

## Ферментативный катализ.

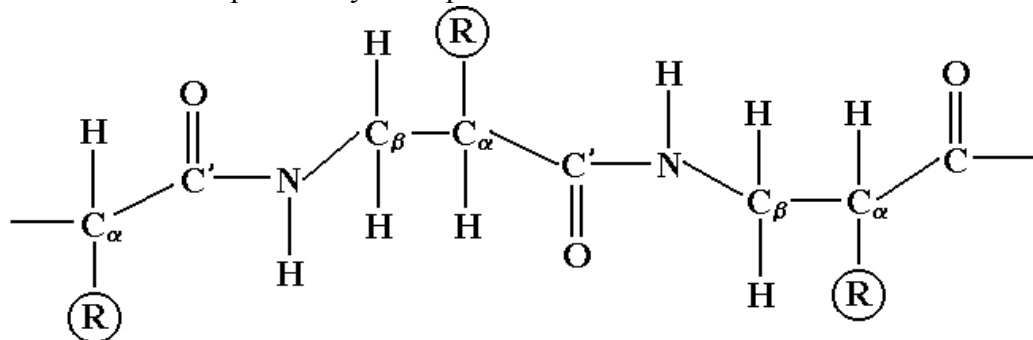
Ферментативный катализ нельзя отнести ни к гомогенному, ни к гетерогенному типам катализа. Хотя реакция проходит в растворе, но размеры молекул фермента таковы, что при рассмотрении ферментативного катализа надо учитывать адсорбцию реагирующих молекул и продуктов на поверхности белковой молекулы. Для данного типа катализа применимы все положения гетерогенного катализа, связанные с наличием активных центров на поверхности и спецификой их организации и взаимодействия с реагентами. Основное отличие от гомогенного и гетерогенного катализа состоит в том, что активность ферментов на несколько порядков больше, чем в катализе ионами и комплексами. Например, относительная константа скорости окисления ионом железа равна: в растворе соли 1, в комплексе  $10^3$ , в ферменте  $10^7$ .

Константа гидролиза мочевины  $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$  в кислом растворе при комнатной температуре равна  $7 \cdot 10^{-8}$  1/М.с, а с ферментом уреазы  $7 \cdot 10^{13}$  1/М.с.

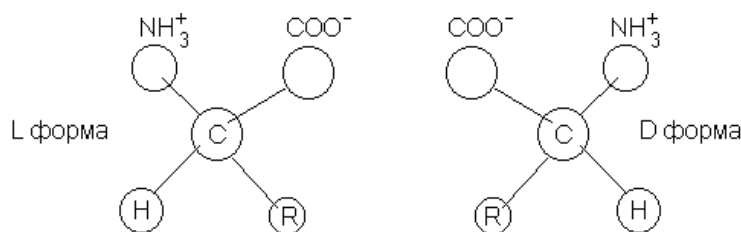
Фермент – закваска по латыни (брожение) (1857), греческий перевод - энзим (1878).

1713: Реомюр заметил ферменты: растворение мяса в желудочном соке, 1814: Кирхгоф: получил сахар из крахмала с вытяжкой ячменного солода, 1833: Персо выделил из солода фермент амилазу, 1909: Соеренсен ввел рН, 1926: Сампер получил кристаллы уреазы и показал, что ферменты это белки, 1952: гипотеза о трех уровнях организации белков, 1963: синтез инсулина, 1965: расшифровка структуры лизоцима, М 14600, 129 аминокислот. Сейчас идентифицировано около 100 тыс. белковых последовательностей. Причем все это многообразие создается всего 270 базовыми структурами. Известны структурные рентгеновские данные более чем для 5 тыс. ферментов, а у человека: около 80 тыс. ферментов.

- Основа фермента полипептидные цепи - белки. Первичной единицей является аминокислота  $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ . В белках (кроме глицина) один протон  $\text{CH}_2$  группы замещен на  $\text{R}_i$ . Появляется оптически активный центр: атом С. Все левые изомеры - L форма. Правые изомеры аминокислот геометрически не согласуются с парой адсорбционный и каталитический центры ферментов. Почему левые, не очень понятно, один вариант ответа (Полинг): цепочка из L форм легче закручивается в спирали. Ниже представлена гипотетическая цепочка аминокислот D конфигурации. Вращение по связям  $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$  достаточно свободно. Такая подвижность препятствует свертыванию цепей.

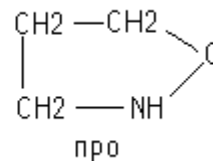
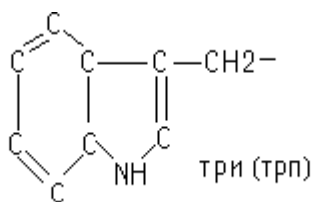
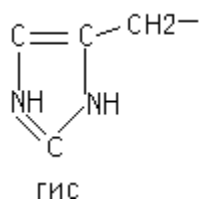


Новая гипотеза - образование цепей в цеолитах и там лучше именно левая форма. В Антарктиде нашли цеолит с хиральной стесмой пор и каналов, а японцы синтезировали такой цеолит. В природе L переходят в D форму. Для аспаргиновой кислоты точно известна константа скорости: на этом основана датировка костей. В Калифорнии нашли кости, возраст которых определили в 50 тыс. лет. В это время был мост Азия - Америка, т.е. человек пришел в Америку из Азии.



Соединение аминокислот дает полипептидную цепочку через концевые связи: - C (= O) - N (H) - . Всего для построения белков достаточно 20 аминокислот, отличающихся природой R : водород, метил, этил, изопропил, кислотные заместители -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, амины и гетероциклы с азотом, присоединенные через метил, тиоспирты, ароматические заместители. Всегда замещение через метил.

1. Нейтральные заместители: 7 (5 углеводов, 2 спирта)
  - глицин: H гли, аланин: CH<sub>3</sub> - ала, валин: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH- вал,
  - лейцин: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub> - лей, изолейцин: CH<sub>3</sub> -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)H - иле,
  - серин: HO-CH<sub>2</sub>- сер, треонин: HO-C(CH<sub>3</sub>)H – трео.
2. Кислые заместители: 2 + 2
  - аспаргиновая: HO - CO -CH<sub>2</sub>- асп, глутаминовая: HO - CO -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- глу,
  - если OH заменить на амин, то еще 2
  - аспаргин: NH<sub>2</sub> - CO -CH<sub>2</sub>- асп, глутамин: NH<sub>2</sub> - CO -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- глн,
3. Основные заместители: 3 (2 амина, 1 гетероцикл)
  - лизин: NH<sub>2</sub> -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- лиз, аргинин: NH<sub>2</sub>-C(=NH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- арг, гистидин: 5 членный N содержащий гетероцикл - гис.
4. Серосодержащие заместители: 2
  - цистеин: HS -CH<sub>2</sub> - цис, метионин: CH<sub>3</sub>-S-CH<sub>2</sub>- мет.
5. ароматические заместители: 3
  - фенилаланин: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub> - фен, тирозин: фенильное кольцо-CH<sub>2</sub>- в пара-положении к OH - тир, триптофан: бициклический N содержащий гетероцикл - три (трп).
6. насыщенный N содержащий гетероцикл: пролин, про.

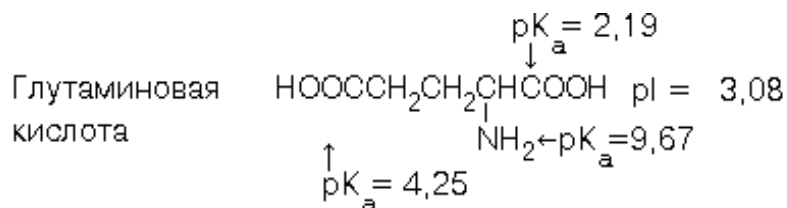
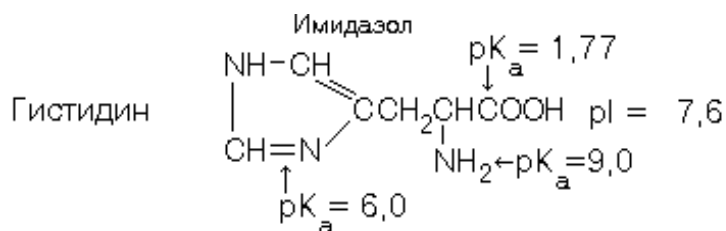
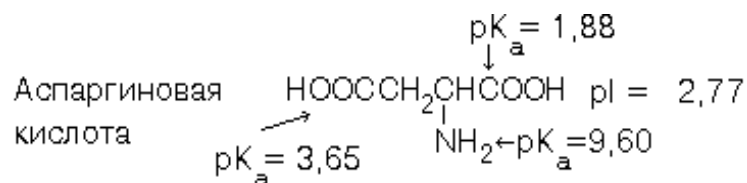
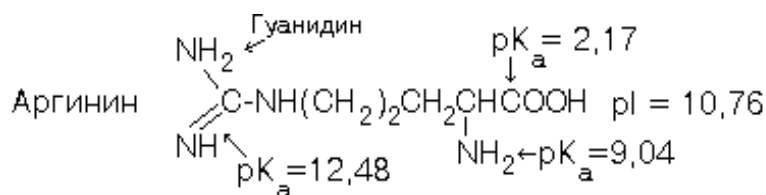


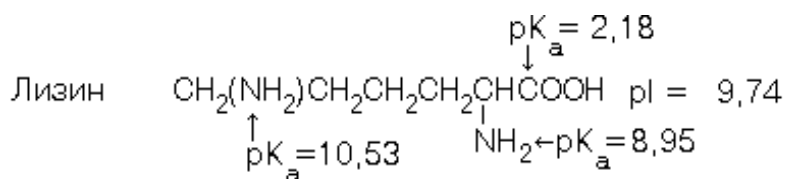
•

Т.е. есть центры катализа: кислотные группы, центры основности: азот, и OH и SH - центры образования водородных связей.  $\alpha$  - Химотрипсин: C 1105, H 1732, O 344, N 300, S 12. Цепочка из 241 аминокислоты. Интересно, что при большом количестве ферментов природа активных центров достаточно ограничена. Так в известных сейчас 1500 гидролазах активными центрами являются только 4 группы: имидазол + карбоксильная группа, 2 карбоксила, ионы  $Zn^{2+}$  или  $Co^{2+}$  с 4 лигандами (3 аминокислоты и обязательно вода), ионы  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  с 4 лигандами (3 молекулы воды и аминокислота).

Наличие различных по своей природе кислотных или основных групп в составе аминокислоты обуславливает наличие нескольких значений  $pK_a$ , характеризующим ионизацию:

### Кислотные свойства аминокислот:





Отличаются у аминокислот и значения изоэлектрической точки аминокислот pI (равенство концентрации анионов и катионов).

Если цепочка из 100 аминокислот, то вариантов разного расположения 20 аминокислот может быть  $20^{100} \approx 10^{130}$  вариантов, чтобы их реализовать надо  $10^{78}$  D, а вся масса земли  $10^{51}$  D.

