

Ферменты (Энзимы)

Метаболический путь – это цепь взаимосвязанных реакций, в ходе которой исходный субстрат S превращается в конечный продукт P за несколько стадий.

Типы метаболических путей:

Схема	Название	Пример
$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$	Линейный	Гликолиз
	Разветвлённый	Синтез нуклеотидов
	Циклический	Цикл трикарбоновых кислот
		Синтез мочевины
	Спиральный	β -окисление жирных кислот

Регуляция скорости реакций метаболического пути осуществляется путем регуляции действия определенных ферментов, которые называются регуляторными (как правило, они являются аллостерическими).

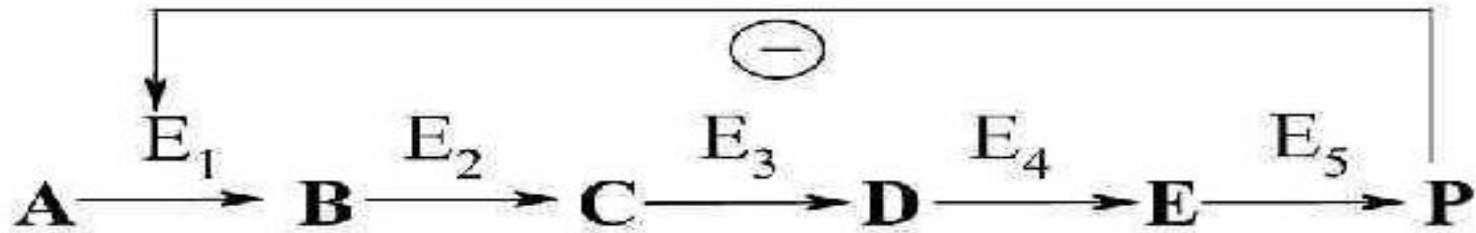
Признаки регуляторных реакций:

- 1) начальные реакции метаболического пути;**
- 2) необратимые реакции, скорость-лимитирующие реакции (самые медленные);**
- 3) реакции на разветвлении метаболического пути.**

Способы регуляции действия ферментов:

- путем изменения количества фермента;**
- путем изменения каталитической активности фермента при неизменном количестве (более быстрый способ регуляции).**

Очень часто **ингибитором** регуляторного фермента является **конечный продукт** метаболического пути.



Фермент, катализирующий превращение субстрата А в продукт В, имеет аллостерический центр для отрицательного эффектора, которым служит конечный продукт метаболического пути Р. Если концентрация Р увеличивается (т. е. вещество Р синтезируется быстрее, чем расходуется), ингибируется активность одного из начальных ферментов. Такую регуляцию называют **отрицательной обратной связью**, или **ретроингибированием**.

Регуляция активности ферментов

Основные способы регуляции активности ферментов:

- аллостерическая регуляция;
- регуляция с помощью **белок-белковых взаимодействий**;
- регуляция путём **фосфорилирования -- дефосфорилирования** молекулы фермента;
- регуляция **частичным (ограниченным) протеолизом**.

Аллостерическая регуляция

Аллостерические ферменты:

1) Олигомерные белки, состоящие из 2-х или более субъединиц – регуляторной (R) и каталитической (C).

2) Имеют 2 пространственно разделенных центра: активный центр, расположенный в C субъединице и аллостерический центр, расположенный в R субъединице.

3) К АЦ присоединяется S фермента.

К аллостерическому – лиганд-эффектор.



