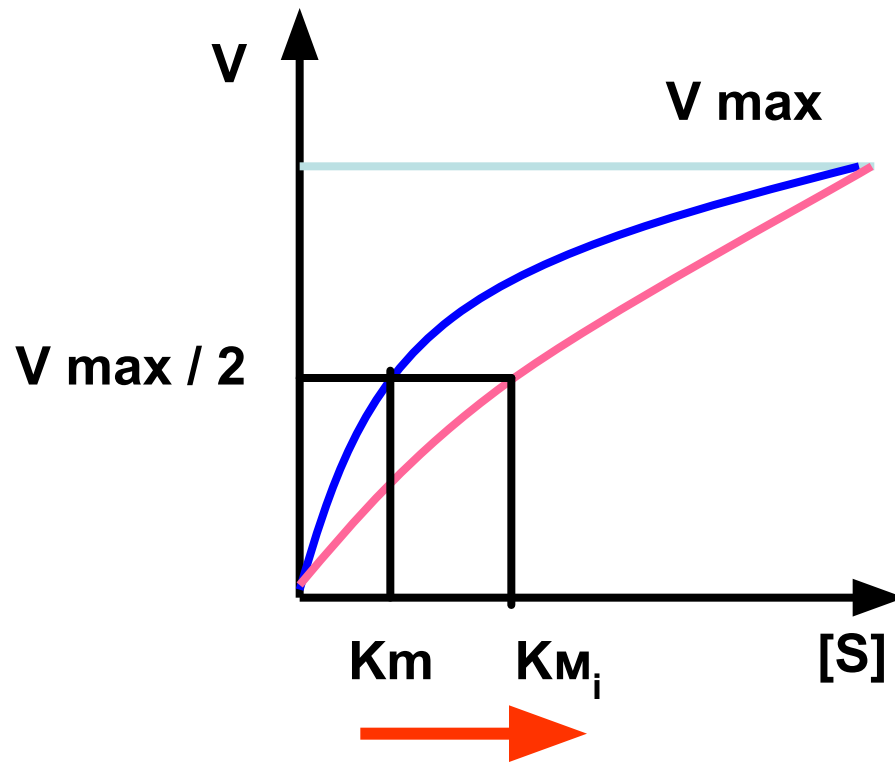
- Для определения обратимости ингибирования проводят диализ среды, где есть фермент и ингибитор.
- Если после диализа восстанавливается активность фермента, то ингибирование обратимое