Первичная структура: организация цепочки из разных аминокислот, чаще транс - ориентация разных фрагментов,

вторичная:  $\alpha$  спирали, петли, складки ( $\beta$  слои),

третичная: спираль сворачивается в глобулы,

четвертичная ( не всегда) соединение двух - трех цепочек в жгут.

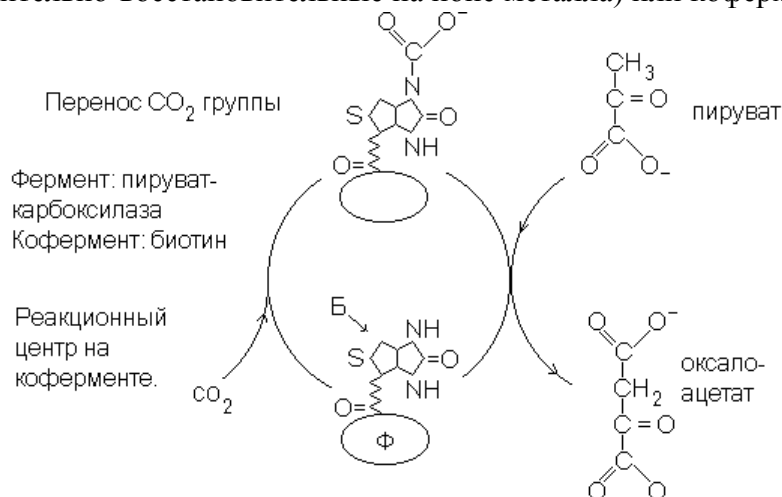
Основную роль в образовании вторичных структур играют водородные и S-S связи. Такая структура определяет заданность в расположении потенциально активных групп. Полярные группы, как правило, наружу глобулы, неполярные: внутрь. Связи, соединяющие пептидные цепочки, непрочны, поэтому понятно, что белки денатурируют (теряют активность) при повышении температуры.

Отсутствие каталитически активной формы фермента может вызывать серьезные нарушения жизнедеятельности. Известна особая чувствительность к алкоголю у представителей азиатской расы. Объясняется это тем, что при окислении этилового спирта сначала алкоголь дегидрогеназа превращает его в альдегид, а затем альдегид дегидрогеназа окисляет далее в ацетат. Этот последний в цепочке превращений фермент существует в двух формах, обладающих разной активностью (малое и большое значение константы Михаэлиса). Форма, имеющая малое значение константы Михаэлиса, будет более активна в превращении альдегида. Как правило, у представителей азиатских народов такого фермента мало. Поэтому не превратившийся в мало вредный для организма ацетат (уксус) альдегид вызывает у таких лиц покраснение лица и тахикардию.

Чаще фермент не просто белок, а соединение белка (апофермент, ферон) с коферментом (витамины, нуклеотиды) или с кофактором ( ион переходного металла, железопорфириновые комплексы). Часто коферментами называют и кофакторы. Кофакторы и коферменты (агон) имеют две функциональные группы: связь с белком и субстратом, как правило, легко отделяются. Прочно соединенные группы называют простетическими группами.



Реакции могут проходить не на белке ферменте, а на центре, образованном кофактором (окислительно-восстановительные на ионе металла) или коферментом:



По типу реакций ферменты делятся на 6 классов:

1. окислительно-восстановительные (оксиредуктазы),
2. перенос водорода (трансферазы),
3. гидролиз (гидролазы),
4. перенос  $\text{OH}$  (лиазы),
5. изомеризация (изомеразы),
6. синтез (лигазы).

Для упорядочения ферментов по свойствам введены понятия: природа превращаемого субстрата - подкласс, под - подкласс: природа взаимодействия фермент - реагент. Отсюда Международная система классификации: рибонуклеазу обозначают как КФ 2.7.7.167. Последняя цифра номер фермента в систематике.

Пример: КФ 1.2.3. и номер фермента

1. оксиредуктазы
2. действует на  $\text{CH}_2$  -  $\text{OH}$  донора,
3. акцептором служит НАД,

Кроме того, на активность фермента влияют эффекторы: промоторы и ингибиторы. Активаторы влияют на максимальную скорость. Природа эффекторов часто аналогично природе субстрата. Часто это протон, ионы металлов. Ингибиторы подавляют активность центра за счет блокировки или индукционного влияния по цепочке.

Единица количества фермента (Е): количество фермент - препарата, ускоряющее превращение (превращающее) 1  $\mu$ моля субстрата за 1 минуту при 25°C, оптимальном содержании субстрата и оптимальном pH.

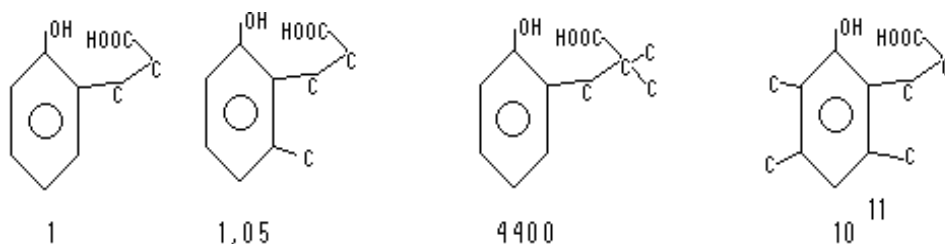
Содержание фермента в препарате: количество фермента в 1 мг. белка. Но его определять трудно. Поэтому введена молекулярная активность: количество молекул субстрата, превращающееся в 1 мин. под действием 1 молекулы фермента, при оптимальной концентрации субстрата. Так для каталазы (Fe + порфирин) молекулярная активность 2,5 - 5.10<sup>6</sup>. Но пепсин = 20.

#### Особенности действия ферментов как катализаторов.

1. Для заметного ускорения реакции достаточно малых количеств фермента: обычно используемые концентрации 10<sup>-7</sup> – 10<sup>-9</sup> моль/л. Для сравнения приведем концентрации соляной кислоты, обеспечивающие определенное значение pH: 0,1 н – 1,1, 1.10<sup>-5</sup> – 5.
2. Константы скорости протекающих с участием ферментов реакций существенно больше по величине в сравнении с обычными катализаторами. Так гидролиз мочевины в присутствии уреазы уже при 25°C протекает с константой скорости 5.10<sup>6</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, а в кислом растворе даже при 62°C значение константы скорости составляет только 7,4. 10<sup>-7</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>.
3. Высокая селективность протекающих процессов: при высокой активности уреазы в гидролизе мочевины она совершенно не активна в гидролизе других амидов, не отличающихся по реакционной способности.
4. С повышением температуры выше определенного предела (обычно около 40 °C) активность ферментов резко уменьшается.

#### Причины ускорения.

1. Эффективное увеличение концентрации и ориентация: фактор ускорения 10<sup>2-3</sup>. Ориентация геометрии и орбиталей. Препятствие вращению: так в дегидратации сравнительная величина константы:



Введение заместителей затрудняет вращение COOH и увеличивает относительную скорость дегидратации. Подобно и в ферментах. При этом обычно множественное связывание молеку-

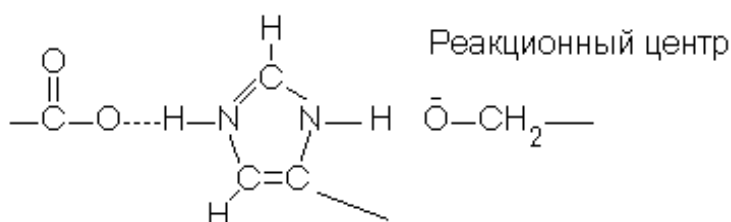
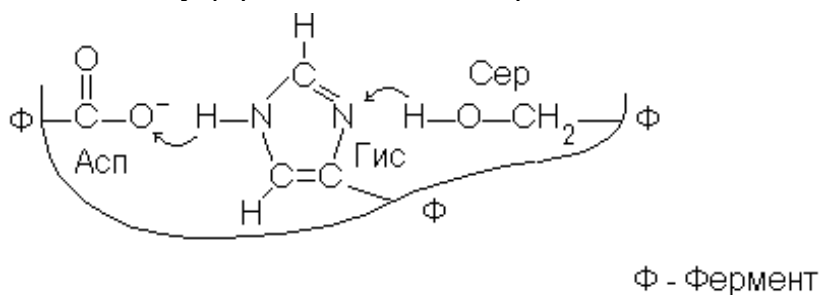
лы субстрата с ферментом.

2. Снятие запрета по заряду:  $\text{SSO}_3^- + \text{CN}^-$  плохо, т.к. будет отталкивание частиц. А с ферментом  $\text{E} + \text{SSO}_3^- \rightarrow \text{ES} + \text{SO}_3^{2-}$  и  $\text{ES} + \text{CN}^- \rightarrow$ , т.е. уже нет отталкивания. Так осуществляется перенос серы в трансферазе. Такой эффект аналогичен действию комплексов. При этом также может быть снятие запрета по спину.

3. Поляризация субстрата: ускорения  $10^3$ . Искажение углов и длин связей в молекуле.

Аналогично действию металло - комплексов. Неполарное окружение может увеличить скорость.

4. Изменение свойств среды (влияние на кислотно-основные свойства, изменение коэффициента активности). Значение диэлектрической проницаемости вблизи активного центра  $\alpha$ -химотрипсина меньше 10, а в чистой воде – 80. Может уменьшаться полярность среды около субстрата и расти около центра. Растет микровязкость в области активных центров. За счет таких эффектов фактор ускорения может достигать значения  $10^5$ . Изменение свойств кислоты, входящей в цепочку ферментативного центра.



5. Аспаргин активирует инертный серин, после чего новый центр на серине способен образовывать ковалентную связь: механизм гидролиза пептидной связи в аминокислотах.

6. Стабилизация активной формы субстрата и дестабилизация преобразуемой группы субстрата. Типа комплекса Михаэлиса.

7. Бимолекулярный процесс заменяется мономолекулярным. Существенное влияние энтропийного фактора: потеря энтропии на стадии связывания субстрата, а превращение в АК уже может быть с выигрышем энтропии. Так перенос ацетильной группы характеризуется уменьшением энтропии на 150,8 э.е., а в ферменте только на 56,3 э.е. Выигрыш в скорости 24 порядка.

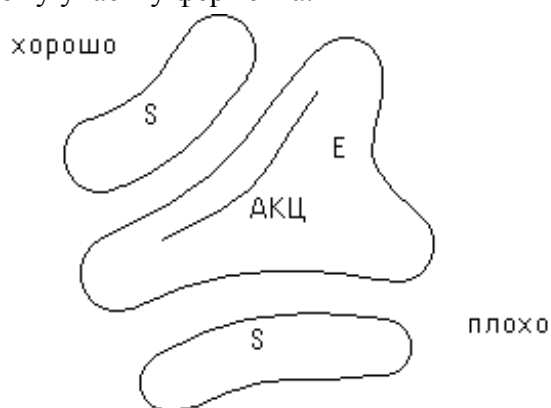
8. Полифункциональность: совместное действие  $\text{OH} + \text{Металл}$ . Собственно образование АК: комплекс Михаэлиса.