Алlostерический центр

Активный центр

**Эффекторы делятся на:
активаторы (А) и ингибиторы (I).**

**Они влияют на сродство АЦ фермента к S:
А– увеличивают сродство; I– уменьшают.**

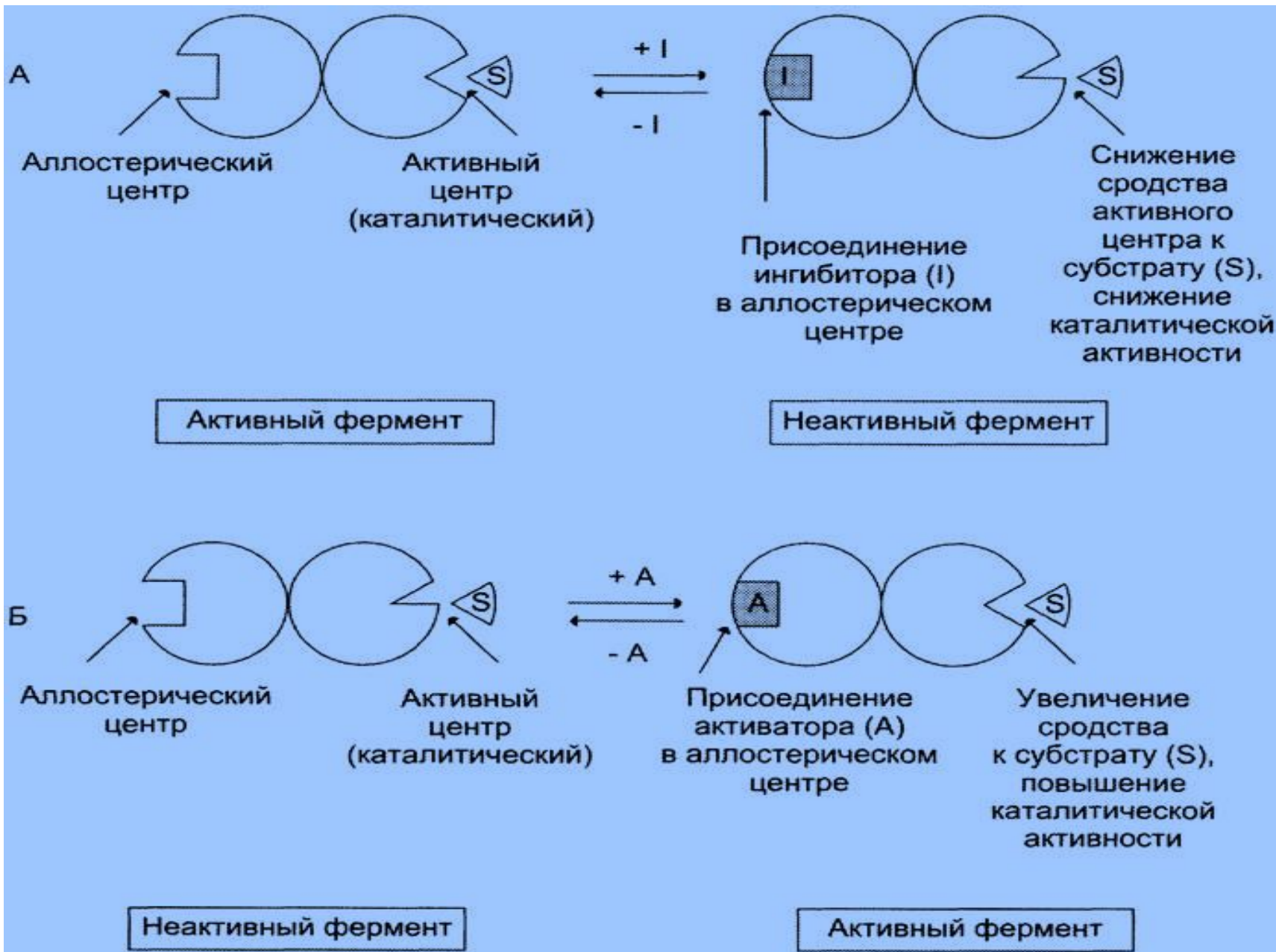
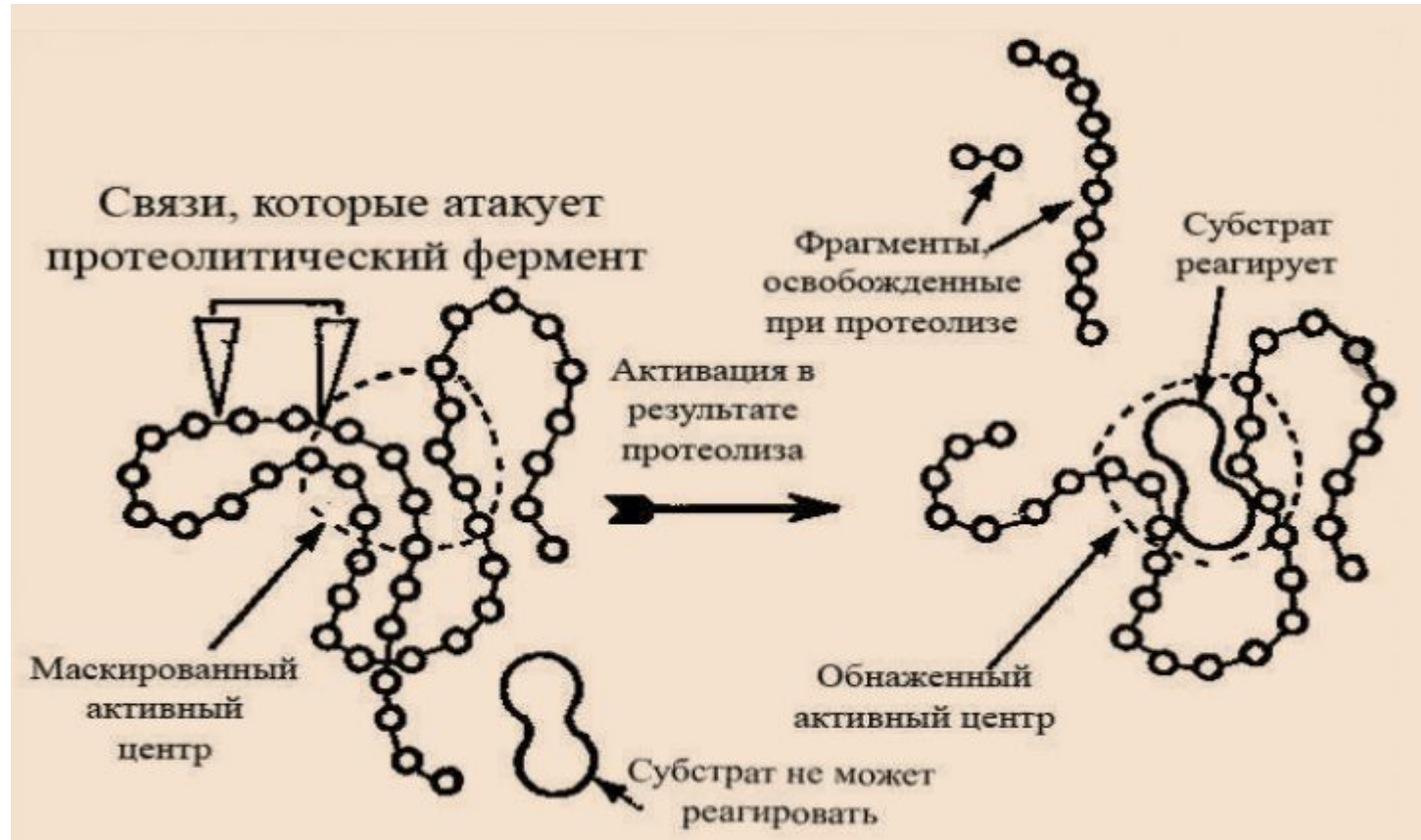


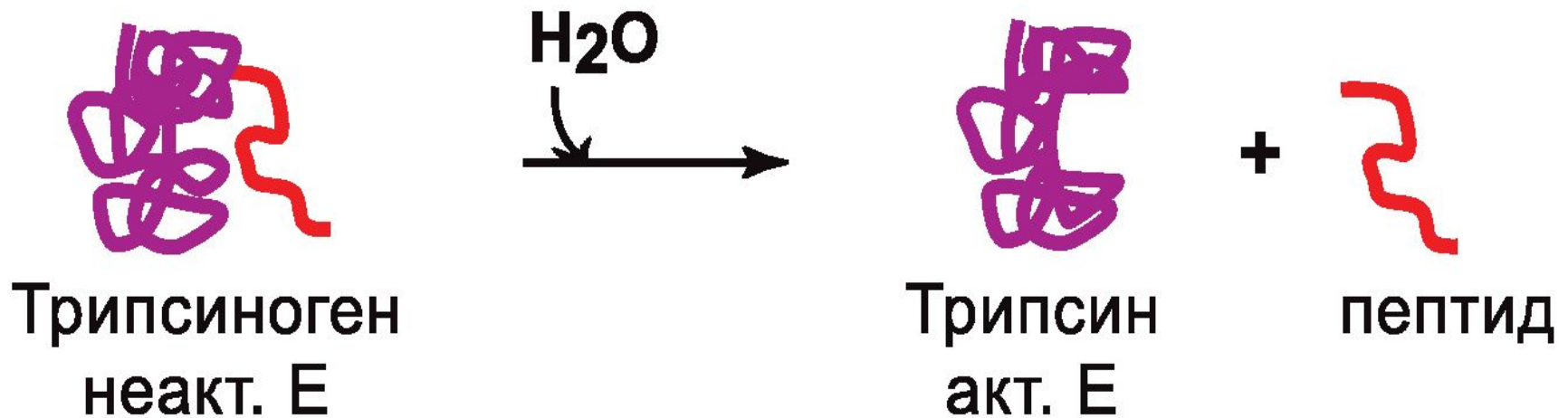
Схема аллостерической регуляции

Частичный протеолиз

- активация фермента через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов.