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

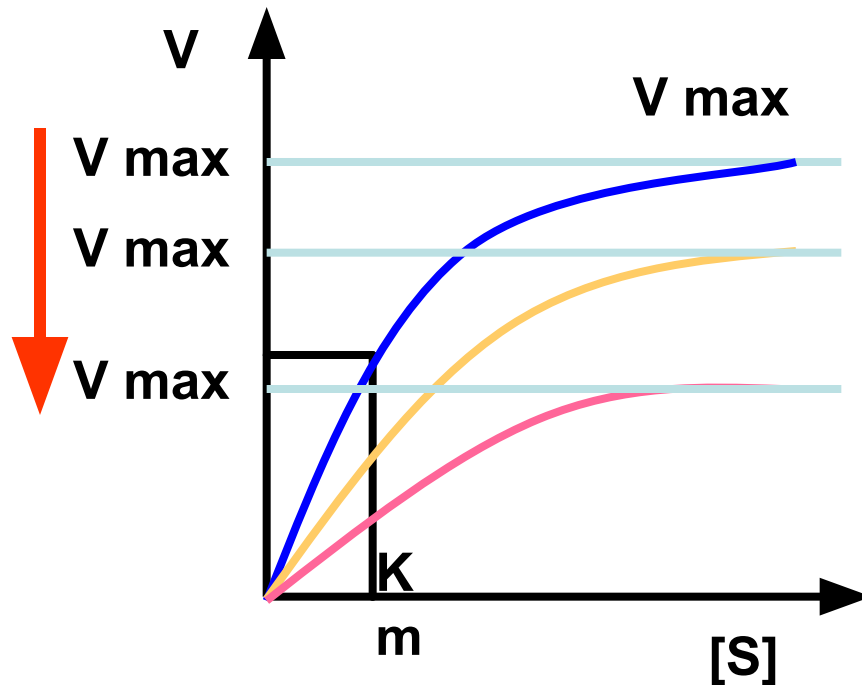
Конкурентный тип ингибирования

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

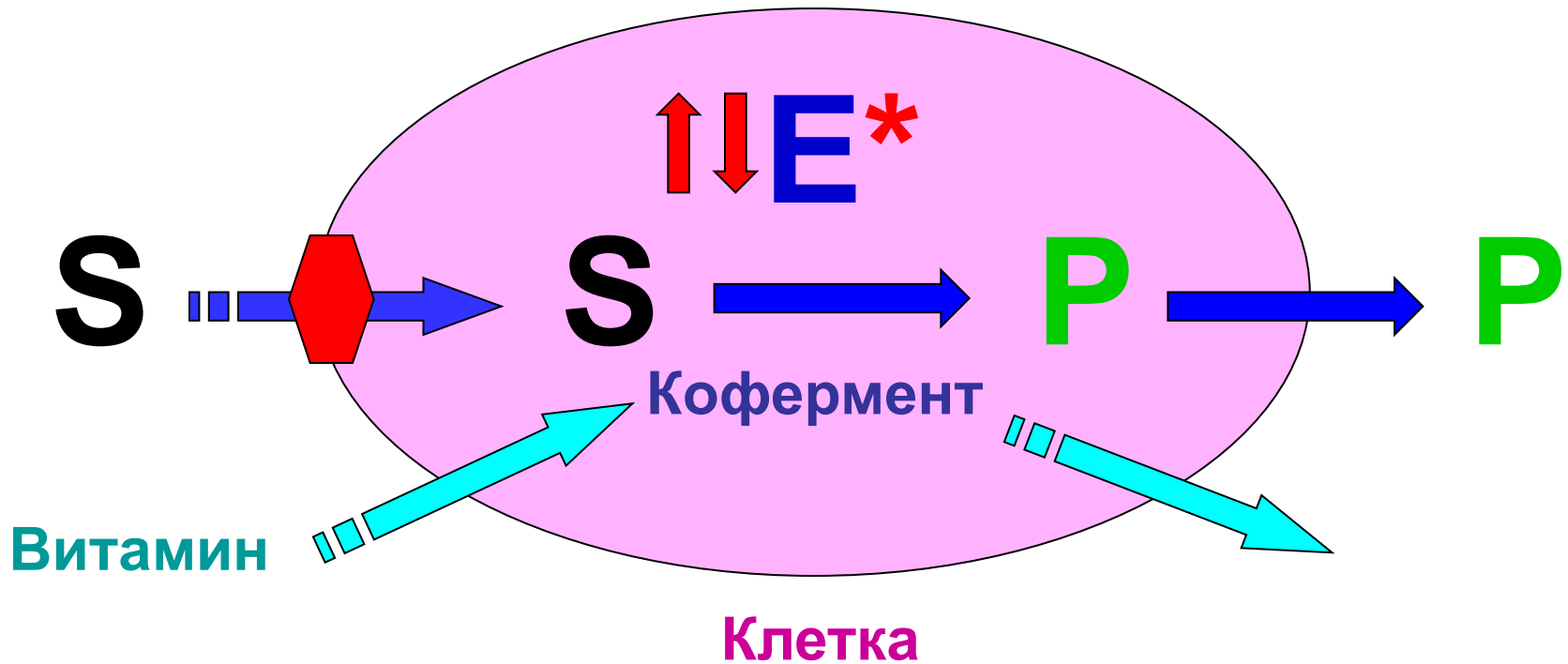


2. Регуляция скорости ферментативных реакций в организме

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

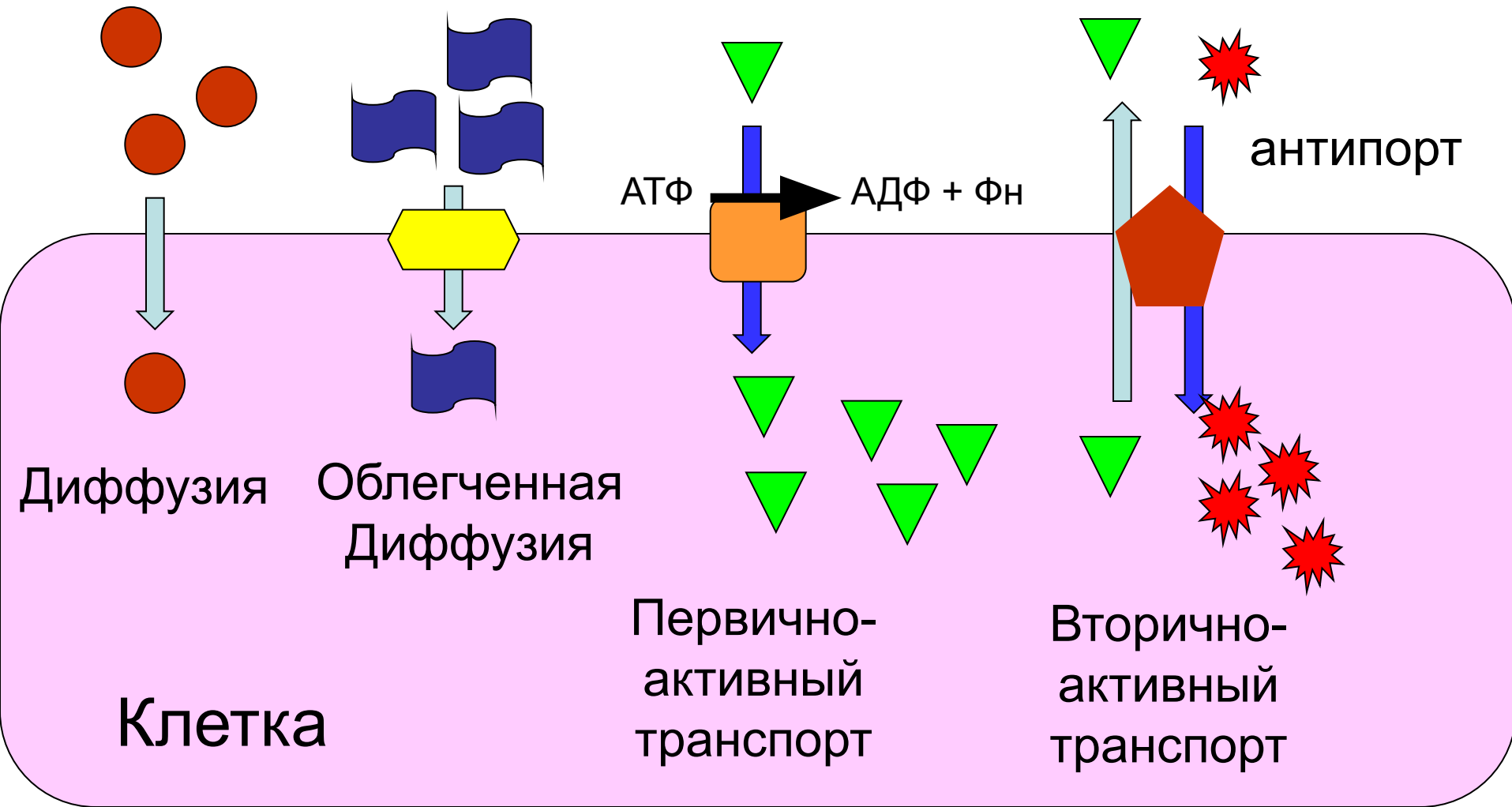
Гомеостаз в организме поддерживается за счет регуляции скорости ферментативных реакций, которая осуществляется за счет изменения:

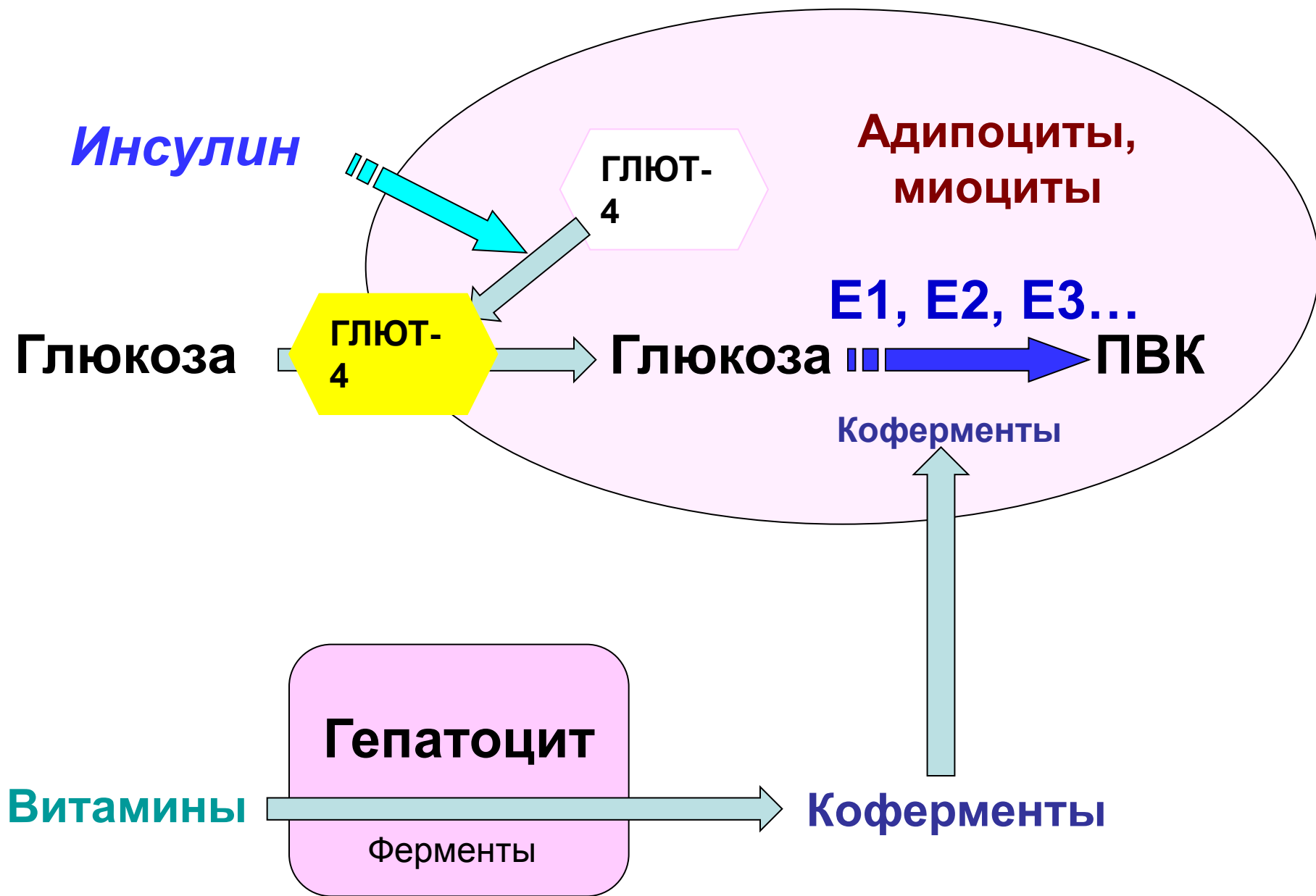
- I). Доступности молекул субстрата и кофермента;
- II). Каталитической активности молекул фермента;
- III). Количества молекул фермента.



