

# Энзимология III

## Регуляция активности ферментов

Доцент медицинской биохимии  
к.м.н. **Е.И. Паличева**

Кемерово 2020

- **Общие принципы и способы регуляции активности ферментов**
- **Стадии ферментативного катализа**
- **Механизм действия ферментов**
- **Понятие об активаторах и ингибиторах**
- **Виды ингибирования**
- **Регуляция путем ковалентной модификации**
- **Аденилатциклазная система**
- **Регуляция путем частичного, избирательного протеолиза**
- **Проферменты**
- **Изоферменты**
- **Компартментализация**

# Роль РЕГУЛЯЦИИ ферментативных реакций

- В живой клетке множество разнообразных соединений, но реакции между ними не беспорядочны, а образуют строго определенные метаболические пути, характерные для данной клетки. Индивидуальность клетки в большой степени определяется уникальным набором ферментов, который она генетически запрограммирована производить. Отсутствие даже одного фермента или какой-нибудь его дефект (изменение активности) могут иметь очень серьезные отрицательные последствия для организма.

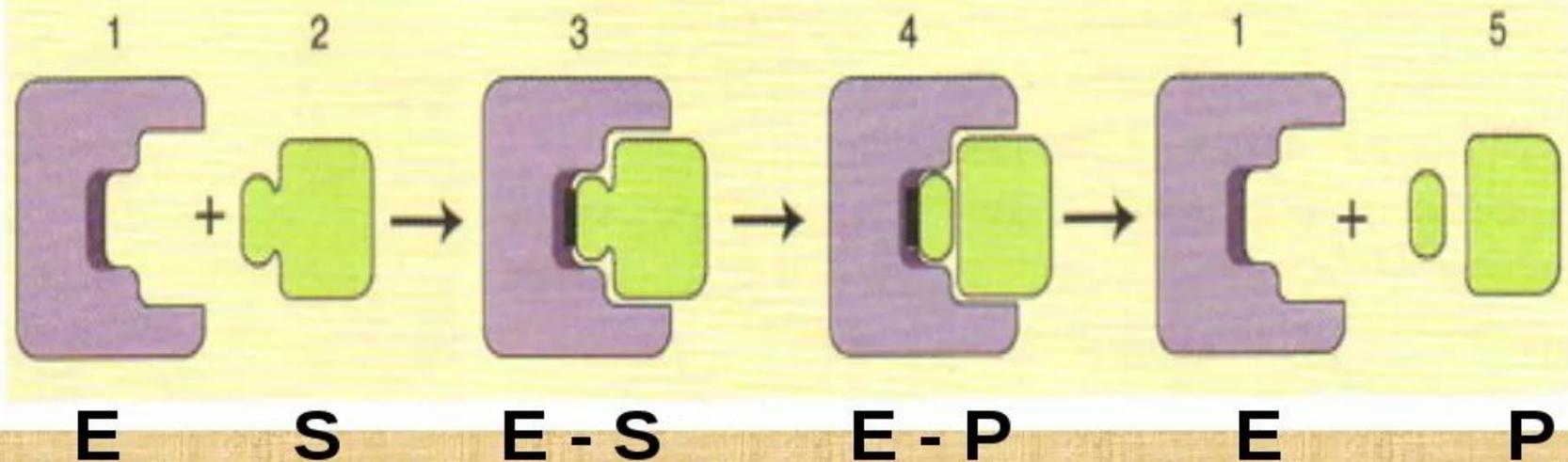
# Основные принципы и механизмы регуляции ферментативных реакций

- регулирование скорости ферментативной реакции путем изменения количества фермента
- регулирование скорости ферментативной реакции путем изменения каталитической активности фермента
- регулирование скорости реакции путем изменения количества субстрата

# СТАДИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

- $E + S$  - узнавание ферментом (E) субстрата (S)
- $ES$  – образование комплекса и химическая модификация  
 $EP$  (превращение S в P)
- $E + P$  – Высвобождение E и P

# Механизм действия фермента



**E** – фермент

**S** – субстрат

**P** – продукты реакции

**E-S** – фермент-субстратный комплекс

**E-P** – фермент-продуктный комплекс

## Механизмы действия ферментов

- Первоначальным событием при действии фермента является его специфическое связывание с лигандом - субстратом (S). Это происходит в области активного центра, который формируется из нескольких специфических R-групп аминокислот, определенным образом ориентированных в пространстве.