9. Кооперативность: субстрат, адсорбированный на соседнем центре, усиливает действие собственно каталитического центра. (Но может быть и ингибирование по такому же механизму). Сейчас принято считать это явление основной причиной высокой активности ферментов. При этом энергия, выделяющаяся в ходе химической реакции (рекуперация энергии) может сохраняться на молекуле белка: изменение геометрии или частичное энергетическое возбуждение внутренних степеней свободы.

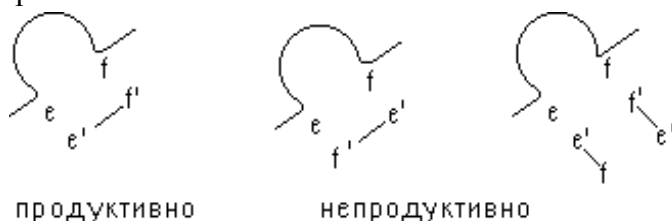
Если сгруппировать:

- сорбция, сближение и ориентирование, образование комплекса Михаэлиса: Фактор ускорения до  $10^7$ .
- полифункциональность: Фактор ускорения до  $10^3$ .
- изменение свойств реагента и среды: Фактор ускорения до  $10^5$ .

Особенности ферментов: структура достаточно жестко задана, что определяет некоторые особенности взаимодействия. Эффективность связывания зависит от ориентации к определенному участку фермента.



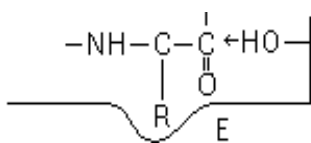
При ориентации в нужном месте фермента может быть неправильная ориентация около центра.



Здесь  $e$  и  $f$ : два участка, образующих АКЦ фермента,  $e'$  и  $f'$ : соответствующие участки молекулы, при наложении которых на фермент проходит реакция. Это вероятный механизм ингибирования субстратом. Понятно, что это легче, когда субстрата много. Непродуктивное связывание может проходить с той же энергией активации.

Специфичность фермента объясняют моделью ключ - замок (Фишер). При этом существенную роль играет множественное связывание: два участка молекулы связываются с разными, но определенным образом расположенными центрами в структуре фермента:

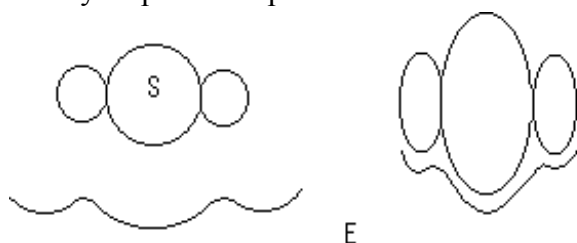




Здесь приведена схема расщепления белковых молекул протеазой. В структуре белка образуются полости, соизмеримые с размерами молекул. Так в циклоамилозах диаметр полости равен 4,5 – 8,5 А , а глубина около 7 А. Т.е. не всякая частица способна проникать в полость. Все это напоминает энергетическое и геометрическое соответствие по Баландину и катализ на цеолитах.

### Комплементарность.

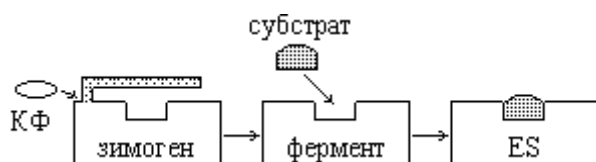
Поскольку полипептидная цепочка все-таки гибкая и превращающиеся молекулы, как правило, органические цепочки, то могут быть заметные изменения структуры, как катализатора, так и субстрата. Энергия такого состояния выше.



Такой эффект обозначают как индуцированное соответствие по Кошланду (динамическое соответствие). Свободная энергия связывания фермент-субстрат порядка 10 – 20 ккал/моль. Большая часть идет на катализ, а на индуцированное соответствие 5-7 ккал/моль.

Изоэлектрическая точка белка: рН таково, что в электрическом поле нет движения частиц, сумма положительных зарядов равна сумме отрицательных. Положение изоэлектрической точки зависит от констант ионизации кислоты и основания. Альбумин 4,71, гемоглобин 6,87, цитохром С 10,60.

Другой особенностью ферментов является то, что возможны механизмы, в которых фермент предварительно должен перейти в активную форму или присоединяя (например, протон) или теряя атом или группу атомов, блокирующих активный центр. Ниже схематически приведена схема активации неактивной формы фермента (зимоген) под действием другого, контролирующего активность фермента (КФ).



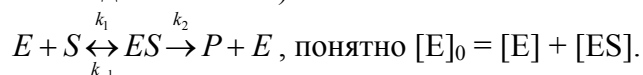
Возможны случаи, когда активным будет агрегат из нескольких молекул фермента. С другой стороны, связывание другой какой-либо молекулы рядом с каталитически активным участком поверхности может подавить активность фермента, поскольку напряжение переда-

ется по цепи: аллостерическое ингибирование.

## Кинетика ферментативных реакций.

Описание кинетики ферментативных реакций должно объяснить ряд экспериментальных факторов. Еще в 1880 г. О'Сулливан и Томсон и в 1892 г. Браун нашли, что зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации, как правило, имеют не второй порядок, но ES образуется. В ряде случаев ES обнаружили спектроскопическими методами анализа (лактатдегидрогеназа с НАД образует никотинамидаденин динуклеотид). Скорость меняется и достигается предел при некоторой концентрации субстрата. Субстратное насыщение и отравление: скорость перестает расти и даже падает при увеличении концентрации [S]. Скорость зависит от pH среды. С температурой наблюдается рост скорости, но потом падение. При этом нашли, что фермент-субстратный комплекс может выдержать температуру на 25°C выше, чем фермент - идеология иммобилизации ферментов, но об этом позже.

Схема Анри (1902-3) и Михаэлис-Ментен (1913). Идея, лежащая в основе кинетического вывода: образование фермент-субстратного комплекса в обратимой стадии и необратимый его распад в продукты. Строго их вывод не верен: предполагалось равновесие на первой стадии, а в таких реакциях этого нет. Но можно использовать квази стационарность при малом значении константы второй стадии по сравнению с константами образования и распада ES (Бриггс и Холдейн -1925 г.).



$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \{ [E]_0 [S] - [ES][S] \} - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad [ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}. \text{ И скорость превращения в продукт: } r = k_2[ES] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2[E]_0}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} [S], \text{ где } (k_{-1} + k_2)/k_1 = K_M - \text{ кон-}$$

станта Михаэлиса. При  $[S] \gg K_M$  получим предел скорости  $r_{\text{макс}} = V = k_2[E]_0$ . При  $[S] = K_M$  очевидно  $r = 0,5 r_{\text{макс}}$ . При малых временах проведения реакции баланс по субстрату:  $[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \approx [S]$ . Понятно, что  $[E] \ll [S]$  и  $[ES] \ll [S]$  и при малых  $t$  продуктов мало. Тогда получим уравнение начальных скоростей  $r = \frac{k_2[E]_0}{[S]_0 + K_M} [S]_0$ . Особенность уравнения: при

больших концентрациях субстрата получаем нулевой порядок по субстрату, а при малых - первый.

Для ферментов типичны значения констант  $k_1 = 10^{7-10} \text{ 1/М.с}$  (значения, которые дает теорией реакций контролируемых диффузией реагентов в растворе, но чаще ближе к нижнему пределу  $10^7$ ),  $k_{-1} = 10^{3-5} \text{ 1/с}$ ,  $k_2$  (каталитическая константа) =  $100 \text{ 1/с}$ . Точный анализ кинетической схемы ММ при вышеупомянутых значениях констант скорости стадий показал, то стационарность по ES при точности анализа 5% соблюдается в интервале времени проведения

реакции от 0,002 до примерно 80 с. Вообще D (отношение скоростей расходования и образования ES равно 1,1). Поэтому надежен вывод уравнения ММ и его использование только для начальных скоростей. Очевидно, что стационарность зависит от соотношения констант стадий. При малых значениях каталитической константы стационарность будет соблюдаться в более широком интервале времени. Так может быть  $0,001 \text{ с}^{-1}$  у пепсина при  $31,6^\circ\text{C}$ ,  $0,026 \text{ с}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$  у  $\alpha$  - химотрипсина. Понятно, что значения констант зависят и от природы субстрата. Для большинства случаев порядок величины константы Михаэлиса  $10^{-2-3}$  моль/л.

Стационарность для простой схемы ферментативной реакции:  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ . Обозначим начальные концентрации фермента  $[E]_0 = e$  и субстрата  $[S]_0 = s$ , текущие концентрации

$[P] = p$ ,  $[ES] = y$ ,  $[E] = e - y$ ,  $[S] = s - y - p$ ,  $\bar{k} = k_{-1} + k_2$ . Предполагая стационарность по  $y$ , из

$\frac{dy}{dt} = k_1(e - y)(s - y - p) - \bar{k}y = 0$  получим стационарную концентрацию фермент-субстратного комплекса как решение квадратного уравнения

$$y_{\text{стац}} = \frac{1}{2k_1} \left\{ \bar{k} + k_1(e + s - p) - \left[ \left( -\bar{k} - k_1(e + s - p) \right)^2 + 4k_1e(p - s) \right]^{1/2} \right\}.$$

Простая реакция гидратации  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ , ускоряемая ферментом carbonic anhydrase, одна из наиболее быстрых известных ферментативных реакций. Величина константы Михаэлиса для этой реакции в физиологических условиях равна 0.008 моль/л.

Максимальную скорость  $R_{\text{max}} (k_2[E]_0)$  часто обозначают как число оборотов: число молекул субстрата, превращающихся в продукт за единицу времени при полном насыщении фермента субстратом. Раствор, содержащий 1  $\mu\text{моль}$  carbonic anhydrase, катализирует образование раствора 0.6 моль/л  $\text{H}_2\text{CO}_3$  при полном насыщении, т.е. в данном случае число оборотов составляет  $600000 \text{ с}^{-1}$ . Одно из наименьших - число оборотов для лизоцима  $0,5 \text{ с}^{-1}$ . В действительности число оборотов представляет собой константу скорости диссоциации фермент-субстратного комплекса ES псевдо первого порядка.

Другие примеры:

Фермент Ацетилхолин гидролаза (эстераза): гидролиз ацетилхолина

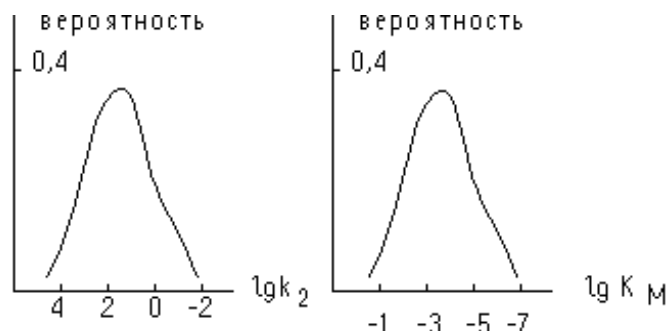
$(\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-)$  характеризуется значениями:

$K_M = 9,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ,  $k_2 = 1,4 \cdot 10^4 \text{ 1/с}$ ,  $[E]_0 = 10^{-6} \text{ М}$ ,  $V = 1,4 \cdot 10^{-2} \text{ М/с}$ .