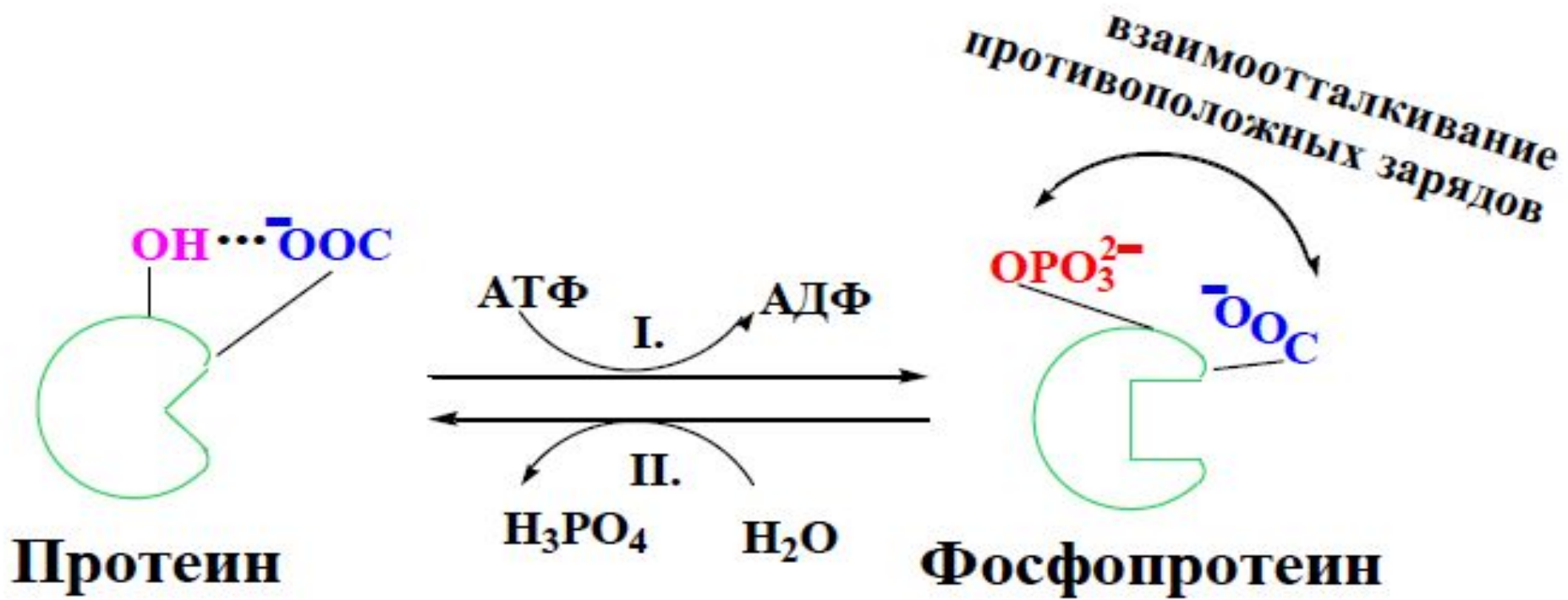


Происходит изменение первичной структуры белка; изменение конформации молекулы, формирование активного центра ; необратимая регуляция.



Подобный механизм позволяет предохранить клетки от повреждения (**пищеварительные ферменты**) или сохранить белок в плазме крови до наступления определенного момента (**факторы свертывания крови, белки системы комплемента и т. п.**).

Фосфорилирование и дефосфорилирование



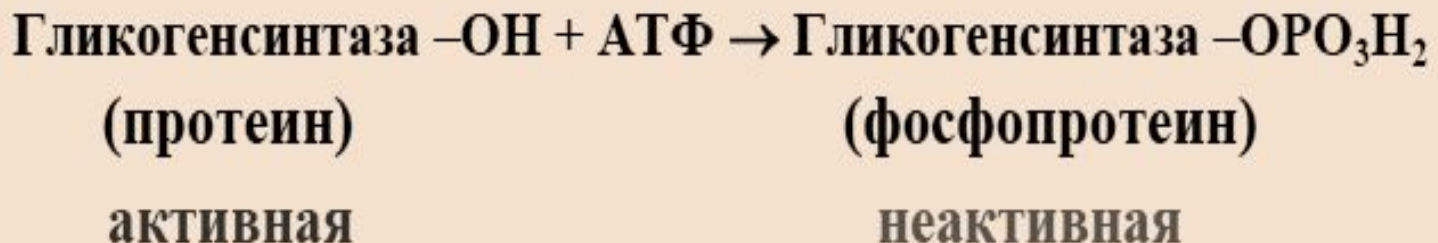
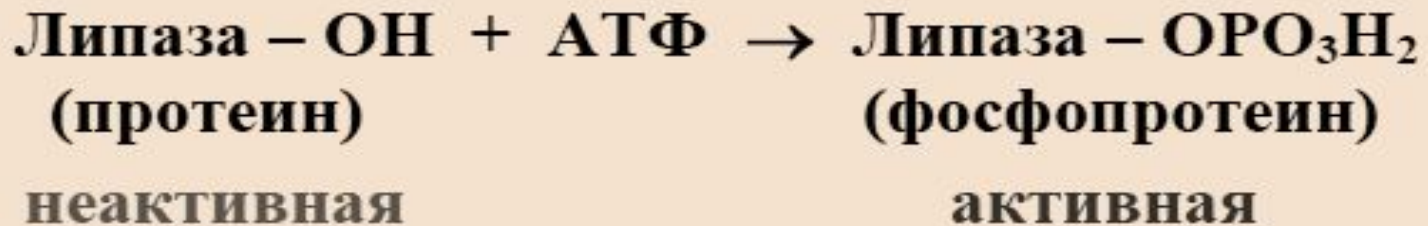
Присоединение остатка фосфорной кислоты приводит к **изменению конформации** активного центра и его каталитической активности.

I. Фосфорилирование – катализируют ферменты:
протеинкиназы (А, С, G и др.);

II. Дефосфорилирование – катализируют ферменты:
протеинфосфатазы.

Это регуляция на уровне **третичной** структуры белка.

Одни ферменты в ходе фосфорилирования активируются, другие, напротив, становятся неактивными.