# ТЕОРИЯ ЖЕСТКОЙ МАТРИЦЫ

- **Теория Фишера** (модель "жесткой матрицы", "ключ-замок") – активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.

# ТЕОРИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

В 1958 г. Дениел Кошланд предложил модель индуцированного взаимодействия.

- Ферменты, в основном, — не жесткие, а гибкие молекулы. **Активный центр фермента может изменить конформацию после связывания субстрата.** Боковые группы аминокислот активного центра принимают такое положение, которое позволяет ферменту выполнить свою каталитическую функцию.
- В некоторых случаях молекула субстрата также меняет конформацию после связывания в активном центре. Модель индуцированного соответствия объясняет не только специфичность ферментов, но и стабилизацию переходного состояния. Эта модель получила название «**рука-перчатка**».

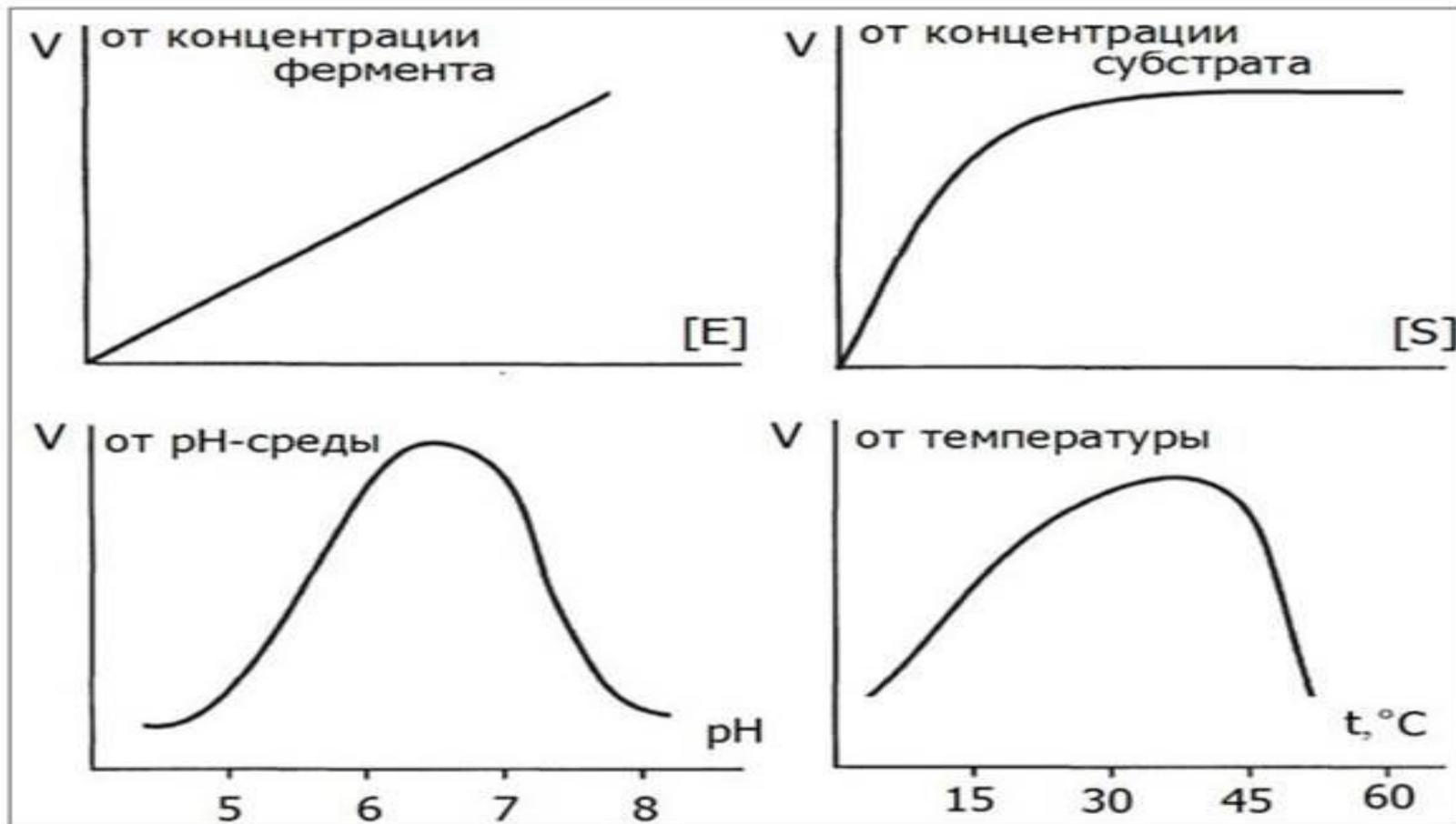
# Кинетические свойства ферментов

- Кинетика ферментативных реакций – наука о скоростях ферментативных реакций, их зависимости от различных факторов. Скорость ферментативной реакции определяется химическим количеством прореагировавшего субстрата или образовавшегося продукта реакции в единицу времени в единице объема при определенных условиях:

$$v = \Delta c / t$$

- где  $v$  – скорость ферментативной реакции,  $\Delta c$  – изменение концентрации субстрата или продукта реакции,  $t$  – время.

# Зависимость скорости ферментативной реакции от условий



# Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

**Термолабильность** (Оптимальная температура для действия ферментов 37-40°C. При температуре 50°C фермент инактивируется из-за денатурации белковой структуры)



Зависимость скорости ферментативной реакции ( $V$ ) от температуры

Оптимум pH соответствует максимальной степени ионизации функциональных групп фермента ( для большинства ферментов около 7.0, но есть исключения...)

## Влияние pH на активность фермента



# Регуляция ферментативной активности

эффекторы- регуляторы  
активности ферментов

ингибиторы

активаторы

# ВИДЫ ИНГИБИРОВАНИЯ

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**.

# Ингибиторы ферментов

- Действие ферментов можно полностью или частично подавить (ингибировать) определенными химическими веществами (ингибиторами). По характеру действия ингибиторы могут быть обратимыми и необратимыми. В основе этого деления лежит прочность соединения ингибитора с ферментом. Другой способ деления ингибиторов основывается на характере места их связывания. Одни из них **связываются** с ферментом в **активном центре**, а другие - в удаленном от активного центра месте. Они могут связывать и блокировать функциональную группу молекулы фермента, необходимую для проявления его активности. При этом они необратимо, часто **ковалентно**, связываются с ферментом или фермент - субстратным комплексом и **необратимо** изменяют нативную конформацию. Это, в частности, объясняет действие  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , соединений мышьяка.
- *Пример*, диизопропилфторфосфат ингибирует ферменты, имеющие серин в активном центре. Таким ферментом является ацетилхолинэстераза, катализирующая следующую реакцию:

Диизопропилфторфосфат ингибирует фермент, ацетилхолинэстеразу, имеющие серин в активном центре.