Фермент	Субстрат	$K_M$ , моль/ л	$\Delta G$ , кал/ моль
Оксигеназа	Кислород	$1,5 \cdot 10^{-6}$	5000
Липаза	Глюкоза	$6 \cdot 10^{-3}$	3400
Уреаза	Мочевина	$2,5 \cdot 10^{-2}$	2200
Сахараза	Сахароза	$2,8 \cdot 10^{-2}$	2100

Enzyme	Substrate	$K_M(M)$	$k_{cat}(s^{-1})$	$k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})$
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$9.5 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^8$
Carbonic anhydrase	$CO_2$	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$
	$HCO_3^-$	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$H_2O_2$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglycine ethyl ester	$4.4 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	$8.8 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$
Fumarase	Fumarate	$5.0 \times 10^{-6}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$2.5 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^7$
Urease	Urea	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$

По анализу, проведенному Полтораком, Варфоломеевым и Зайцевым, распределение значений константы скорости каталитической стадии и  $K_M$  похоже на Гауссову кривую.



Если рассмотреть реакцию как равновесную на стадии образования фермент-субстратного комплекса, то можно выразить концентрацию ES через константу равновесия связывания  $K_S$  и тогда скорость реакции будет выражаться как  $r = \frac{k_2[E]_o[S]}{K_S + [S]}$ , где  $K_S = \frac{k_{-1}}{k_2}$ .

Понятно, что уравнения по форме совпадают и  $K_M = K_S + k_2 / k_1$ . Если будет выполняться условие  $k_2 \ll k_1$ , то  $K_M \approx K_S$ . Иногда это условие выполняется. Так для трипсина, ускоряющего гидролиз бензоил-L-аргинина,  $K_M = 1 \cdot 10^{-5} M$ , а  $K_S = 0,6 \cdot 10^{-5} M$ . Но для превращения сахарозы под действием инвертазы дрожжей  $K_M = 3 \cdot 10^{-2} M$ , а  $K_S = 9,1 \cdot 10^{-3} M$ .

Считая  $[S] = [S]_o - [P]$  и обозначив  $k_2[E]_o = V$ , при  $t \rightarrow 0$  получим уравнение ММ в виде:  $\frac{d[P]}{dt} = \frac{V([S]_o - [P])}{K_M + [S]_o - [P]}$ . При этом полагаем  $[ES] \ll [S]$ ,  $[S]_o = \text{const}$ . Интегрирование дает

$-(K_M + [S]_o) \ln([S]_o - [P]) - [S]_o + [P] + [S]_o \ln([S]_o - [P]) = Vt + \text{const}$ . При  $t=0$   $[P]=0$ ,  $\text{const} = -K_M \ln[S]_o - [S]_o$  и тогда  $Vt = [P] + K_M \ln \frac{[S]_o}{[S]_o - [P]} = [S]_o - [S] + K_M \ln \frac{[S]_o}{[S]}$ . Таким

уравнением пользуются, когда легче измерить концентрацию продукта. Последнее уравнение, выражающее скорость через текущую концентрацию субстрата, легко получить прямым интегрированием уравнения Михаэлиса - Ментен. Недостаток: не должно быть ингибирования. Кривая  $r/[S]$  по форме подобна изотерме Лэнгмюра. Начальный наклон дает  $V/K_M$ . Легко видеть, что при больших концентрациях субстрата скорость становится предельной:

$r_{\text{макс}} = V = k_2[E]_o$ .  $K_M = [S]_{r=1/2 r_{\text{макс}}}$ . Но трудно доказать, что достигнута максимальная скорость. Точнее провести такой анализ. Выразим  $[S]$  как  $\exp(\ln[S])$ . Дифференцируем два раза скорость по новой переменной  $t = \ln[S]$ .

$$r = \frac{V[S]}{K_M + [S]} = \frac{Ve^{\ln[S]}}{K_M + e^{\ln[S]}} = \frac{Ve^t}{K_M + e^t},$$

$$\frac{dr}{dt} = \frac{Ve^t(K_M + e^t) - Ve^t e^t}{(K_M + e^t)^2} = \frac{Ve^t K_M}{(K_M + e^t)^2} > 0$$

$$\frac{d^2r}{dt^2} = \frac{K_M Ve^t(K_M + e^t)^2 - K_M Ve^t \cdot 2(K_M + e^t)e^t}{(K_M + e^t)^4}, \quad \frac{d^2r}{dt^2} = 0 \quad \text{при } K_M = [S].$$

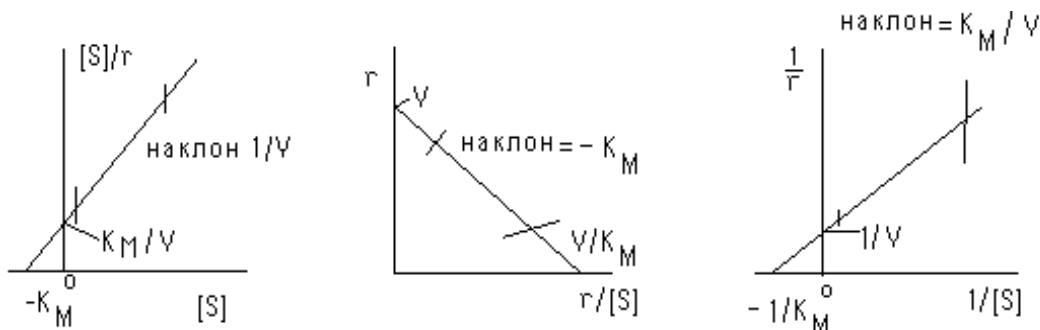
Т.е. точка перегиба графика  $r = f(\ln[S])$  дает возможность определить  $K_M$  и тем самым максимальную скорость. Но ошибка определения может быть велика в связи ошибкой графического дифференцирования кривой. Удобнее измерять начальные скорости. Более распространено для определения параметров использование линейных форм уравнения Михаэлиса-Ментен или интегрального уравнения.

$$(1) \quad \frac{[S]}{r} = \frac{K_M}{V} + \frac{[S]}{V},$$

$$(2) \quad r = V - \frac{K_M r}{[S]},$$

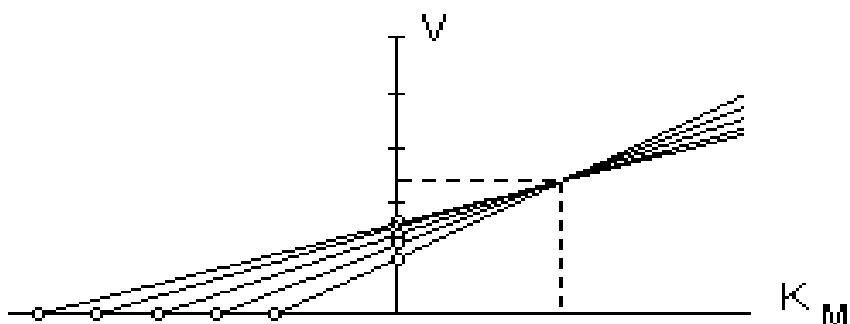
$$(3) \quad \frac{1}{r} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{V[S]}.$$

Наиболее распространена линейная форма уравнения (3) - спрямление в двойных обратных координатах, но такая обработка часто дает наибольшую ошибку:



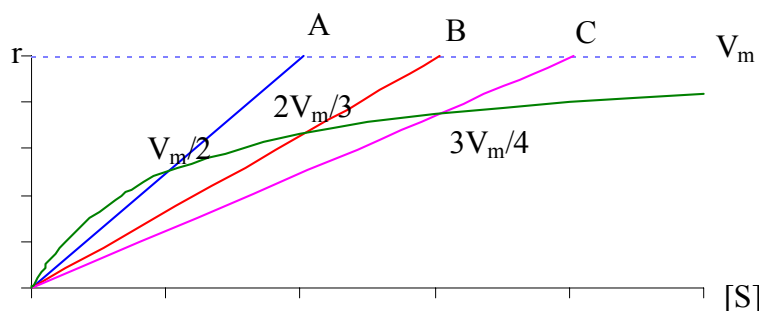
Здесь вертикальные штрихи: ошибка. Т.е. при определении наклона традиционная обработка не всегда самая ненадежная.

Повышение точности может быть достигнуто следующим способом (Корниш-Боуден). Преобразуем уравнение к виду  $V = r_0 + r_0 K_M / [S]_0$ . Тогда для каждой величины  $S_0$  найдем начальную скорость  $r_0$ . На оси X ( $K_M$ ) отложим  $[S]_0$ , а на оси Y ( $V$ ) найденное опытное значение  $r_0$ . Из формального анализа уравнения следует, что при  $V = 0$  на оси X получаем точки:  $-[S]_0$ . При  $K_M = 0$  на оси Y будут значения  $r_0$ . Соединяя эти точки, получим прямую. Проводя несколько измерений, получим несколько прямых, пересечение которых даст истинное значение  $V$  и  $K_M$ . Точность такого анализа выше и не требует вычислений.  $K_M$ .



Метод Диксона определения параметров уравнения Михаэлиса-Ментен.

На графике зависимости скорости от концентрации субстрата определяем точки, соответствующие значениям  $1/2$ ,  $2/3$  и  $3/4$  от максимальной.

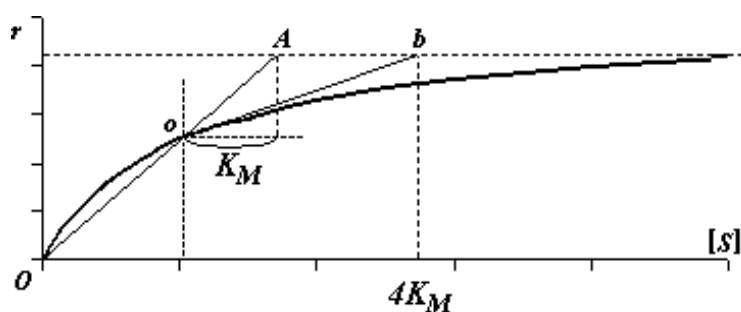


Проводим через них прямые до пересечения со значением максимальной скорости: точки А, В и С. (При этом предполагаем, что стационарное приближение для скорости процесса выполнимо). Из геометрических соображений получаем, что в точках пересечения с кривой скорости значения концентрации субстрата будут равны  $K_M$ ,  $2K_M$  и  $3K_M$ . Отсюда, из уравнения прямой, следует, что значения концентрации субстрата в точках А, В и С равны  $2K_M$ ,  $3K_M$  и  $4K_M$  соответственно. Расстояния между ними должны быть постоянными и равными  $K_M$ .

Тот же результат можно получить из анализа производной стационарной скорости по концентрации субстрата:  $\left(\frac{\partial V}{\partial [S]}\right) = \frac{V_m K_M}{(K_M + [S])^2}$ . Примем некоторую концентрацию, для ко-

торой определена стационарная скорость превращения, за условный ноль  $[S]$  - точка (о). Проведем прямую через истинный ноль и эту точку до пересечения со значением максимальной скорости (ОА). Уравнение касательной (об) к кривой зависимости скорости от концентрации субстрата в точке о сводится к  $\left(\frac{\partial V}{\partial [S]}\right) = \frac{V_m}{K_M}$ . Т.е. концентрация субстрата, при условной на-

чальной концентрации, равной нулю, в точке б пересечения касательной со значением максимальной скорости равна  $K_M$ , а полная концентрация субстрата в этой точке б равна  $4K_M$ .