I. Доступность молекул субстрата и кофермента

Транспорт веществ через мембрану

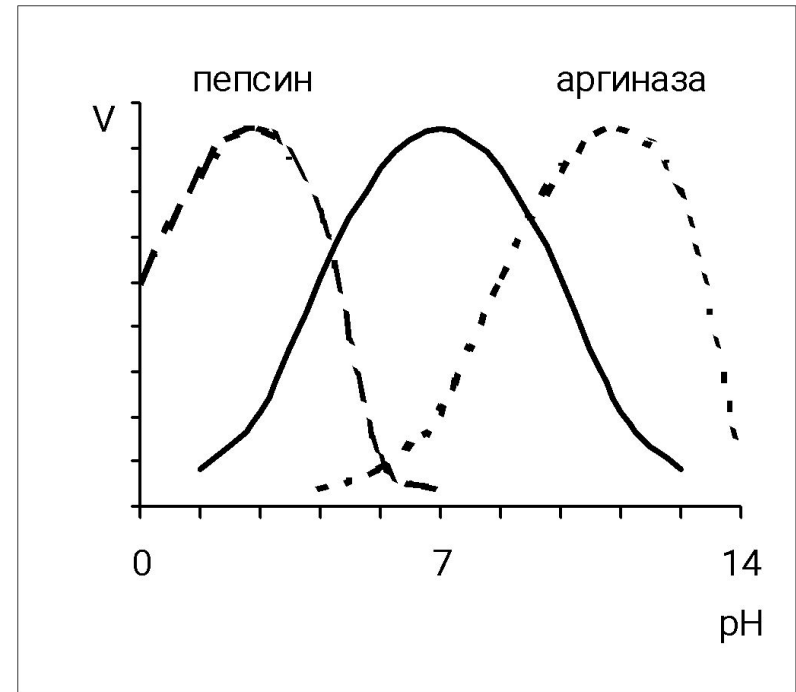
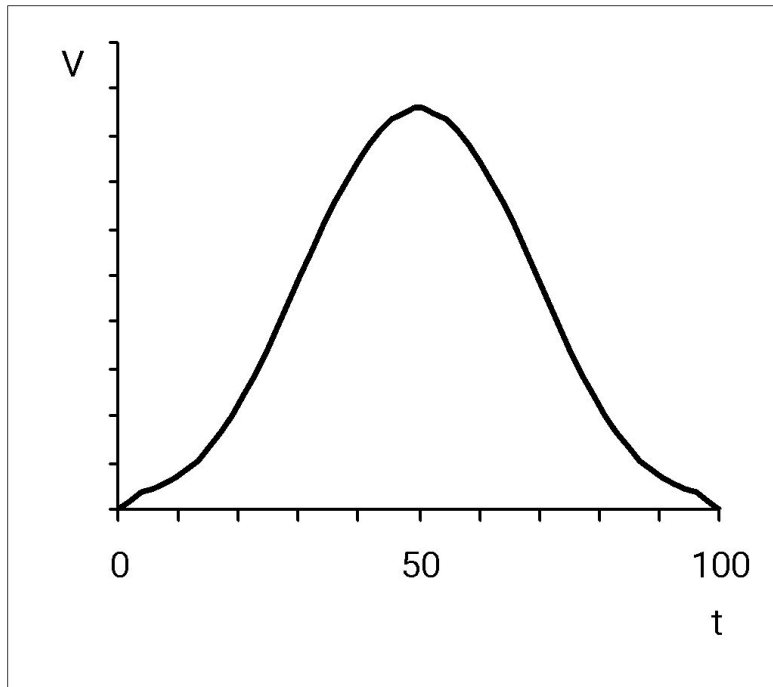




II. Регуляция каталитической активности фермента

Регуляция каталитической активности ферментов бывает:

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



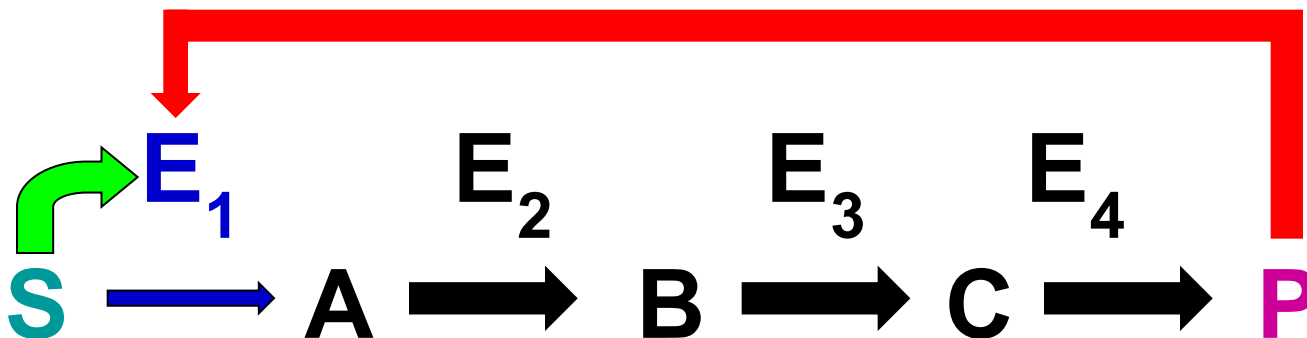
2). Специфической. Под действием специфических активаторов и ингибиторов изменяется активность регуляторных ферментов, которые контролируют скорость метаболических процессов в организме.

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.

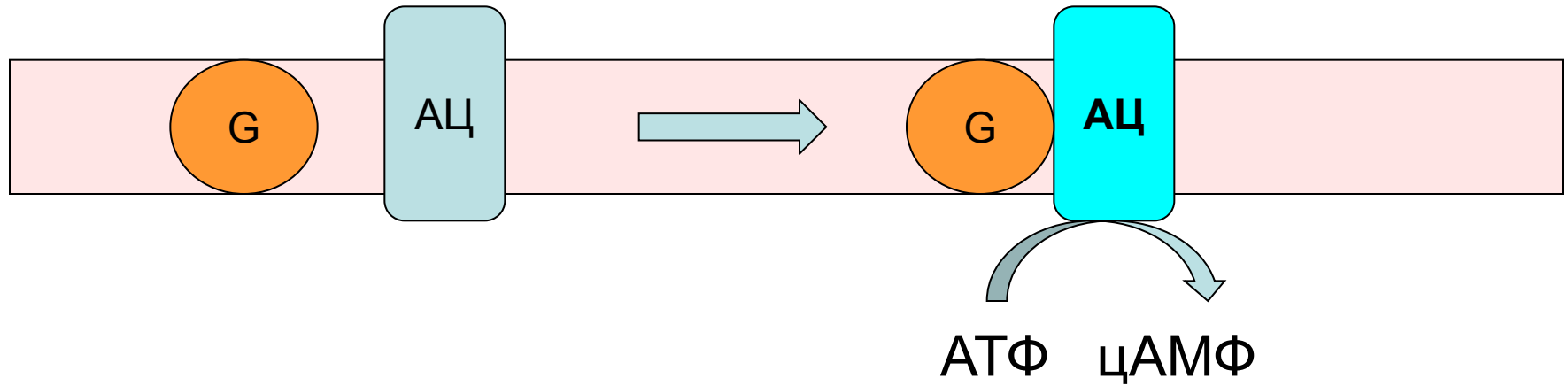


Активирование происходит по принципу прямой положительной связи, а ингибирование - по принципу отрицательной обратной связи.