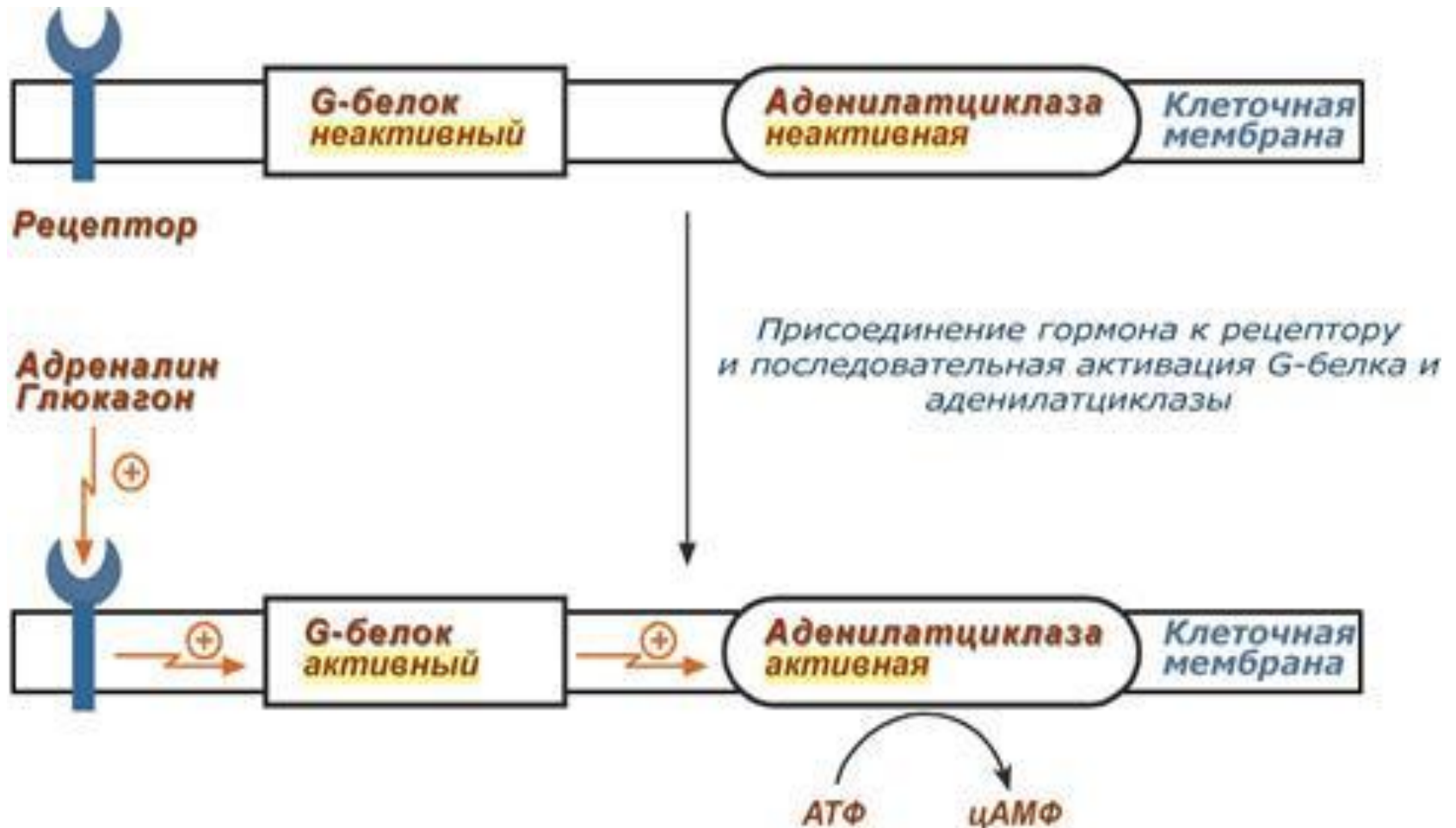


Белок-белковые взаимодействия

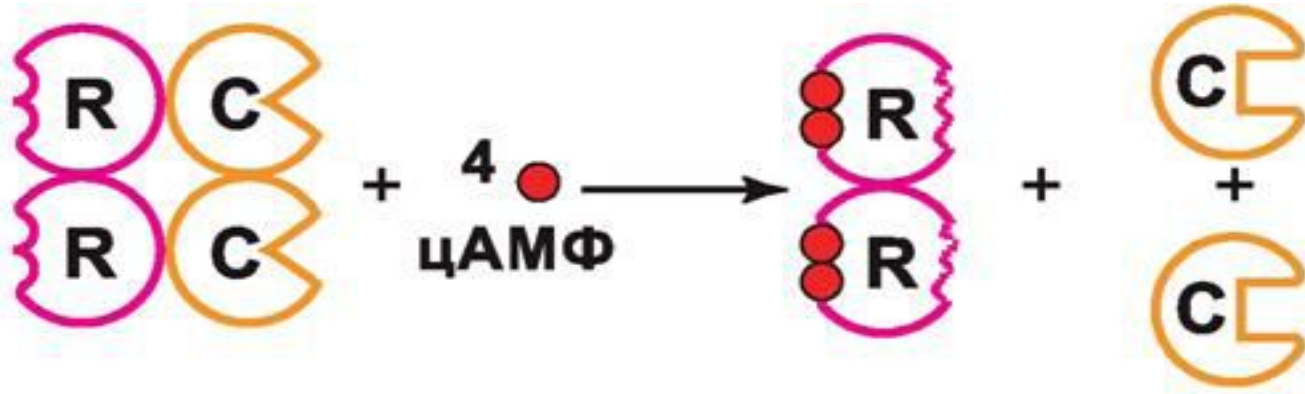
Термин обозначает ситуацию, в качестве регулятора выступают не метаболиты биохимических процессов, а **специфичные белки**.

Это **обратимый механизм** регуляции активности белков-ферментов, который сопровождается **изменением их четвертичной структуры**.

1. Мембранный фермент **аденилатциклаза** является чувствительным к воздействию мембранного **G-белка**, который сам активируется при действии на клетку некоторых гормонов (например, адреналина и глюкагона):



2. Регуляция активности **протеинкиназы А** через механизм ассоциации-диссоциации:



Протеинкиназа А
(неактивная)

Протеинкиназа А
(активная)

Протеинкиназа А является тетрамерным ферментом (2С и 2R). Активатором для протеинкиназы А является **цАМФ**. Присоединение цАМФ к R- субъединицам фермента вызывает их отхождение от С- субъединиц. Каталитические субъединицы при этом активируются.

Инактивация протеинкиназы А

Фермент **фосфодиэстераза** катализирует гидролиз **цАМФ** до **АМФ**, что приводит к сборке тетрамерного комплекса протеинкиназы А, который неактивен.



Ингибиторы фосфодиэстеразы используются:

а) при острой сердечной недостаточности как кардиотонические средства;

б) для лечения бронхиальной астмы.

Пример: препарат Теофиллин.

Механизм действия теофиллина основывается на его способности *ингибировать фермент ФДЭ*, что приводит к повышению концентрации циклического 3-,5-АМФ в тканях и увеличению активности протеинкиназы А.

Это увеличивает сократительную деятельность миокарда, расширяет сосуды; а также оказывает бронхорасширяющий эффект.

Ингибиторы ферментов

Ингибиторы – это вещества полностью или частично подавляющие активность ферментов.

Ингибиторы способны взаимодействовать с ферментами с разной степенью прочности. На основании этого различают **обратимое** и **необратимое ингибирование**.

По механизму действия ингибиторы подразделяют на **конкурентные** и **неконкурентные**.



Обратимые ингибиторы

присоединяются к ферменту слабыми связями и могут легко отделяться от фермента.