Недостатком этих двух методов является то, что надо определить предельное значение скорости, а при больших концентрациях субстрата растет вероятность субстратного ингибирования.

Для интегрального уравнения спрямление опытных данных достигается в координатах уравнений:

$$(1) \quad \frac{t}{\ln([S]_o / [S])} = \frac{1}{V} \left[ \frac{[S]_o - [S]}{\ln([S]_o / [S])} \right] + \frac{K_M}{V},$$

$$(2) \quad \frac{[S]_o - [S]}{t} = V - \frac{K_M}{t} \ln([S]_o / [S]),$$

$$(3) \quad \frac{t}{[S]_o - [S]} = \frac{K_M}{V} \left[ \frac{1}{[S]_o - [S]} \right] \ln([S]_o / [S]) + \frac{1}{V}.$$

Для использования уравнения нужно использовать малые  $t$  (выполнение стационарности),  $[S] \approx [S]_o$  и быть уверенным в выполнимости кинетической схеме.

## Ингибирование.

Ингибирование может быть следствием конкуренции за активный центр, блокировки или изменения структуры АКЦ. Различают два процесса ингибирования: необратимое, в котором ингибитор ковалентно связывается с ферментом и активность фермента не восстанавливается. Чаще тогда говорят о ядах или инактиваторах (например, ионы тяжелых металлов). В живых организмах проявляется редко, но иногда этим процессом объясняется действие растительных ядов. Цианид, присутствующий в семенах некоторых фруктов, может реагировать с ионами металла ряда ферментов и подавлять их активность. В бобах (calabar beans) найден physostigmine, являющийся нервным токсином, поскольку он ингибирует ацетилхолинэстеразу. Предполагают, что моноамин эстераза (MAO) может быть ответственной за депрессию. Она окисляет некоторые биогенные амины (norepinephrine and serotonin).

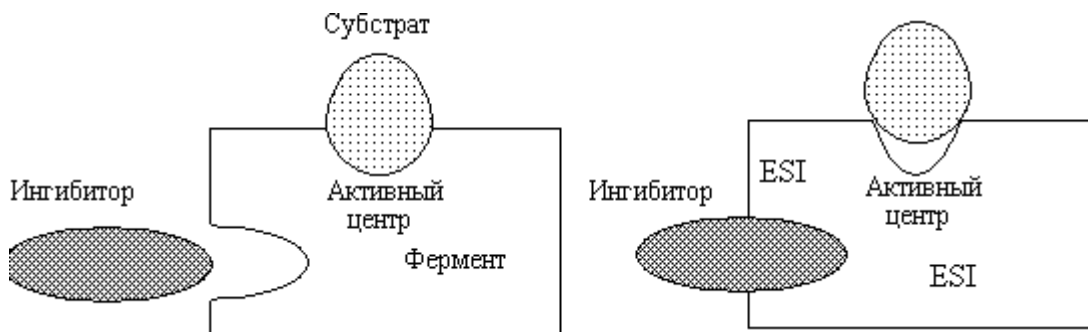
Обратимым называют ингибирование, при котором удаление ингибитора, связанного с ферментом не ковалентно, восстанавливает активность. Различают четыре основных типа обратимого ингибирования. Вообще типов ингибирования может быть много: просто связывание субстрата, избыток субстрата и т.п.

Конкурентное ингибирование: образование неактивного комплекса EI. Чаще аналоги

субстрата или продукт. При этом происходит конкуренция за активный центр:  $E + I \rightarrow EI$ . Например,  $\alpha$ -D-глюкозидаза (инвертаза) гидролизует сукрозу на глюкозу и фруктозу. Но глюкоза является конкурентным ингибитором  $\alpha$ -D-глюкозидазы. Этот процесс является простейшим примером биологического контроля: избыток продукта замедляет его образование. Примером конкурентного ингибирования является вредное действие на организм метанола или этиленгликоля (широко распространенный антифриз). Оба спирта сами по себе не токсичны, но алкоголь дегидрогеназа превращает их соответствующие альдегиды (формальдегид и глиоксаль). Затем под действием альдегид дегидрогеназы образуются кислоты (муравьиная и оксалева). Получающиеся кислоты и особенно альдегиды являются сильными токсинами. Оксалева кислота кристаллизуется в почках, что вызывает механические повреждения жизненно важного органа. Подавить превращение метанола и этиленгликоля можно добавлением этилового спирта. 2 мг этанола в 100 мл воды насыщают алкоголь дегидрогеназу на 50%. Для такого же насыщения этиленгликоля надо 326 мг в 100 мл. Т.е. фермент предпочтительно связывается с этанолом. Тогда не превратившийся этиленгликоль выводится с мочой.

Бесконкурентное ингибирование: ингибитор и субстрат присоединяются к разным частям молекулы (ESI), EI не образуется, EIS не дает продукта. Вариант объяснения: центр доступен ингибитору после связывания субстрата: индуцированное соответствие. Часто при ингибировании Р или S.  $ES + I \rightarrow ES I$ .

Смешанное ингибирование: образуются комплексы ES и ESI, константы диссоциации которых не равны друг другу. Часто ингибирование продуктом.

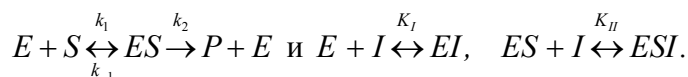


Неконкурентное ингибирование: наряду с EI образуется EIS, не дающий продукт. Константы диссоциации ES и EIS равны. Это частный случай смешанного ингибирования.

Ингибитор: ион тяжелого металла. Редкий случай.

### **Как более общий случай рассмотрим кинетику смешанного ингибирования.**

При этом ингибитор образует комплексы EI и ESI. Константы диссоциации EI и ESI не равны. Схема реакции:



Скорость реакции  $v = k_2[ES]$ . Приняв равновесие при образовании EI и ES, получим



$[EI] = [E][I] / K_I$  и  $[ESI] = [ES][I] / K_{II}$ . Тогда из условия баланса по ферменту

$[E]_o = [ES] + [EI] + [ESI] + [E]$  получим равенство

$$[E] \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right\} = [E]_o - [ES] \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_{II}} \right\} \quad \text{или} \quad [E] \cdot a = [E]_o - [ES] \cdot b.$$

Здесь члены в фигурных скобках для упрощения промежуточных выкладок обозначены временными постоянными  $a$  и  $b$ . Уравнение стационарности по промежуточному ES:

$d[ES]/dt = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$  (скорости расходования и образования ES в реакции с ингибитором равны, т.к. предположили равновесие и в общем уравнении для  $d[ES]/dt$  они сокращаются). После подстановки значения  $[E]$  получим:

$$k_1 \left\{ \frac{[E]_o}{a} - \frac{b[ES]}{a} \right\} [S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = \left\{ \frac{[E]_o}{a} - \frac{b[ES]}{a} \right\} [S] - K_M [ES] = 0.$$

$$[ES] = \frac{[E]_o [S] / b}{a K_M / b + [S]} \quad \text{и скорость} \quad r = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_o [S] / b}{a K_M / b + [S]} = \frac{r_{\text{макс}} [S] / b}{a K_M / b + [S]}.$$

Подставим временные постоянные  $a$  и  $b$  и для начальных скоростей  $[S]_o$  и  $[I]_o$ :

$$r = \frac{r_{\text{макс}} [S] / \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_{II}} \right\}}{K_M \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right\} / \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_{II}} \right\} + [S]} = \frac{r^{\text{эф}}_{\text{макс}} [S]_o}{K^{\text{эф}}_M + [S]_o}.$$

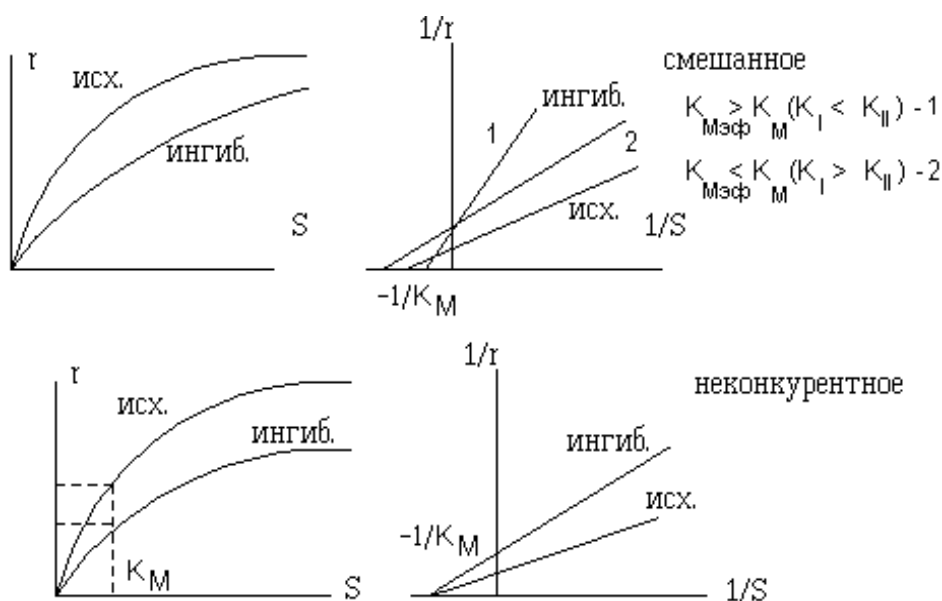
$$r^{\text{эф}}_{\text{макс}} = \frac{r_{\text{макс}}}{\left( 1 + \frac{[I]_o}{K_{II}} \right)}, \quad K^{\text{эф}}_M = K_M \frac{1 + \frac{[I]_o}{K_I}}{\left( 1 + \frac{[I]_o}{K_{II}} \right)}.$$

Здесь константа Михаэлиса и максимальная скорость меняются по-разному. Эффективная максимальная скорость зависит от константы равновесия связывания с образованием ESI и будет меньше максимальной скорости при отсутствии ингибирования (знаменатель всегда больше единицы), а константа Михаэлиса: от соотношения констант двух процессов ингибирования. Причем эффективная константа Михаэлиса может быть больше истинной  $K_M$  при  $K_I < K_{II}$  или меньше при обратном соотношении констант равновесия.

Отсюда легко вывести все другие виды ингибирования.

Если константы диссоциации обоих типов комплексов с ингибитором равны (неконкурентное ингибирование), то уравнение скорости упрощается:

$$r = \frac{r^{\text{эф}}_{\text{макс.}} [S]_o}{K_M + [S]_o}, \quad \text{где} \quad r^{\text{эф}}_{\text{макс.}} = \frac{r_{\text{макс.}}}{\left( 1 + \frac{[I]_o}{K_I} \right)}.$$



При неконкурентном ингибировании уменьшается значение максимальной скорости каталитической стадии, константа Михаэлиса не меняется. Кривая в координатах  $v/[S]$  опускается вниз.