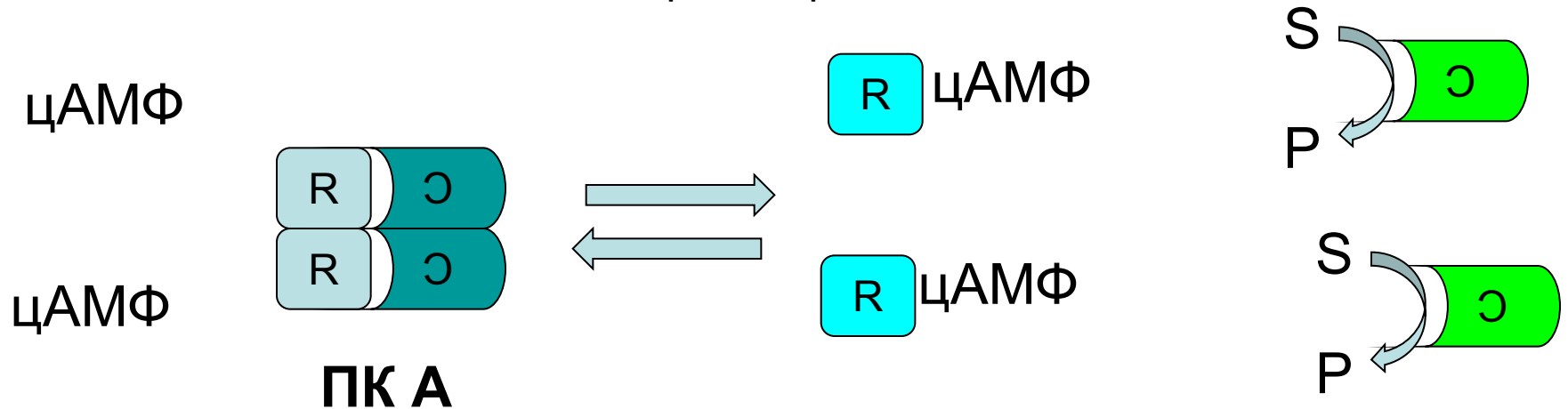
Активность аллостерических ферментов изменяется очень быстро

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

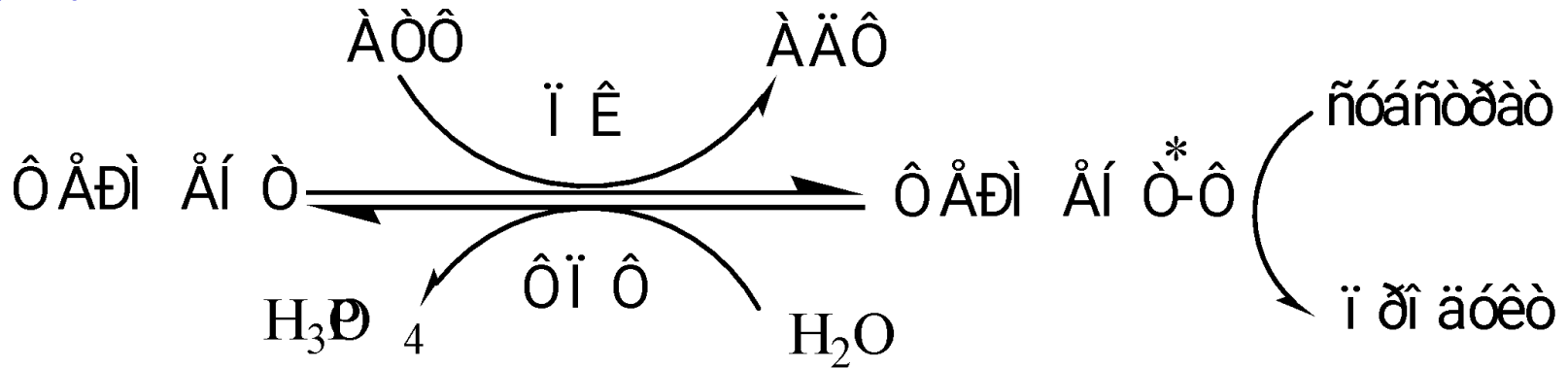


3). Регуляция каталитической активности ферментов путем их ковалентной модификации

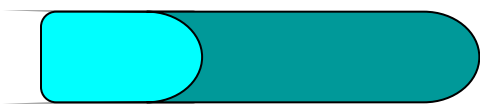
Регуляция активности фермента осуществляется в результате ковалентного присоединения или отщепления от него фрагмента.

Бывает 2 видов:

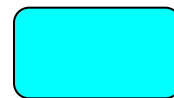
а). путем фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов; .



б). путем частичного протеолиза ферментов (внеклеточные)



Трипсиноген



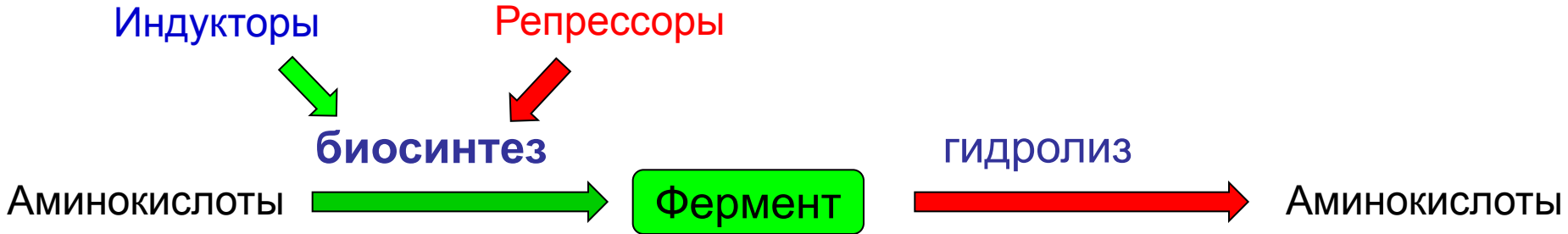
Субстрат

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 органические 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.

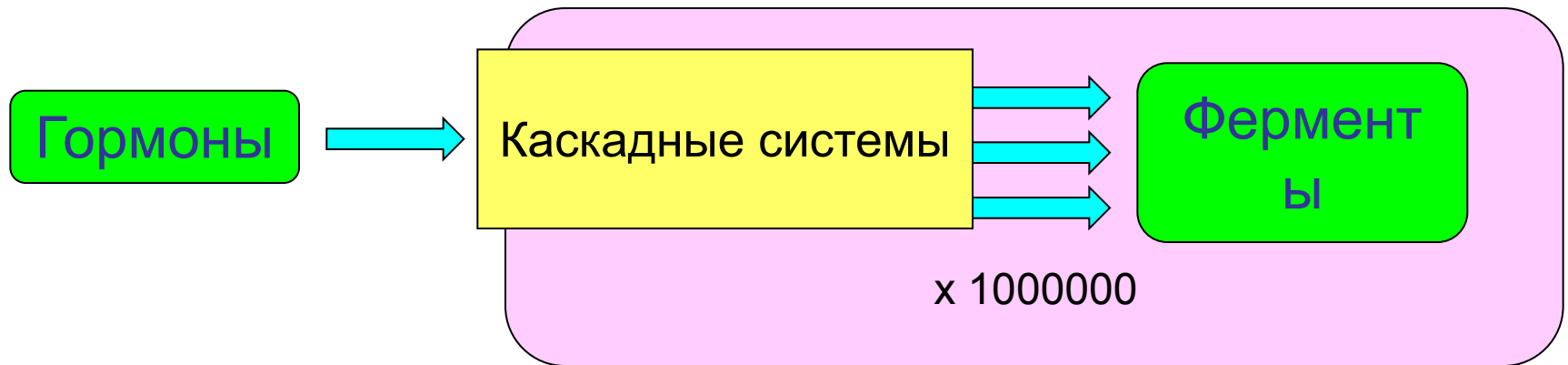
Гормоны по строению делятся: на

1. **белковые** (гормоны гипоталамуса, гипофиза),
2. **производные аминокислот** (тиреоидные, 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).