Ацетилхолинэстераза



**П** ацетилхолин

ацетат

холин

**О** функционирует как  
нейромедиатор

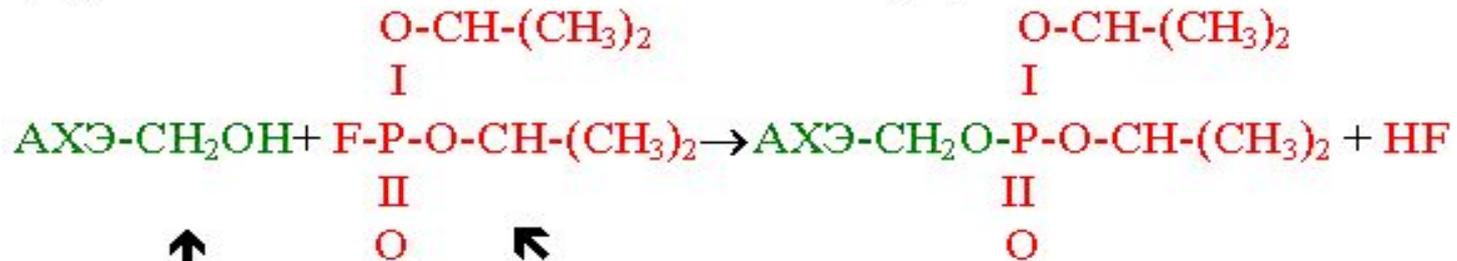
*продукты распада,  
не способные действовать как  
нейромедиаторы*

- Реакция проведения нервного импульса (происходит каждый раз, прежде чем второй импульс будет передан через синапс).

**Диизопропилфторфосфат** - отравляющее вещество нервно-паралитического действия ( пример НЕОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ).

**Активный фермент**

**Неактивный фермент**



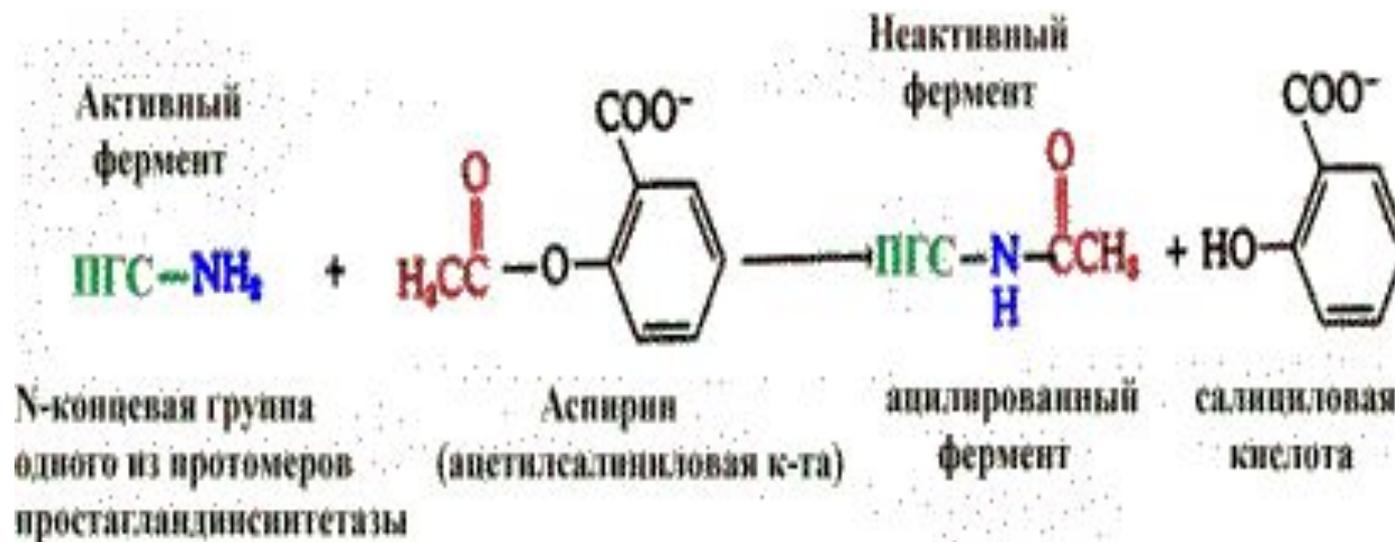
↑  
*R-группа в активном центре ацетилхолинэстеразы*

↖  
*Диизопропилфторфосфат*

# Механизм действия ацетилсалициловой кислоты (необратимое ингибирование)

- Терапевтическое действие **аспирина** как жаропонижающего и противовоспалительного средства объясняется тем, что аспирин ингибирует фермент, катализирующий синтез простагландинов.
- Простагландины - вещества, участвующие в развитии воспаления. Ингибирование обусловлено ковалентной модификацией одной из аминокислотных групп фермента – **циклооксигеназы** (простагландинсинтетазы).