Если происходит только образование EI, то  $K_I'$  диссоциации комплекса ESI равно бесконечности, а член, ее содержащий, равен 1 (конкурентное ингибирование). Тогда скорость реакции:

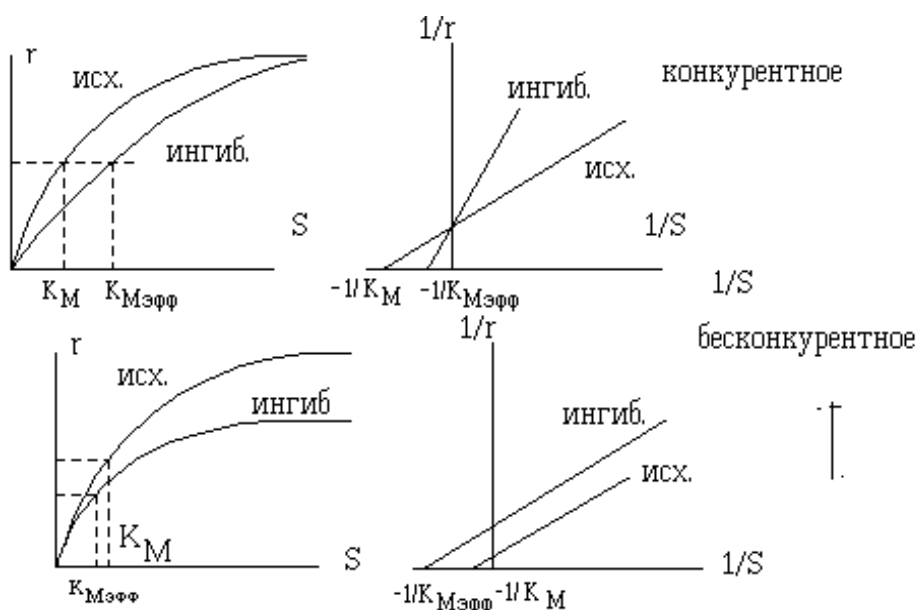
$$r = \frac{r_{\text{макс}} [S]_o}{K^{\text{эф}}_{M.} + [S]_o}, \text{ где } K^{\text{эф}}_{M.} = K_M \left( 1 + \frac{[I]_o}{K_I} \right) \text{ и } 1 + \frac{[I]_o}{K_I} > 1.$$

Максимальная скорость не меняется, а константа Михаэлиса увеличивается. Кривая на графике  $v/[S]$  становится более полой.

Бесконкурентное ингибирование (аллостерическое). Образуется только комплекс SI.

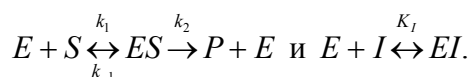
$$r = \frac{r^{\text{эф}}_{\text{макс}} [S]_o}{K^{\text{эф}}_{M.} + [S]_o} \text{ где } r^{\text{эф}}_{\text{макс}} = \frac{r_{\text{макс}}}{\left( 1 + \frac{[I]_o}{K_{II}} \right)} \text{ и } K^{\text{эф}}_{M.} = \frac{K_M}{\left( 1 + \frac{[I]_o}{K_{II}} \right)}$$

При таком ингибировании  $K_M$  и  $r_{\text{макс}}$  одинаково уменьшаются ( $[I]_o / K_{II} > 0$ ).



Последовательный вывод всех случаев:

### **Конкурентное ингибирование. Схема процесса**



Скорость реакции  $r = k_2[ES]$ . По балансу  $[E]_0 = [ES] + [EI] + [E]$ . Принимая равновесие ингибирования, получим  $[EI] = [E][I] / K_I$  и  $[E]_0 - [ES] = [E](1 + [I] / K_I)$ .

Применяя принцип стационарности, выразим концентрацию ES

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - [ES](k_{-1} + k_2) = k_1 \frac{[E]_0 - [ES]}{1 + [I] / K_I} [S] - [ES](k_{-1} + k_2) = 0$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$$

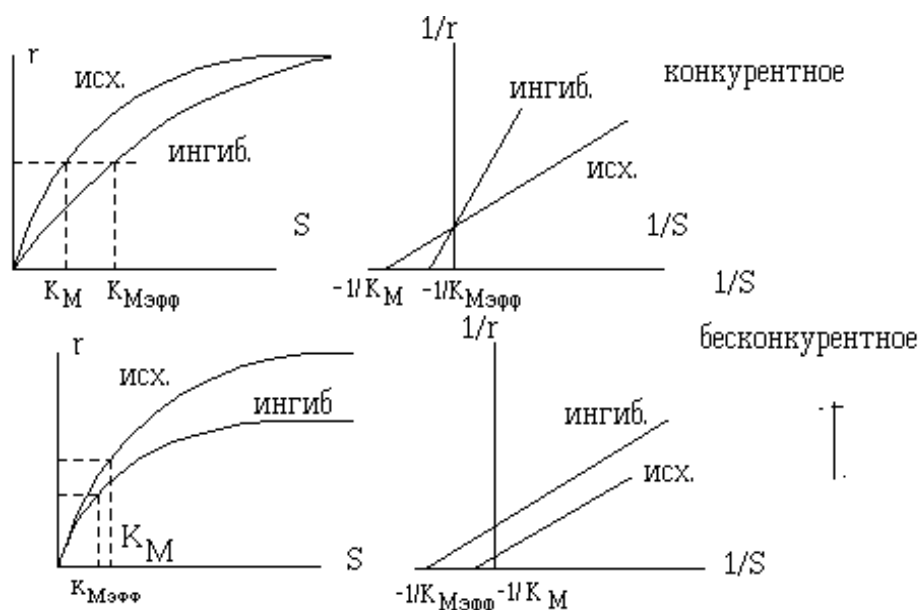
и скорость реакции будет равна:

$$r = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \text{ или } r = \frac{V[S]}{K_{M\text{эфф.}} + [S]}, \text{ где } K_{M\text{эфф.}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right), \text{ и } 1 + \frac{[I]}{K_I} > 1.$$

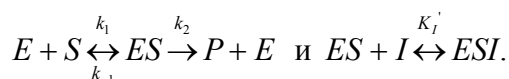
Уравнение можно упростить: при  $[S]_0 \gg [E]_0$  и при малом значении  $t$   $[S] \approx [S]_0$ , а при  $[I] \gg [EI]$  (при  $[I]_0 \gg [E]$  или при больших значениях  $K_I$ ) из баланса по ингибитору  $[I]_0 = [I] + [EI]$  следует  $[I] \approx [I]_0$  и скорость реакции:

$$r = \frac{V[S]_0}{K_{M\text{эфф.}} + [S]_0}, \text{ где } K_{M\text{эфф.}} = K_M \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) = \text{const.}$$

Т.е. в данном случае максимальная скорость не меняется, но увеличивается константа Михаэлиса. Кривая на графике  $r / [S]$  становится более пологой.



### **Бесконкурентное (аллостерическое) ингибирование. Схема реакции:**



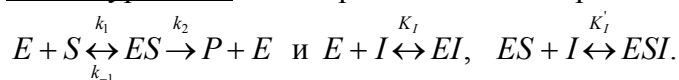
Скорость реакции  $r = k_2[ES]$ . По балансу  $[E]_o = [ES] + [ESI] + [E]$ . Принимая равновесие при образовании ESI, получим  $[ESI] = [ES][I] / K_I'$ . Применяя принцип стационарности, выразим концентрацию ES и скорость при  $[S]_o \gg [E]_o$  и  $[I] \gg [ESI]$  и при малом времени реакции можно представить как:

$$r = \frac{k_2[E]_o[S]_o}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I'}\right) \left(\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I'}\right)} + [S]_o\right)} \quad \text{или} \quad r = \frac{V_{\text{эфф.}}[S]_o}{K_{M_{\text{эфф.}}} + [S]_o}, \quad \text{где} \quad V_{\text{эфф.}} = \frac{V}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I'}\right)} \quad \text{и} \quad K_{M_{\text{эфф.}}} = \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I'}\right)}$$

При таком ингибировании  $K_M$  и  $V$  одинаково уменьшаются ( $[I]_o / K_I' > 0$ ).

Случай смешанного ингибирования был разобран ранее. При таком ингибировании константа Михаэлиса и максимальная скорость меняются по-разному. Эффективная максимальная скорость зависит от константы равновесия связывания с образованием ESI и будет меньше максимальной скорости при отсутствии ингибирования (знаменатель всегда больше единицы), а константа Михаэлиса: от соотношения констант двух процессов ингибирования. Причем эффективная константа Михаэлиса может быть больше истинной  $K_M$  при  $K_I < K_{II}$  или меньше при обратном соотношении констант равновесия связывания ингибитора.

**Неконкурентное ингибирование.** Схема процесса та же, что и при смешанном:



Но здесь  $K_I = K_I'$ . Легко видеть, что

$$r = \frac{k_2[E]_o[S]_o}{(K_M + [S]_o)\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I}\right)} \text{ или } r = \frac{V_{\text{эфф.}}[S]_o}{K_M + [S]_o}, \text{ где } V_{\text{эфф.}} = \frac{V}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_I}\right)}.$$

При неконкурентном ингибировании уменьшается значение максимальной скорости каталитической стадии, константа Михаэлиса не меняется. Кривая в координатах  $r / [S]$  опускается вниз.

### **Кинетика аллостерических ферментов.**

<http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/contents.html> Dr. Peter Birch of the [Department of Biological Sciences](#) at the [University of Paisley](#).

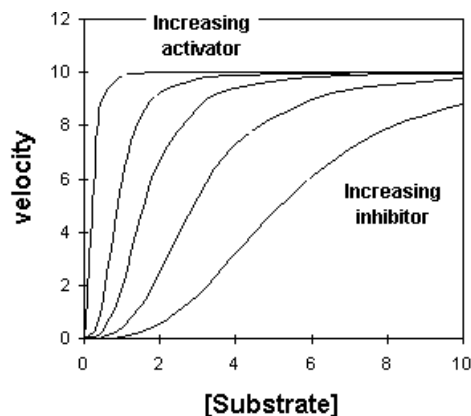
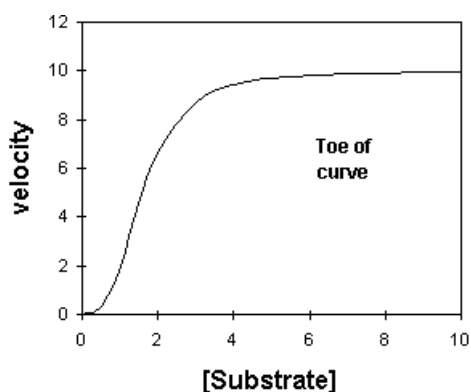
Кинетика реакций с участием аллостерических ферментов - протеинов (например, гемоглобин) отличается от кинетики типа Михаэлиса-Ментен.