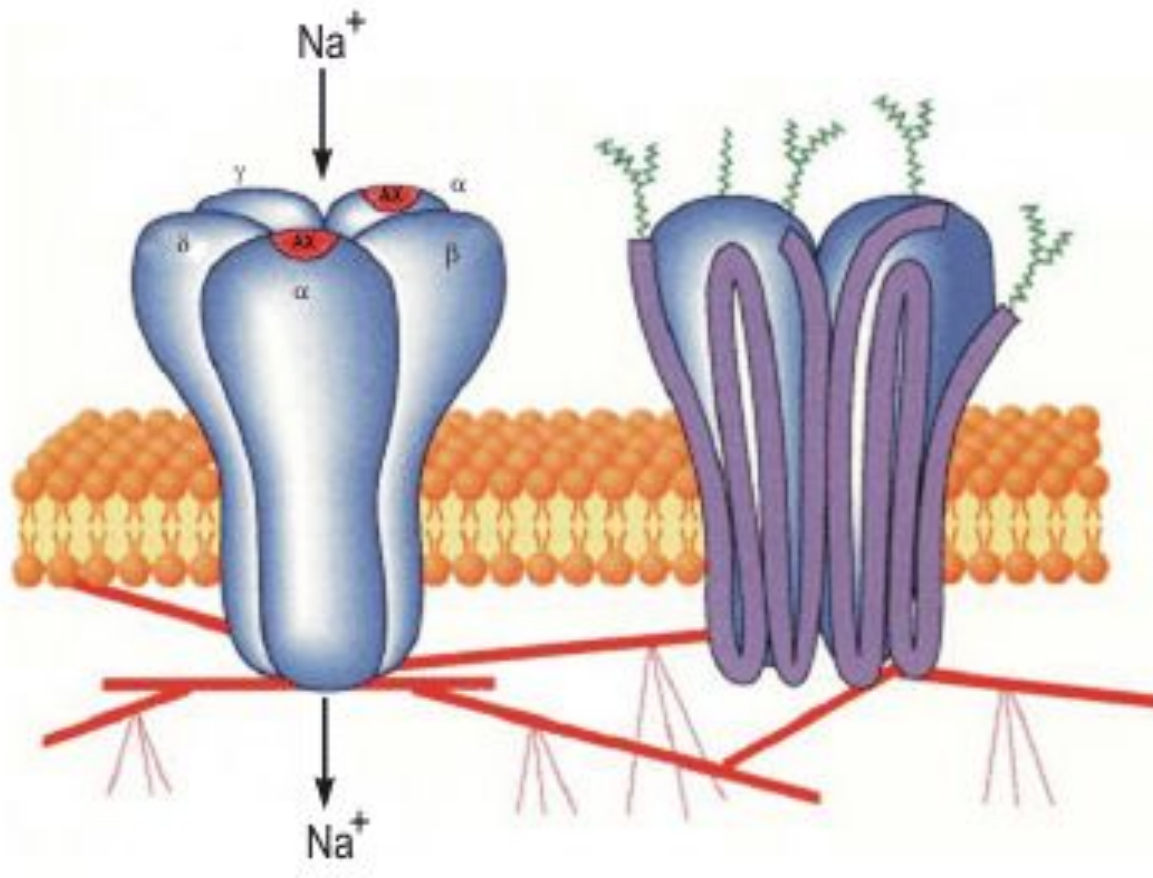
б). Рецепторы, с фосфатазной активностью (тирозиновые протеинфосфотазы) (например, ФПФ).

в). Рецепторы с гуанилатциклазной активностью (ГЦ).

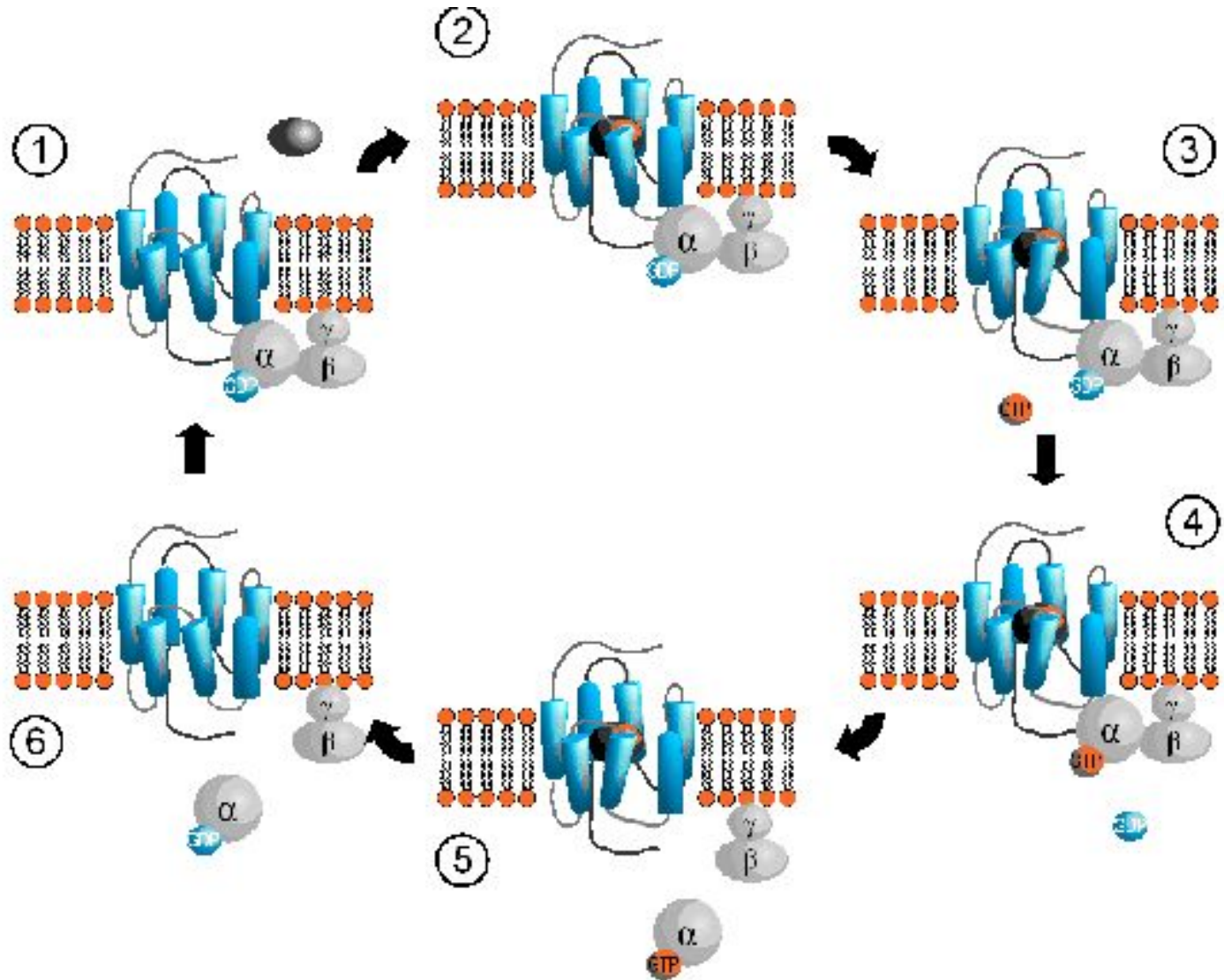
3). **Рецепторы, сопряженные с G-белками** по строению их еще называют **серпантинными**.