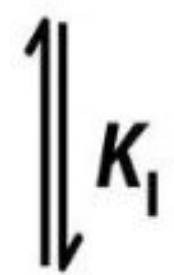
Обратимые конкурентные ингибиторы:

- 1) являются структурными аналогами субстрата;**
- 2) конкурируют с S за связывание с активным центром E;**
- 3) При увеличении концентрации субстрата степень ингибирования уменьшается.**

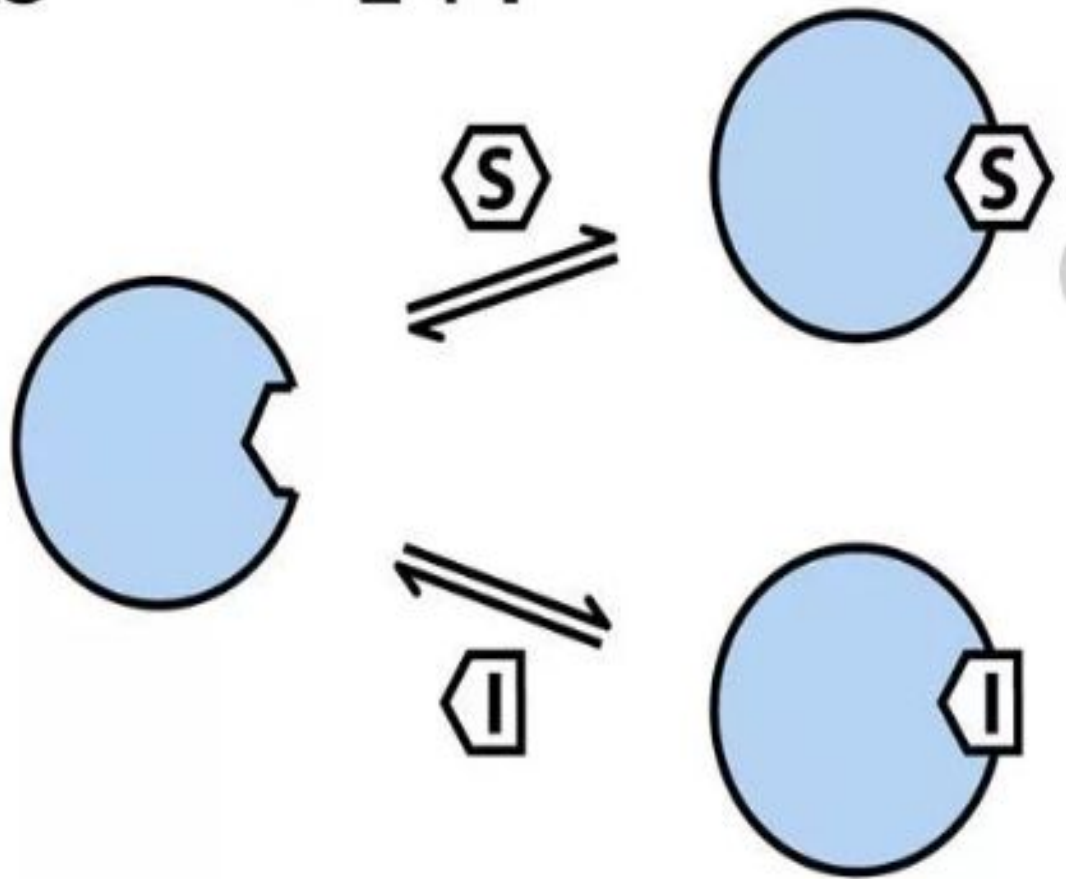
А при избытке субстрата действие ингибитора на фермент практически полностью прекращается.