Определения. Аллостерический протеин (фермент) содержит два или более топологически различных связывающих лиганды центра, которые функционально связаны друг с другом. Т.е. связывание на одном центре влияет на свойства другого. Кооперативность – влияние связывания на константу связывания (диссоциации комплекса фермент- субстрат) на другом центре. Положительная кооперативность увеличивает константу связывания, отрицательная – наоборот. Если два лиганда подобны по своей химической природе (две молекулы субстрата), то это гомотропный эффект. Если различны (субстрат и ингибитор) – гетеротропный эффект.

Свойства аллостерических ферментов. Существует ряд особенностей таких ферментов, но не обязательно все наблюдаются у какого-либо аллостерического фермента.

Сигмоидальная (S) кинетика. Особенность –начальный индукционный период (рис).

Здесь положительная кооперативность. Вначале субстрат плохо связывается, а по мере увеличения концентрации субстрата связывание становится больше. Но такой тип кинетики наблюдается не всегда.



Эффекторы. Ингибиторы или активаторы, влияющие на скорость превращения. На следующем рисунке приведены примеры положительной кооперативности эффектора. Если под действие эффектора максимальная скорость ( $V_m$ ) не меняется, то это соответствует изменению константы Михаэлиса ( $K_m$ ) –  $K$  системы. Для  $V$  систем характерно изменение  $V_m$ .

Конкурирующие (аналогичные субстрату) ингибиторы. В аллостерических ферментах малая концентрация ингибитора может увеличить скорость превращения. Но при больших концентрациях ингибитор будет действовать как обычно, уменьшая концентрацию связанного субстрата. (Бифазный эффект).

Денатурирующие (температура, pH, посторонние соединения) агенты разрушают пространственную организацию белка. При этом кооперативность уменьшается, но способность ускорять реакцию может остаться.

Структура полимера. Особенность таких ферментов – наличие четвертичной структуры, т.е. фермент состоит из нескольких белковых цепей (субединиц). При этом может быть равновесие фермента и составляющих его субединиц, которые сами по себе могут быть неактивны, а также промежуточных форм. Наименьшая каталитически активная частица – промотор. Связывание лиганда может смещать равновесие.

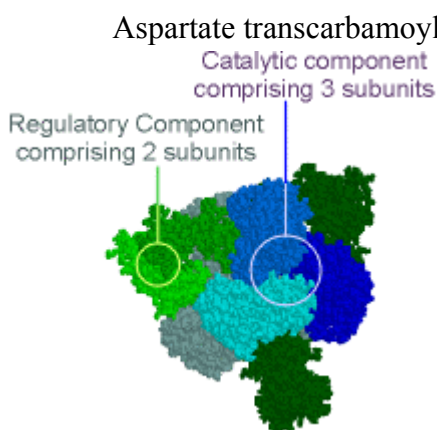
Механизм аллостеричности. Для объяснения эффекта предложено два механизма: гипотеза согласованности или симметрии (Monod, Wyman, Changeux) и последовательности (Koshland, Nemethy, Filmer – KNF). Гипотеза согласованности основана на идее существования субединиц в двух конформациях (R и T состояния, причем T более напряжено). Полагают, что взаимодействие субединиц приводит к существованию всех в одной, R или T формах. Между ними в растворе может быть равновесие. В растворе без лигандов преимущественно существует T форма, но R форма имеет большее сродство к субстрату. Связывание дает комплекс RS и концентрация R уменьшается. Восстановление равновесия уменьшает концентрацию T восстанавливает R форму. Это дает положительную кооперативность. Влияние аллостерических эффекторов сводится также к смещению равновесия двух форм фермента: за счет связывания активатора с R формой имеем положительный эффект, а ингибитора с T формой – отрицательный. Причем активатор может дать обычную гиперболическую кривую зависимости скорости от концентрации субстрата. Ингибитор будет увеличивать индукционный период. Но для некоторых ферментов лучше подходит гипотеза последовательности. Здесь полагают, что в ферменте могут быть одновременно две конформации.



При этом субстрат влияет на конформацию фермента. Первоначально существует преимущественно Т форма. Случайное связывание субстрата постепенно переводит фермент в R форму: индуцированное соответствие. Поскольку субединицы взаимодействуют друг с другом перевод одной в R способствует переходу других также в R форму – взаимодействие между субединицами дает положительную кооперативность по мере увеличения концентрации субстрата.

Ингибиторы и активаторы. Активатор действует аналогично субстрату, в то время как ингибитор делает фермент более жестким, что препятствует переходу между конформациями.

Отрицательная субстратная кооперативность - явление достаточно редкое. Ее нельзя объяснить гипотезой симметрии, основанной на законе действующих масс. А гипотеза последовательности этот эффект легко объясняет: переход одной субединицы в R форму затрудняет переход другой. Очевидно, что обе модели –упрощения действительности и гипотеза симметрии есть крайний и упрощенный случай гипотезы последовательности.



Aspartate transcarbamoylase (ATC) или carbamoyltransferase, получаемый из *Escherichia coli*, - важный фермент биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов. Он ускоряет реакцию взаимодействия aspartic кислоты с carbamoyl фосфатом с образованием N-carbamoyl aspartate и неорганического фосфата. АТС состоит из 12 различных протеиновых субединиц. Он содержит 2 каталитические компоненты, каждая из которых построена из 3 одинаковых субединиц. На рис. слева одна из них выделена синим светом. Остаток фермента построен из 3 регуляторных компонент, каждая из которых содержит по 2 субединицы. (Зеленый цвет).

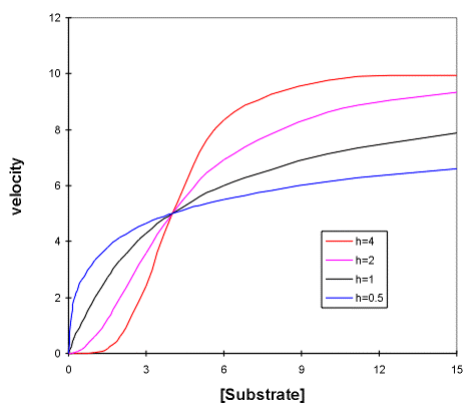
Регуляторные компоненты связывают ингибитор (СТР) или активатор АТР).

Зависимость скорости от концентрации субстрата имеет S – образный вид и описывается уравнением Хилла: ( $a \equiv S$ ).  $K_{0.5}$  –равна концентрации субстрата при значении скорости, равной половине максимальной.

$$v = \frac{V \cdot a^h}{K_{0.5}^h + a^h}$$

Величина  $h$  служит мерой кооперативности. Если  $h = 1$ , то эффект кооперативности отсутствует. Рост  $h$  свидетельствует о положительной

кооперативности. При  $h < 1$  имеем отрицательную кооперативность. На следующем рисунке приведена кривая при разных значениях  $h$ . Во всех случаях  $V_{\max} = 10$  и  $K_{0.5} = 4$ . Из формулы Хилла следует, что все кривые приходят к одному пределу скорости и пересекаются в одной точке, соответствующей значению концентрации субстрата, равной  $K_{0.5}$ , в данном случае  $a = 4$ .



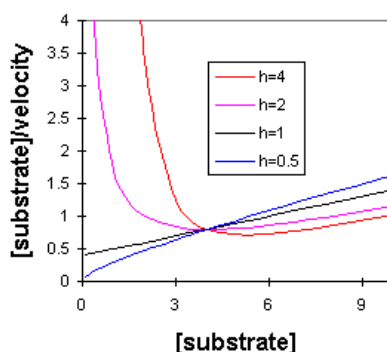
Безусловно, для данного случая не будут выполняться уравнения Михаэлиса-Ментен в линейной форме.

### Преимущество субстратной кооперативности.

перативность. При  $n = 1$  трестата (в 81раз) для увеличения при положительной кооперативности в 3 раза. Т.е. фермент более (менее распространенная) мы не видим на графике доскорости.

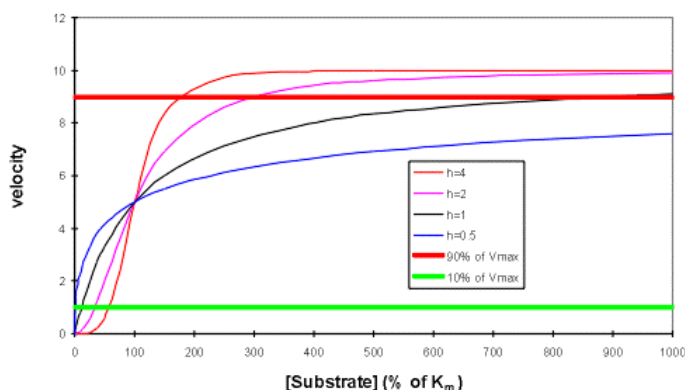
Здесь нужен избыток фермент менее ингибирующему действию субстрата.

Hanes plot showing cooperativity



Положительная кооперативность. При  $n = 4$  требуется большой избыток субстрата для достижения 90% максимальной скорости. А отрицательная кооперативность. При  $n = 0,5$  требуется меньший избыток субстрата для достижения 90% максимальной скорости.

в 6561 раз. Т.е. фермент чувствителен к



### Денатурация белка.

Одной из основных особенностей действия ферментов является наличие максимума на температурной зависимости константы скорости каталитической реакции ( $k$ ). Как правило, причиной этого является разрушение каталитически активных третичной и четвертичной структур белкового катализатора при повышении температуры: денатурация белка. При повышении температуры происходит разрушение непрочных водородных и S-S связей, определяющих структуру белков, глобула разворачивается. Может меняться и конформация полипептидной цепочки. При этом нарушается геометрическое соответствие фермента и субстрата, активность резко падает. Увеличивается  $\Delta S$  за счет увеличения числа конформаций. С температурой меняется и pH нейтрального раствора:

$t, ^\circ\text{C}$	0	10	20	25	30	40	50	60	100
pH	7,472	7,267	7,088	6,999	6,916	6,767	6,631	6,508	6,117

Примем схему Михаэлиса - Ментен и добавим равновесную стадию  $E \leftrightarrow E_d$ .



Для реакции, протекающей по схеме Михаэлиса - Ментен,



Но при равновесной стадии денатурации надо учесть, что часть фермента денатурирована, и надо определить начальную концентрацию фермента, находящегося в равновесии с денатурированной формой ( $[E]_o'$ ) и подставлять ее в выражение для скорости реакции. Очевидно, что  $[E]_o = [E]_o' + [E]_d$ , где  $[E]_o'$  - концентрация фермента в равновесии с денатурированной формой и  $[E]_d$  - концентрация денатурированной формы. Константа равновесия  $K = [E]_d / [E]_o'$ . В равновесии  $[E]_o' = [E]_o / (1 + K)$ . Т.е. скорость реакции будет выражаться как

$$r = \frac{k_2[E]_o[S]}{(K_M + [S])(1 + K)}.$$

Для упрощения анализа рассмотрим кинетику при  $[S] < K_M$ , что дает  $r = \frac{k_2[E]_o[S]}{K_M(1 + K)}$ .