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

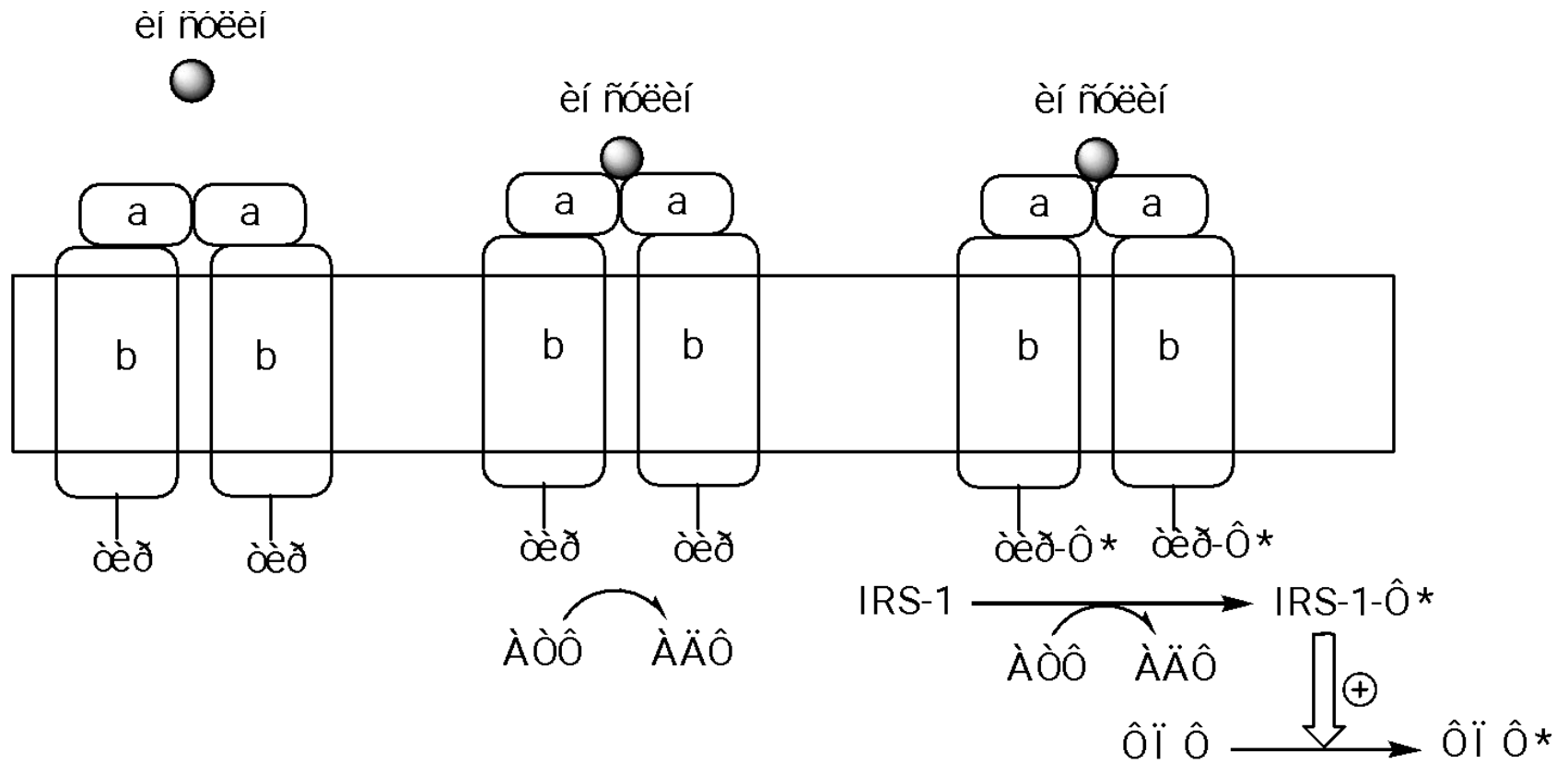
Рецептор, связанный с ионным каналом

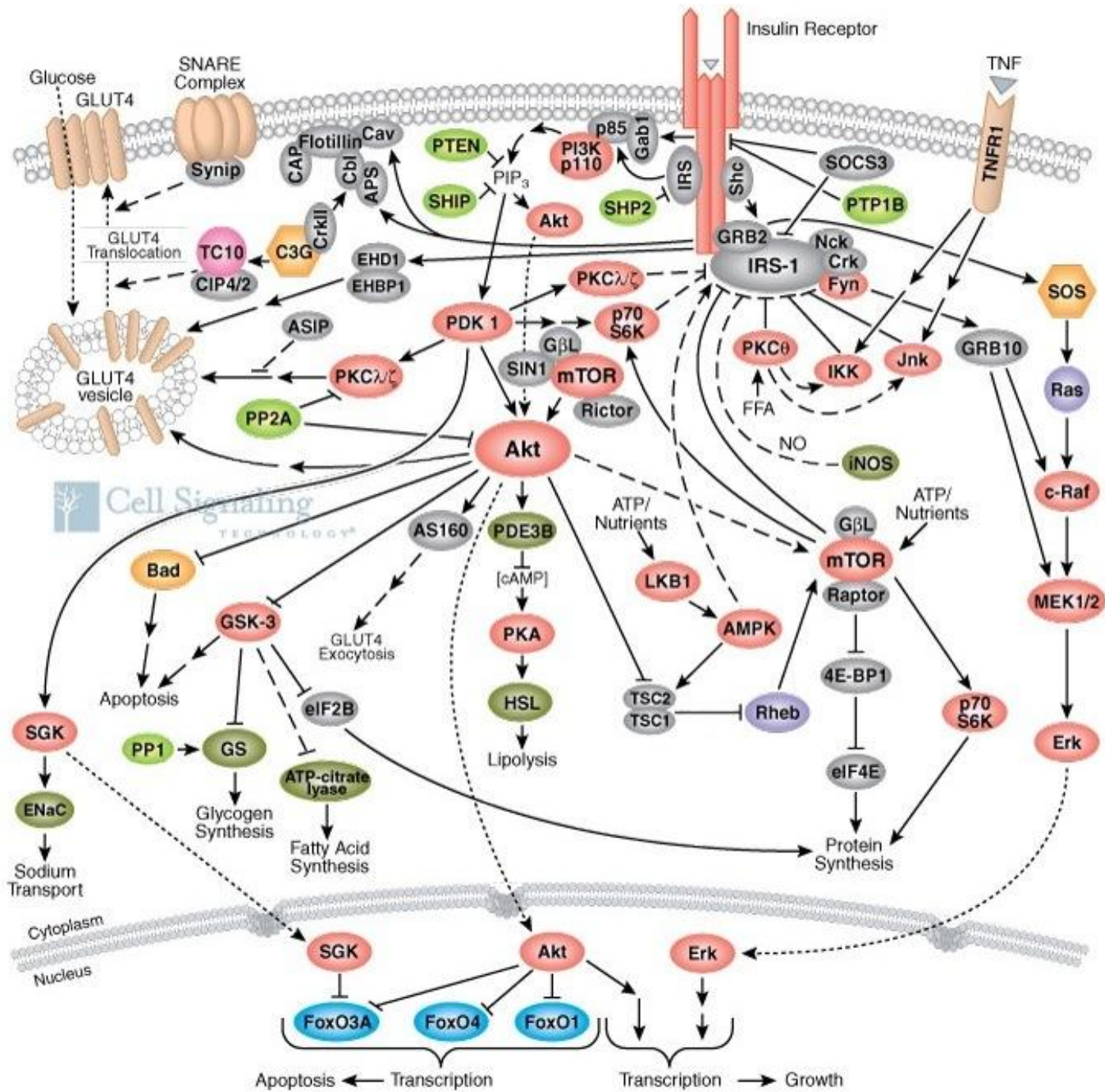


Работа рецептора связанная с G-белком (серпантинный)



Рецептор с ферментативной активностью (тирозинкиназный)