+
I

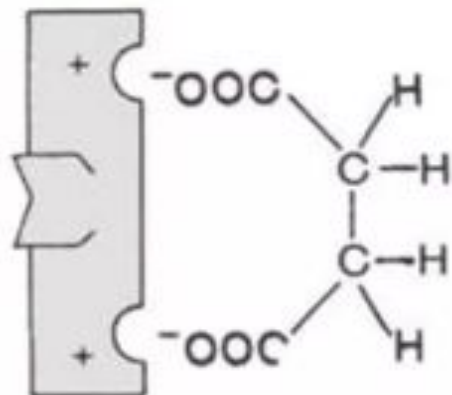


EI

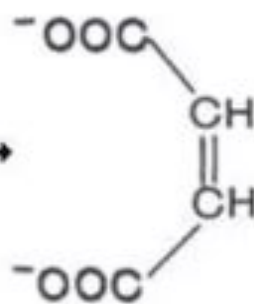


Конкурентный тип ингибирования

Сукцинат-дегидрогеназа

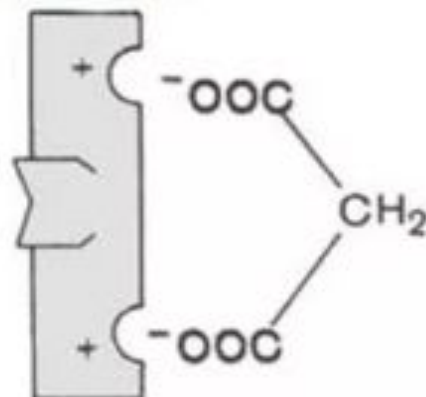


Сукцинат



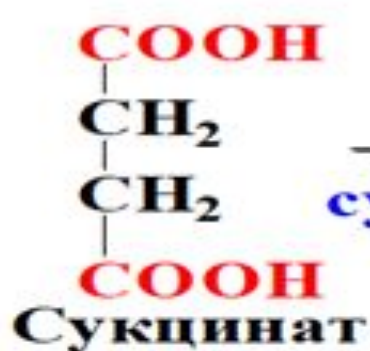
Фумарат

Сукцинат-дегидрогеназа

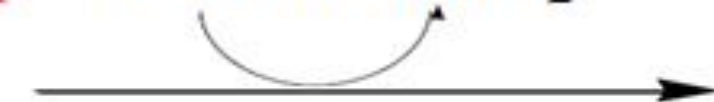


Малонат

Реакция не идет



Сукцинат



сукцинатдегидрогеназа



Фумарат



Малонат

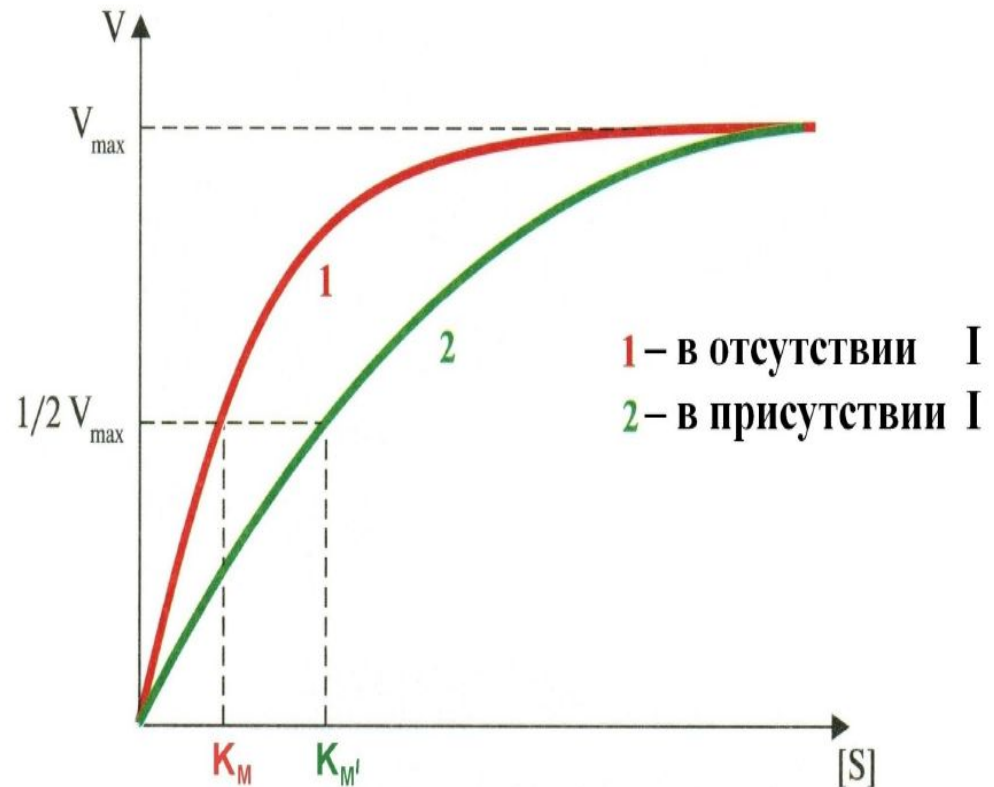


сукцинатдегидрогеназа

Кинетические зависимости

При обратимом конкурентном ингибировании **возрастает K_M** , но, как правило, не меняется максимальная скорость реакции. Это снижает сродство E к S , поскольку присоединению S к АЦ фермента мешает ингибитор.

V_{max} , как правило, **не меняется**, т.к. при большом избытке S ингибитор вытесняется из АЦ фермента и может быть достигнута максимально возможная скорость реакции.



Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы

Прозерин, эндрофоний, дистигмин, галантамин – ингибируют ацетилхолинэстеразу, фермент, разрушающий ацетилхолин, что приводит к накоплению ацетилхолина в окончаниях холинергических нервов и усилению проведения нервного импульса. Ингибиторы холинэстеразы используют при лечении мышечных дистрофий.

Ловастатин, кардиостанин, аторвастанин - ингибируют регуляторный фермент синтеза холестерина ГМГ-S-КоА-редуктазу.

Аллопуринол, средство для лечения подагры, ингибирует ксантиноксидазу.

Сульфаниламидные препараты (аналоги парааминобензойной кислоты), применяют для лечения инфекционных заболеваний.

Обратимые неконкурентные ингибиторы:

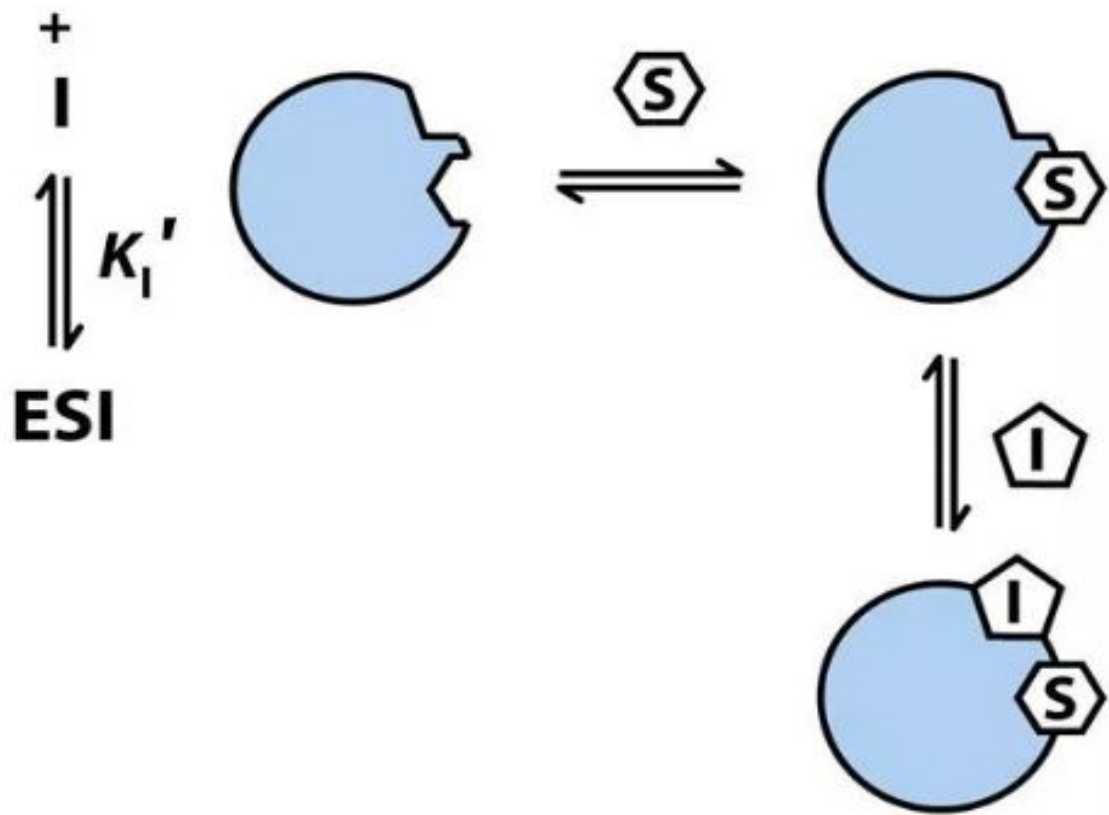
- не являются **структурными аналогами** субстрата;
- не присоединяются к активному центру фермента;
- действуют на аллостерический центр или как химический модификатор;
- могут связываться **либо с ферментом, либо с фермент-субстратным** комплексом, образуя неактивный комплекс;
- вызывают изменение конформации молекулы фермента, нарушая взаимодействие субстрата с активным центром фермента, и хотя субстрат все же присоединяется к E, **катализ**, тем не менее, **оказывается невозможным.**

Степень торможения активности фермента неконкурентными ингибиторами зависит от продолжительности их действия и их концентрации.

При снижении концентрации ингибитора он диссоциирует из комплексов EI, ESI и происходит постепенное восстановление ферментативной активности.

Данное ингибирование не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата.

Например: синильная кислота (цианиды) связывается с гемовым железом ферментов дыхательной цепи и блокирует клеточное дыхание.