Предположив, что константы  $k_{-1}$  и  $k_2$  слабо зависят от  $T$  ( $E_{\text{акт}} \approx 0$ ), получим

$$\frac{k_2}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \approx \frac{k_{10} \exp(-E / RT) k_{20}}{k_{-10} + k_{20}} = k_0 e^{-E / RT}. \quad k_0 = \frac{k_{10}}{k_{-10} + k_{20}}.$$

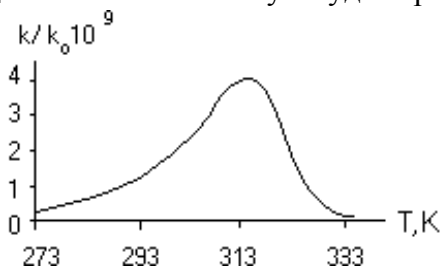
Здесь  $E$  - энергия активации образования фермент-субстратного комплекса. При таком допущении скорость реакции будет равна  $r = k_{\text{эф}}[E]_o[S]$  и  $k_{\text{эф}} = \frac{k_0 \exp(-E / RT)}{1 + \exp(\Delta S / R - \Delta H / RT)}$ .

С ростом температуры будут увеличиваться и числитель и знаменатель. Т.к. экспоненты будут изменяться по разному, можно ожидать экстремум. Продифференцируем  $k_{\text{эф}}$  по  $T$ .

$$\frac{d(k_{\text{эф}} / k_0)}{dt} = \frac{[1 + e^{\Delta S / R} e^{-\Delta H / RT}](E / RT^2) e^{-E / RT} - e^{-E / RT} e^{\Delta S / R} e^{-\Delta H / RT} (\Delta H / RT^2)}{[1 + \exp(\Delta S / R - \Delta H / RT)]^2}.$$

Положение экстремума определяется равенством производной нулю. Значение температуры определяем по формуле  $T_{\text{макс}} = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \ln[E / (\Delta H - E)]}$ .

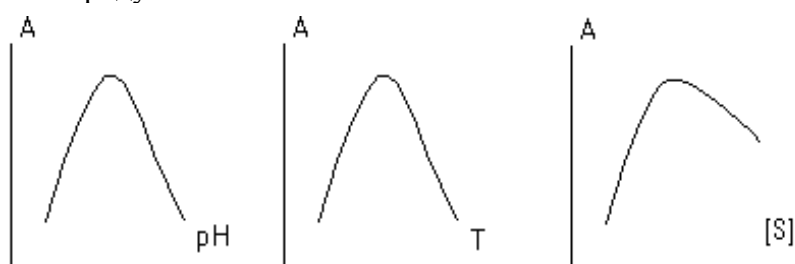
Для примера рассмотрим зависимость активности трипсина. Равновесие денатурации определяется величинами:  $\Delta S = 891 \text{ Дж/моль.К}$  и  $\Delta H = 284,5 \text{ кДж/ моль}$ . Энергия активации образования фермент-субстратного комплекса обычно составляет около  $50 \text{ кДж/ моль}$ . При заданных значениях  $T_{\text{макс}} = 314,7 \text{ К}$  ( $41,5^\circ\text{C}$ ). (Рисунок ниже). Для разложения пероксида водорода каталазой максимум будет при  $63^\circ\text{C}$ .



Из приведенных цифр ясно, что с ростом температуры сначала быстрее увеличивается

$k_1$ , а при более высоких температурах  $K$  растет быстрее и все больше фермента превращается в неактивную форму.

Примечание. При анализе использованы упрощения: равновесность денатурации и независимость констант скорости распада фермент-субстратного комплекса от температуры. Очевидно, что рассмотренная модель не может претендовать на количественные совпадения с опытными данными. На изменение константы равновесия может влиять среда: изменение коэффициентов активности. Поскольку рвется много связей, то изменение энтропии и энтальпии на молекулу белка велико и  $\Delta H$  будет всегда больше  $E$ . Повышение термостабильности: иммобилизация ферментов. Улучшается и их практическое использование, т.к. легче отделять фермент от продуктов.



На рис.: Зависимости активности от pH (1), (2) от T, (3)-й ингибирование субстратом.

Зависимость активности от концентрации субстрата:

Как обычно,  $E + S$  обратимо в  $ES$  необратимо в продукты, но  $ES + S$  дает  $ES_2$  - тупиковая форма.  $S$  играет роль ингибитора. Схема бесконкурентного ингибирования и зависимость скорости получим в виде

$$r = \frac{\frac{k_2[E]_o[S]_o}{\left(1 + \frac{[S]_o}{K_S}\right)}}{\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[S]_o}{K_S}\right)} + [S]_o} = \frac{V_{\text{эфф.}}[S]_o}{K_{M_{\text{эфф.}}} + [S]_o}, \text{ где } V_{\text{эфф.}} = \frac{V}{\left(1 + \frac{[S]_o}{K_S}\right)} \text{ и } K_{M_{\text{эфф.}}} = \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[S]_o}{K_S}\right)}.$$

Получится кривая с максимумом. Для этого представим скорость в виде:

$$r = \frac{k_2[E]_o[S]_o}{K_M + [S]_o + \frac{[S]_o^2}{K_S}}$$

и производная скорости по концентрации  $S$

$$\frac{dr}{d[S]_o} = \frac{k_2[E]_o}{K_M + [S]_o + \frac{[S]_o^2}{K_S}} - \frac{k_2[E]_o[S]_o(1 + 2[S]_o / K_S)}{\left(K_M + [S]_o + \frac{[S]_o^2}{K_S}\right)^2}. \text{ и } [S]_{o \text{ макс}} = \sqrt{K_M K_S}$$

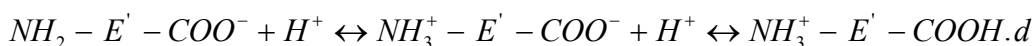
При малых значениях  $[S]_o$  (пренебрегаем  $[S]_o^2/K_S$ ) формула сводится к схеме Михаэлиса - Ментен и можно определить  $V$  и  $K_M$ , а из значения  $[S]_o$  в максимуме скорости:  $K_S$ .

Менее точный, но более простой расчет: при малых концентрациях субстрата можно представить скорость в виде  $r = V[S]_o/K_M$ . На графике получим прямую, наклон которой дает  $V/K_M$ . Выражение для максимальной скорости после замены  $[S]_{o, \max}^2$  через константы будет

$$\text{иметь вид: } r_{\max} = \frac{[S]_{o, \max}}{2K_M/V + [S]_{o, \max}/V}.$$

Таким образом, зная  $r_{\max}$  и  $[S]_{o, \max}$ , определяем  $V$  и остальные константы.

Зависимость активности от pH: холинэстераза сыворотки крови превращает ацетилхолин. Схема: фермент в кислой среде обратимо дает  $EH^+$ , избыток протонов приводит к образованию  $EH_2^{2+}$ , а активна форма  $EH^+$ .



Константы равновесия:  $K_a = [E][H^+]/[EH^+]$  и  $K_b = [EH^+][H^+]/[EH_2^{2+}]$ . Баланс по ферменту:  $[E]_o = [E] + [EH^+S] + [EH^+] + [EH_2^{2+}]$ . После подстановки через константы равновесия получим:  $[E]_o = [EH^+S] + [EH^+](1 + K_a/[H^+] + [H^+]/K_b)$  и

$$[EH^+] = ([E]_o - [EH^+S]) / (1 + K_a/[H^+] + [H^+]/K_b).$$

Для определения  $[EH^+S]$

$$\frac{d[EH^+S]}{dt} = k_1[EH^+][S] - (k_{-1} + k_2)[EH^+S] =$$

$$\frac{k_1[E]_o[S]}{A} - \frac{k_1[EH^+S][S]}{A} - (k_{-1} + k_2)[EH^+S].$$

Здесь  $A = 1 + K_a/[H^+] + [H^+]/K_b$ .

Методом стационарных концентраций при  $t \rightarrow 0$  получим выражение скорости

$$r = \frac{k_3[E]_o[S]_o}{K_M \left( 1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right) + [S]_o} \quad \text{и максимум скорости при } [H^+] = \sqrt{K_a K_b}.$$

Оптимальное значение pH, как правило, близко к нейтральному, но для пепсина: 1.

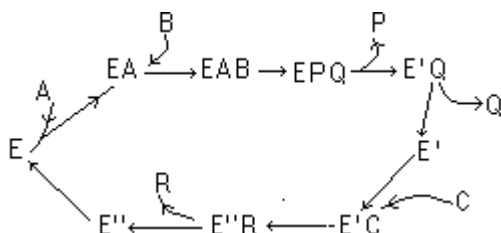


Реакции конечно сложнее, чем схема Михаэлиса - Ментен. Отсюда трудности решения сложных систем дифференциальных уравнений.

Номенклатура механизмов реакций по Келланду:

Основные термины: упорядоченный механизм - набор констант скорости и равновесия зависит от порядка присоединения молекул субстратов и отщепления продуктов. Пинг-понг: хотя бы один из продуктов отделяется раньше, чем присоединятся все субстраты. Число кинетических

тически значимых субстратов: уни, би, три.



Механизм изо-би-би-уни-уни-пинг-понг. Трехсубстратный (A,B,C), трехпродуктный (P,Q,R), упорядоченное связывание двух первых субстратов (A,B - би), сопровождающееся отщеплением двух продуктов (P,Q - би), с последующим связыванием третьего субстрата C (уни) и отщеплением третьего продукта R (уни). Изо: EAB и E'C изомеризуются в EPQ и E''R соответственно. Значения: уни - односуб-стратный, би - двухсубстратный, тер (три) - трехсубстратный и т.п., пинг-понг - замещение субстрата на другой в фермент-субстратном комплексе, изо - изомеризация в фермент-субстратном комплексе.

*Пинг-понг (двойное замещение) механизм. Основной особенностью таких ферментов является то, что по крайней мере один из продуктов высвобождается из фермент-субстратного комплекса до того, как произойдет связывание всех субстратов. На первый взгляд это странно, но легко объяснимо достаточно простым механизмом. Некоторые достаточно обычные ферменты, например сериновые протеазы трипсин, химотрипсин и т.п., а также аминотрансферазы, действуют таким образом. Процесс начинается со связывания первого субстрата ферментом сначала по обычной схеме  $E + A \leftrightarrow (EA)$ . (EA) является основным комплексом. При этом активный центр полностью занят, и первый субстрат должен превратиться в продукт до связывания второго субстрата. Следующая стадия преобразования фермент – субстратного комплекса  $(EA) \leftrightarrow (FP)$  является ключевой для всего процесса. При этом часть субстрата удаляется от субстрата A, превращая его в продукт P. Удаленный фрагмент первого субстрата ковалентно связывается с ферментом, образуя новую форму фермента F. Первый продукт P высвобождается, а новая форма фермента F связывает второй субстрат B:  $(FP) \leftrightarrow F + P$ ,  $F + B \leftrightarrow (FB)$ . Теперь связанная с ферментом часть первого субстрата превращается в новую форму второго субстрата и образуется второй продукт, который потом и отделяется:  $(FB) \leftrightarrow (EQ)$ , и затем получаем второй продукт:  $(EQ) \leftrightarrow E + Q$ . Ниже приведена схема пинг – понг механизма по Келанду.*