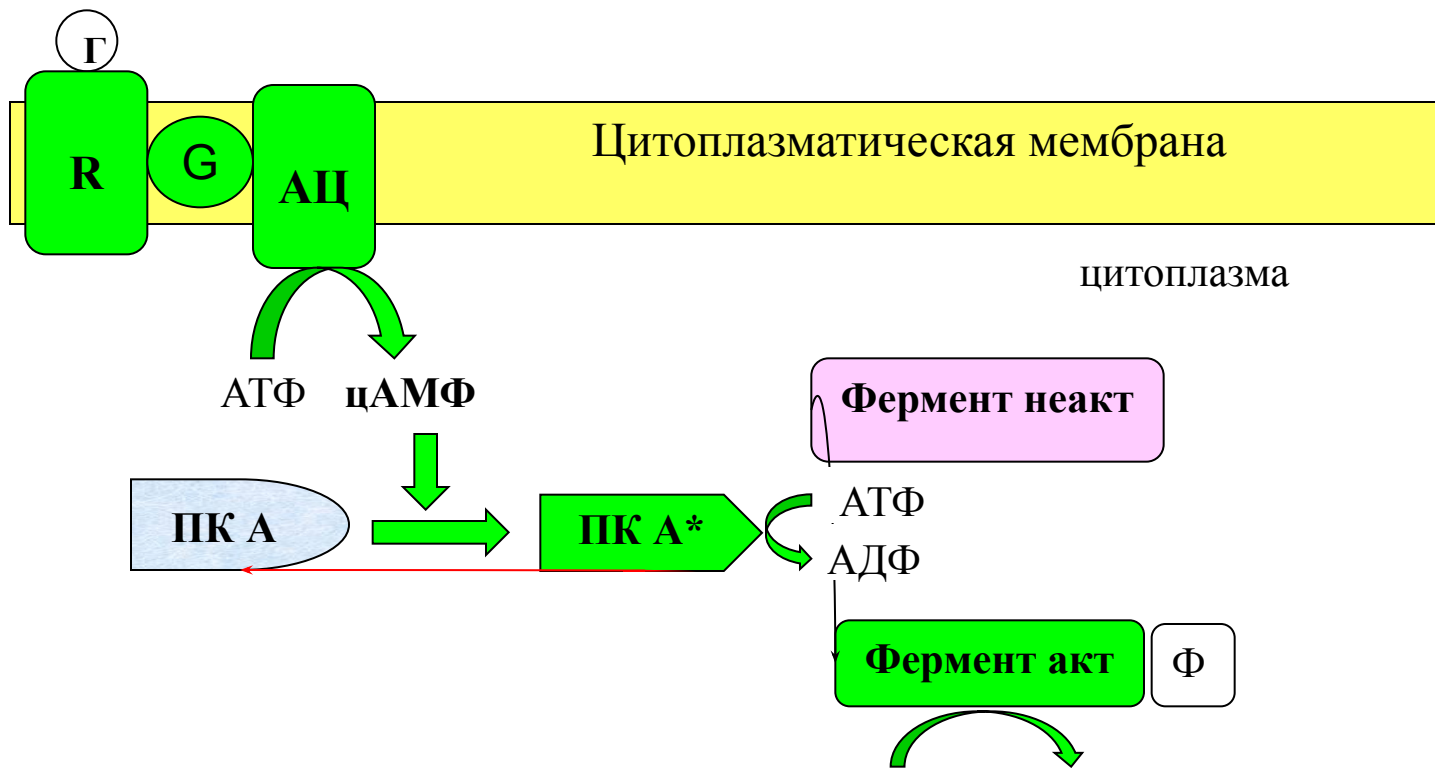
Apoptosis ← Transcription

Transcription → Growth

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

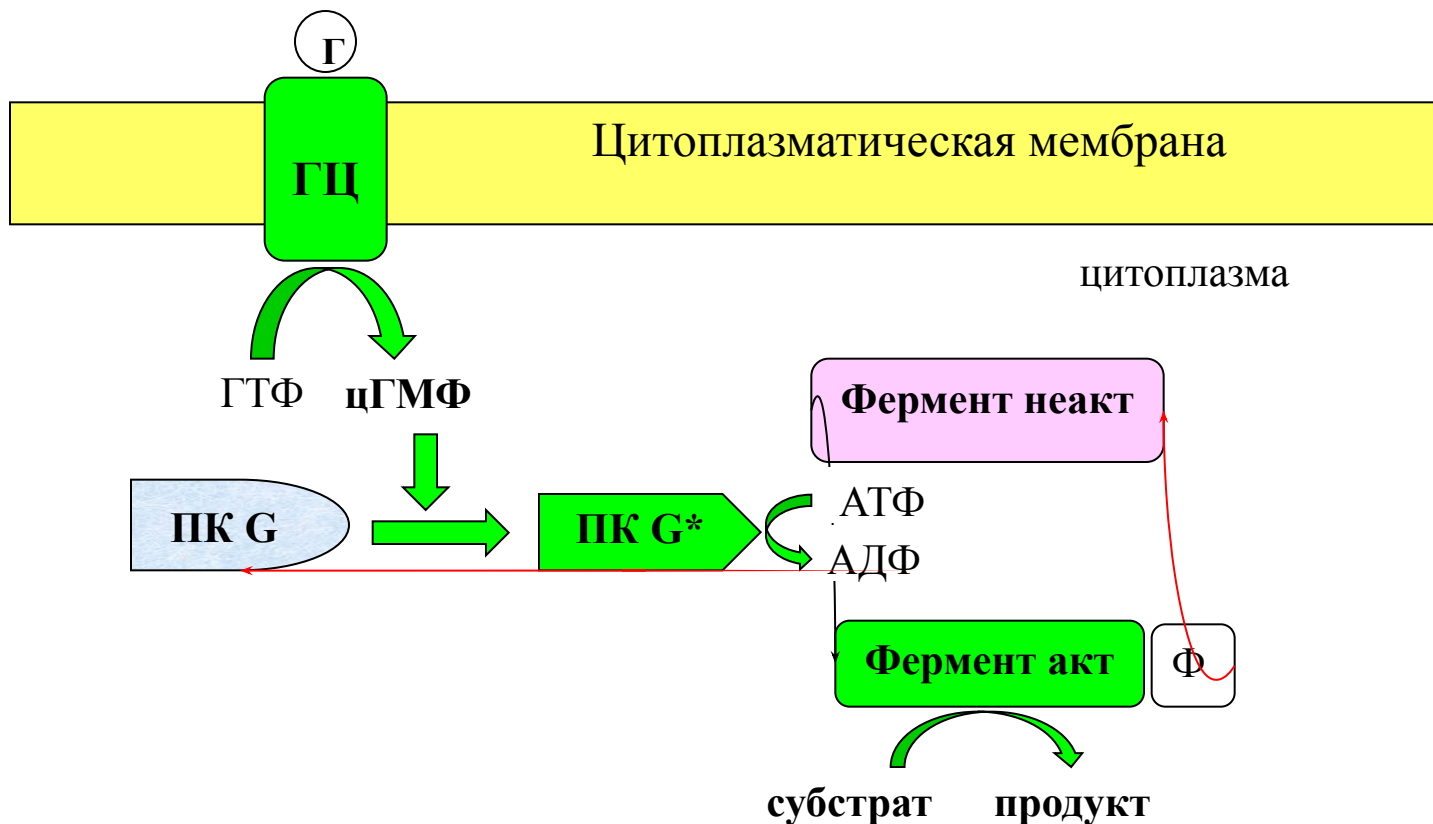


Имеются α - и β -адренэргические рецепторы. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах клеток. Имеются α - и β -адренэргические рецепторы в плазматических мембранах клеток печени, мышц.