Неконкурентный тип ингибирования

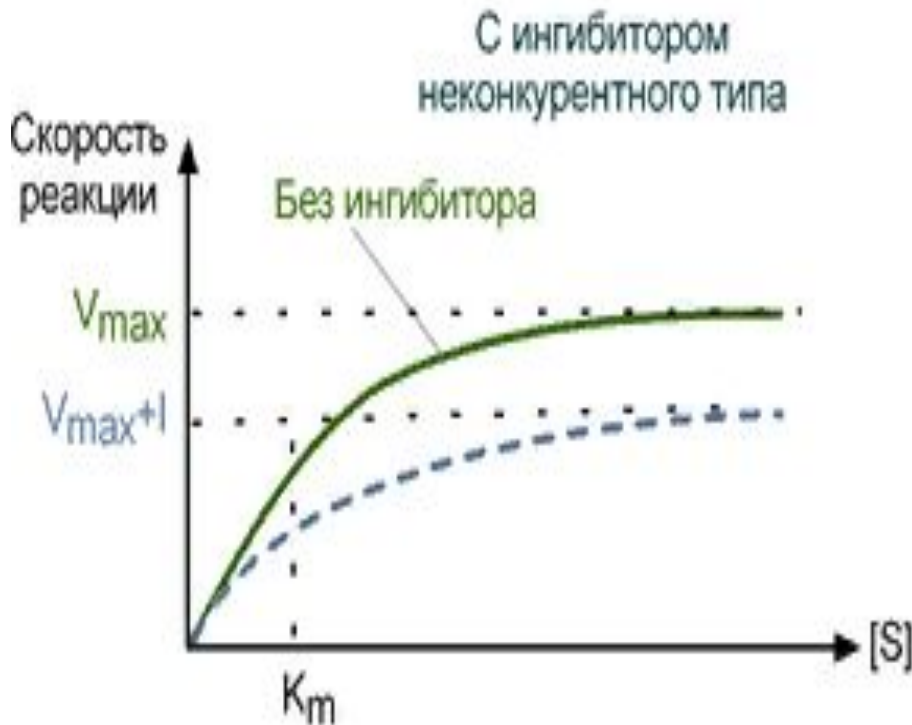
Кинетические зависимости

При обратимом неконкурентном ингибировании **уменьшается V_{\max}** , но, как правило, **не меняется K_M** .

V_{\max} уменьшается, потому что уменьшается кол-во активных молекул Е и часть из них, связанных с I, на время полностью исключается из катализа.

У тех молекул Е, которые не связаны с ингибитором, сродство к S остается прежним.

В ряде случаев K_M может возрасти.



Необратимые ингибиторы

характеризуются тем, что связываются с молекулой фермента **прочными ковалентными связями** (чаще всего модификации подвергается активный центр фермента), вследствие чего фермент не может выполнять каталитическую функцию или происходит **необратимая денатурация** фермента.

Необратимые ингибиторы не имеют физиологического значения (являются **ферментными ядами**).

Использование необратимых ингибиторов представляет большой интерес для выяснения механизма действия ферментов.

Необратимые специфические ингибиторы

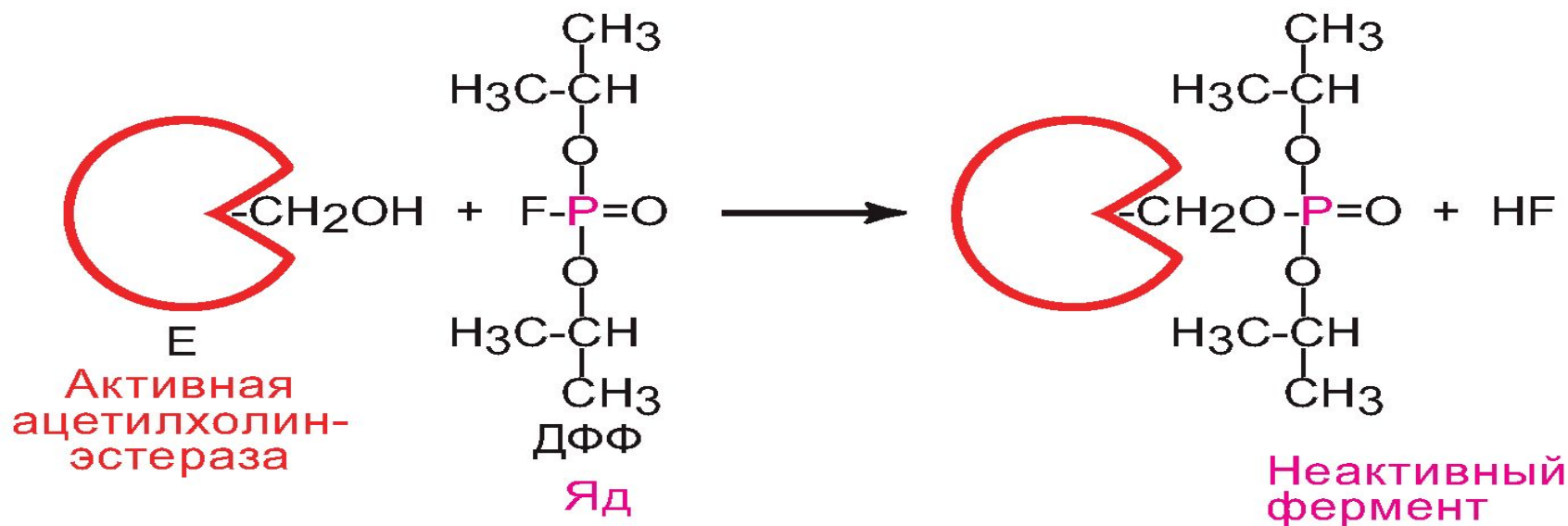
– присоединяются к строго определённой группе в области активного центра Е, образуя с ней **прочные ковалентные связи**.

Диизопропилфторфосфат (ДФФ)

– нервнопаралитический яд, относят к **специфическим необратимым ингибиторам «сериновых» ферментов**, так как он образует ковалентную связь с гидроксильной группой серина, находящегося в активном центре и играющего ключевую роль в процессе катализа.

Остаток Сер, способный реагировать с ДФФ, имеет идентичное или очень сходное аминокислотное окружение. **Высокая реакционная способность** этого остатка по сравнению с другими остатками Сер **обусловлена аминокислотными остатками**, также входящими в активный центр ферментов.

ДФФ ингибирует АХЭ, которая участвует в передаче нервных импульсов от нейрона к нейрону. Ингибирование этого фермента предотвращает распад АХ в синаптической щели, в результате чего медиатор продолжает оказывать воздействие на свои рецепторы, что бесконтрольно усиливает холинергическую реакцию. На его основе синтезированы многие **инсектициды, БОВ – зоман, зарин.**