# Механизм действия ацетилсалициловой кислоты



## Обратимые ингибиторы

- Существует два типа обратимых ингибиторов - **конкурентные** и **неконкурентные**.
- Конкурентный ингибитор конкурирует с субстратом за связывание с активным центром. Это происходит потому, что ингибитор и субстрат имеют сходные структуры.

# Конкурентное ингибирование

- В отличие от субстрата связанный с ферментом конкурентный ингибитор не подвергается ферментативному превращению. Более того, образование EI уменьшает число молекул свободного фермента, и скорость реакции снижается. Связывание S и I происходит взаимоисключающим образом. Образуется либо ES, либо EI, но не EIS.

- Так как конкурентный ингибитор обратимо связывается с ферментом, то можно сдвинуть равновесие реакции  $E + I \leftrightarrow EI$  влево простым увеличением концентрации субстрата.



*Пример:* сульфамидные препараты, используемые для лечения инфекционных болезней.

**Сульфаниламиды** – это структурные аналоги **парааминобензойной кислоты**, из которой в клетке микроорганизма синтезируется кофермент (Н4 - фолат - ТГФК), участвующий в биосинтезе нуклеотидов и нуклеиновых оснований. Нарушение синтеза нуклеиновых кислот приводит к нарушению синтеза жизненноважных белков и к гибели микроорганизмов.