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)

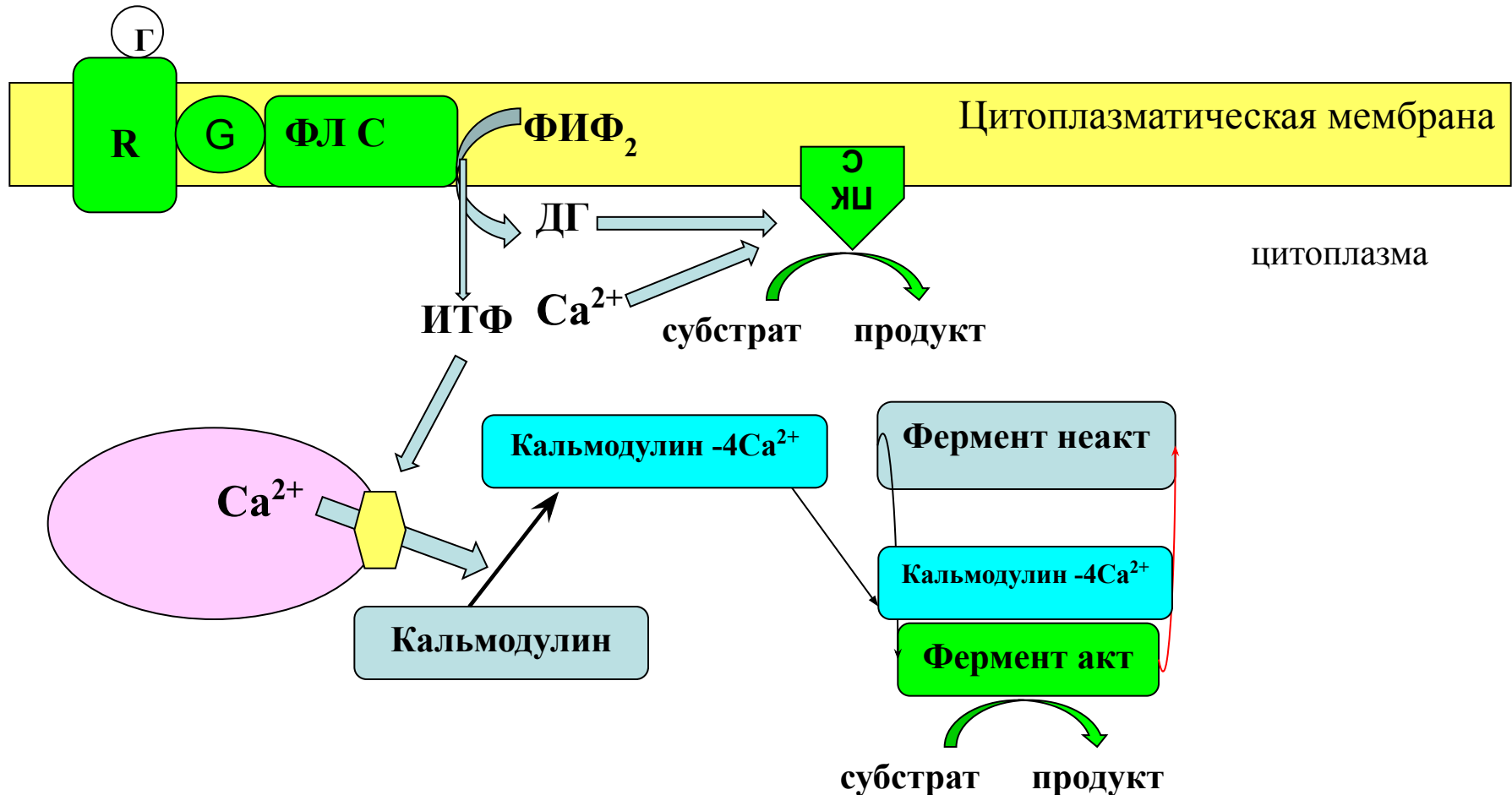


Гуанилатциклазная система функционирует в легких, почках, эндотелии кишечника, сердце, надпочечниках, сетчатке и др. Она участвует в регуляции водно-солевого обмена и тонуса сосудов, вызывает релаксацию и т.д.

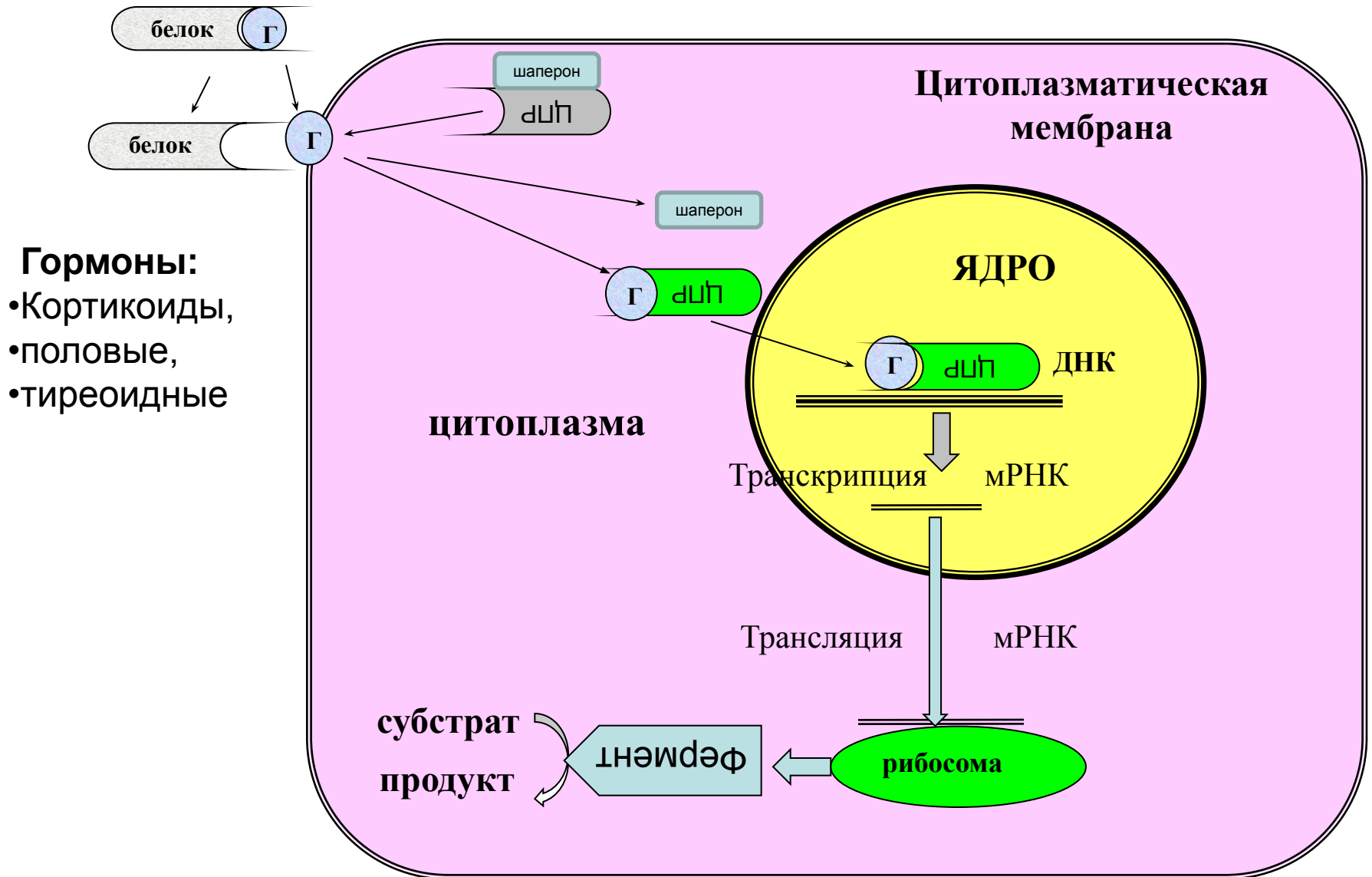
Инозитолтрифосфатная система

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!