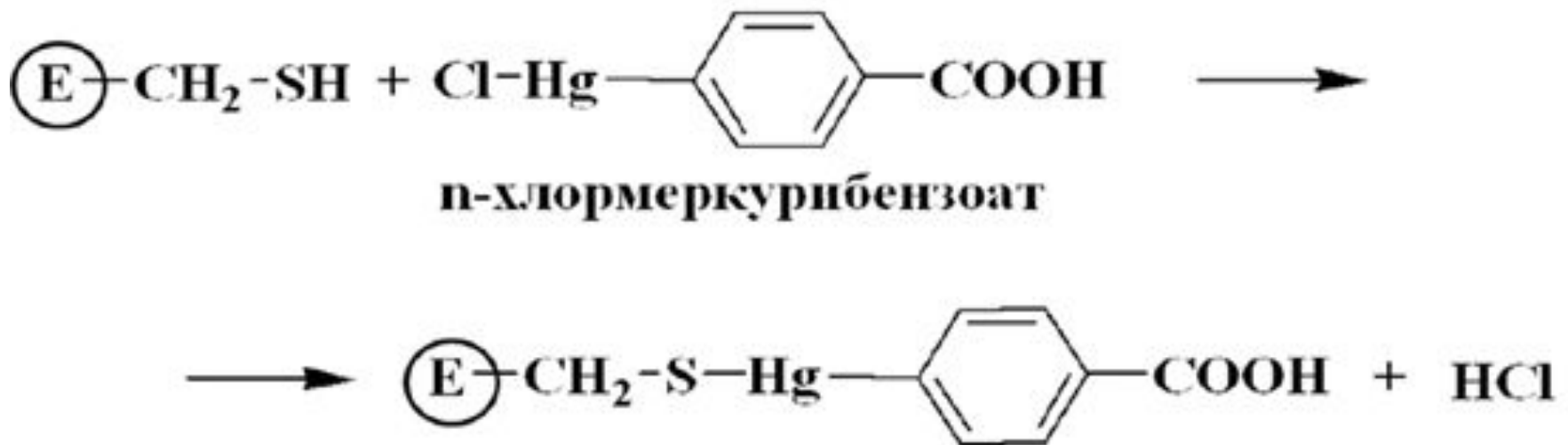


Неспецифические ингибиторы

образуют прочную ковалентную связь с группами, расположенными **в любом участке фермента** (довольно часто: вне области активного центра). Они не специфичны к определенным ферментам.

Сюда же относятся соли тяжелых металлов, образующие плохо растворимые комплексы и в больших дозах вызывающие **необратимую денатурацию** фермента.

Например, п-хлормеркурибензоат присоединяется к свободным SH-группам **любых** ферментов. Его действие неспецифично.



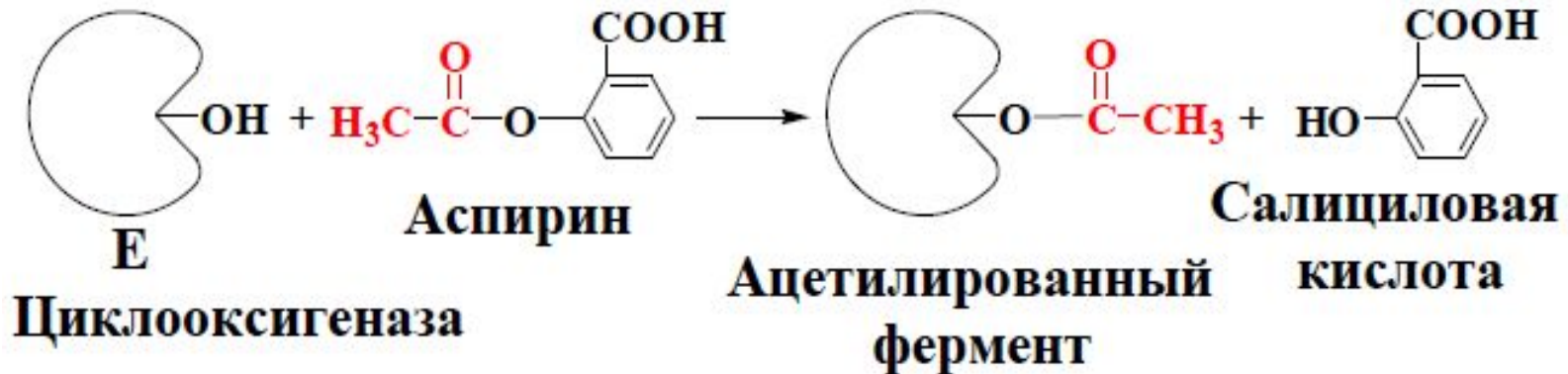
Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты

Аспирин (ацетилсалициловая кислота)

— лекарственный препарат, действие которого основано на необратимом ингибировании ключевого фермента синтеза простагландинов — **циклооксигеназы**.

Присоединение ацетильной группы к гидроксильной группе серина в активном центре фермента вызывает инактивацию последнего и прекращение синтеза простагландинов.

Синтез простагландинов восстанавливается только после синтеза новых молекул фермента.



Изоферменты – это молекулярные формы одного и того же фермента, возникшие в результате небольших генетических различий в первичной структуре фермента, но катализирующие **одну и ту же реакцию**.

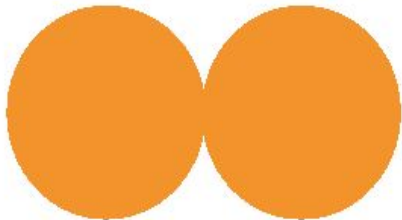
Изоферменты отличаются:

- локализацией;
- электрофоретической подвижностью;
- сродством к субстрату;
- V_{max} катализируемой реакции;
- чувствительностью к ингибиторам и активаторам,
- условиями работы (оптимум pH и температуры).

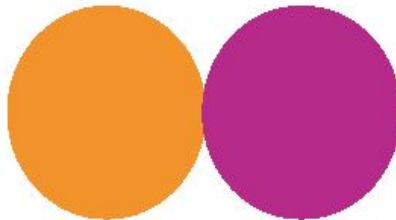
Как правило, это олигомерные белки, состоящие из разного набора субъединиц.

Креатинкиназа

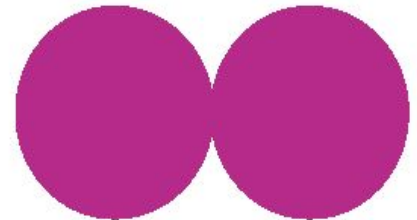
- димерный фермент, представлен тремя изоферментными формами из двух типов субъединиц: **М** (англ. *muscle* – мышца) и **В** (англ. *brain* – мозг). **Креатинкиназа-1 (КК-1)** состоит из субъединиц типа **В** и локализуется в головном мозге. **Креатинкиназа-2 (КК-2)** – содержит по одной **М**- и **В**-субъединице, наиболее активна в миокарде. **Креатинкиназа-3 (КК-3)** содержит две **М**-субъединицы, специфична для скелетной мышцы.



ВВ (КК₁)
(Головной
мозг)



ВМ (КК₂)
(Сердце)



ММ (КК₃)
(Скелетные
мышцы)

Лактатдегидрогеназа

–тетрамер, состоящий из 2-х типов субъединиц (англ. heart - сердце) и М (англ. muscle - мышца).

Н

ЛДГ₁ (Н₄) и ЛДГ₂ (Н₃М₁) присутствуют в тканях с аэробным обменом (миокард, мозг, корковый слой почек).

ЛДГ₄ (Н₁М₃) и ЛДГ₅ (М₄) находятся в тканях, склонных к анаэробному обмену (печень, скелетные мышцы, кожа, мозговой слой почек).

ЛДГ₃ (Н₂М₂) - фракция сосредоточена в основном в легочной ткани, а также в селезенке, поджелудочной железе, надпочечниках, лимфатических узлах).