# Механизм действия сульфаниламидных препаратов



*Сульфаниламид -  
конкурентный ингибитор*

*Субстраты,  
в том числе  
п-аминобензойная  
кислота*



*Фолиевая  
кислота*

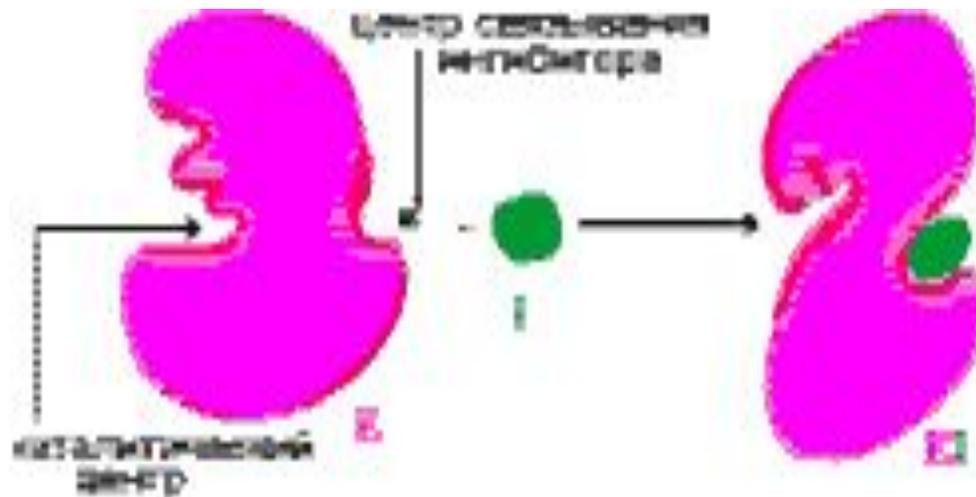
*H<sub>4</sub> - фолат  
Кофермент*



**Неконкурентное обратимое ингибирование** - ингибиторы присоединяются к ферменту не в активном центре, а в другом месте

Не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата

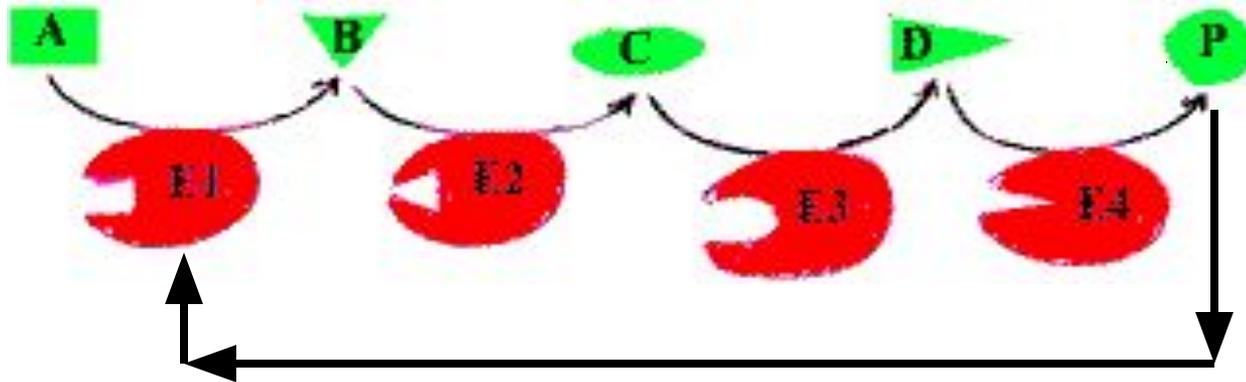
- $E + I \leftrightarrow EI$ ;
- $ES + I \rightarrow ESI$ .



- В живой клетке множество разнообразных соединений, но реакции между ними не беспорядочны, а образуют строго определенные метаболические пути, характерные для данной клетки. Индивидуальность клетки в большой степени определяется уникальным набором ферментов, который она генетически запрограммирована производить. Отсутствие даже одного фермента или какой-нибудь его дефект могут иметь очень серьезные отрицательные последствия для организма.

## В живой клетке скорость ферментативных реакций находится под строгим контролем

Метаболическая цепь: A, B, C, D - метаболиты, E1, E2, E3, E4 - ферменты



Это позволяет каждой метаболической цепочке реакций постоянно изменяться, приспосабливаясь к меняющимся потребностям клетки в продукте.

- В каждой метаболической цепи есть фермент, который задает скорость всей цепочке реакций.

Он называется **регуляторным ферментом**.

Существует несколько способов регуляции действия ферментов:

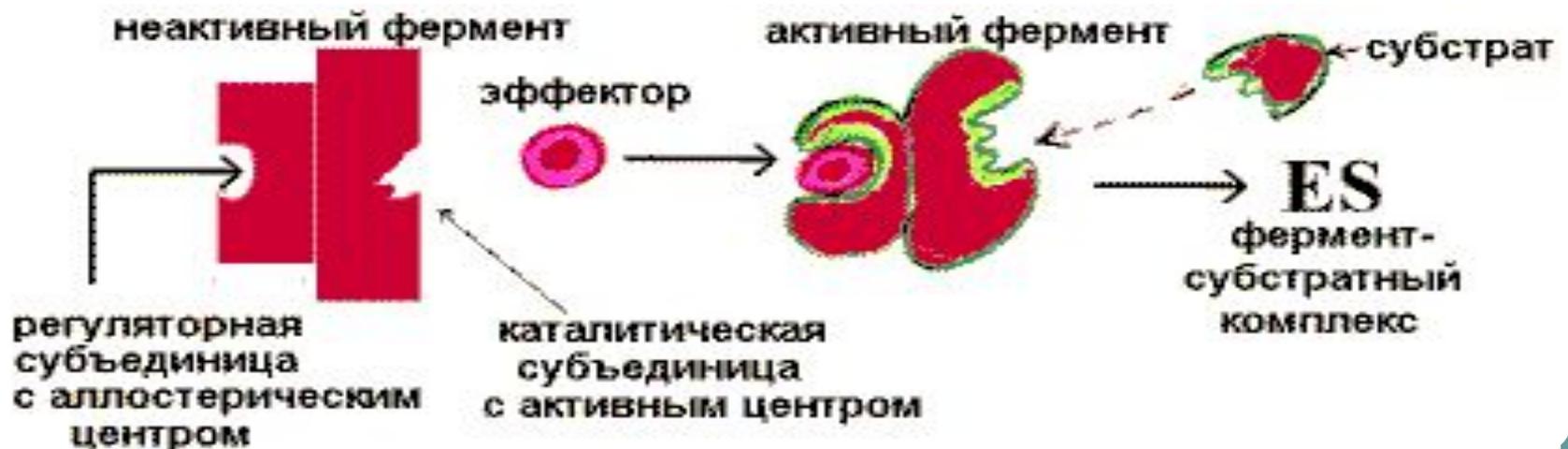
- изменение **активности фермента** при его постоянной концентрации;
- изменение **концентрации фермента**, обычно в результате ускорения (индукции) или торможения (репрессии) синтеза фермента.

## Основные способы изменения активности ферментов

- **Аллостерическая регуляция.**
- **Регуляция активности ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования (путем ковалентной модификации).**
- **Регуляция путем ассоциации-диссоциации субъединиц в олигомерном ферменте**
- **Активация ферментов путем частичного протеолиза.**

## Аллостерическая регуляция активности фермента

«Сообщение» о присоединении аллостерического активатора передается посредством конформационных изменений каталитической субъединицы, которая становится комплементарной субстрату, и фермент «включается». При удалении активатора или при присоединении аллостерического ингибитора фермент переходит в неактивную форму и «выключается». Аллостерическая регуляция является основным способом регуляции метаболических путей.



# Регуляция активности ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования

Фермент изменяет активность в результате **ковалентной модификации**.



Регуляция активности липазы

## Регуляция путем ассоциации-диссоциации субъединиц в олигомерном ферменте

- Этот процесс иногда начинается с ковалентной или нековалентной модификации одной из субъединиц.
- Например, фермент протеинкиназа в неактивной форме построена как тетрамер  $R_2C_2$  (R и C - разные субъединицы). Активная протеинкиназа представляет собой субъединицу C, для освобождения которой необходима диссоциация комплекса.
- Активация фермента происходит при участии цАМФ (циклоаденозинмонофосфорная кислота), которая способна присоединиться к субъединице R, после чего изменяется конформация, комплементарность субъединиц R и C и происходит диссоциация комплекса:

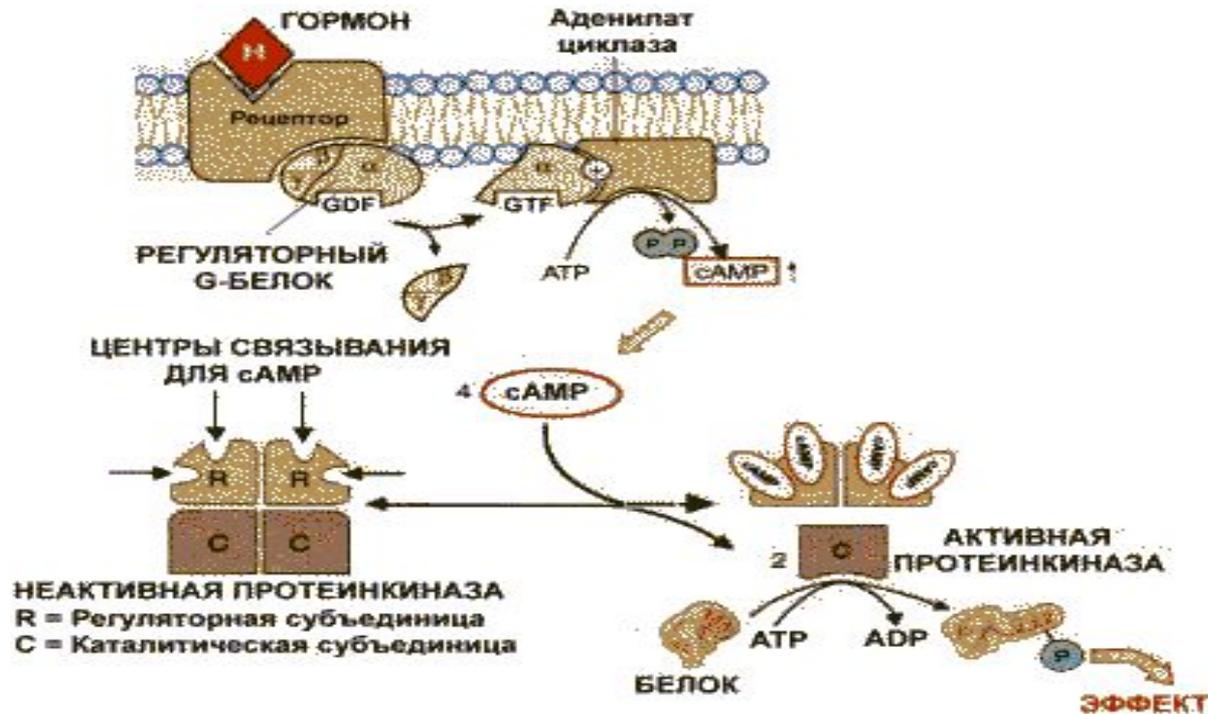


- Циклический АМФ является продуктом АТФ, превращение которой катализирует фермент аденилатциклаза:



# Аденилатциклазная система

- **Аденилатциклаза и протеинкиназа катализируют взаимосвязанные реакции, которые составляют единую регуляторную систему.**



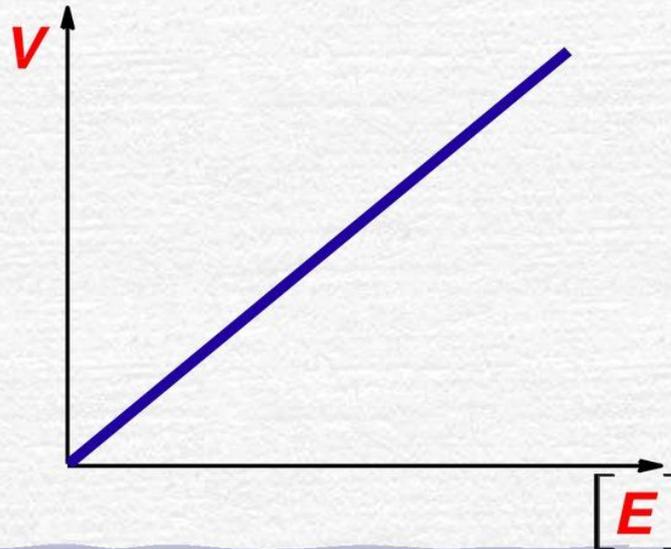
## В живой клетке скорость ферментативных реакций зависит от количества ферментов

- Количество фермента в клетке определяется **соотношением скоростей его синтеза и распада**. Этот способ регуляция скорости ферментативной реакции является более медленным процессом (проявляется спустя несколько часов), чем регуляция активности фермента (практически мгновенный ответ).

- Между количеством фермента и скоростью ферментативной реакции существует прямая зависимость, т.е. с увеличением количества фермента скорость реакции увеличивается при условии молярного избытка субстрата.
- Количество фермента увеличивается либо в результате повышения скорости его синтеза, либо снижения скорости распада, либо обоими процессами сразу. В свою очередь синтез фермента зависит от состояния механизмов индукции и репрессии. **Индукция** – это усиление синтеза ферментов, а **репрессия** – это подавление синтеза ферментов. Распад ферментов осуществляется тканевыми протеиназами.

С увеличением количества фермента скорость реакции увеличивается прямопропорционально

Зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации фермента



## Контроль количества фермента

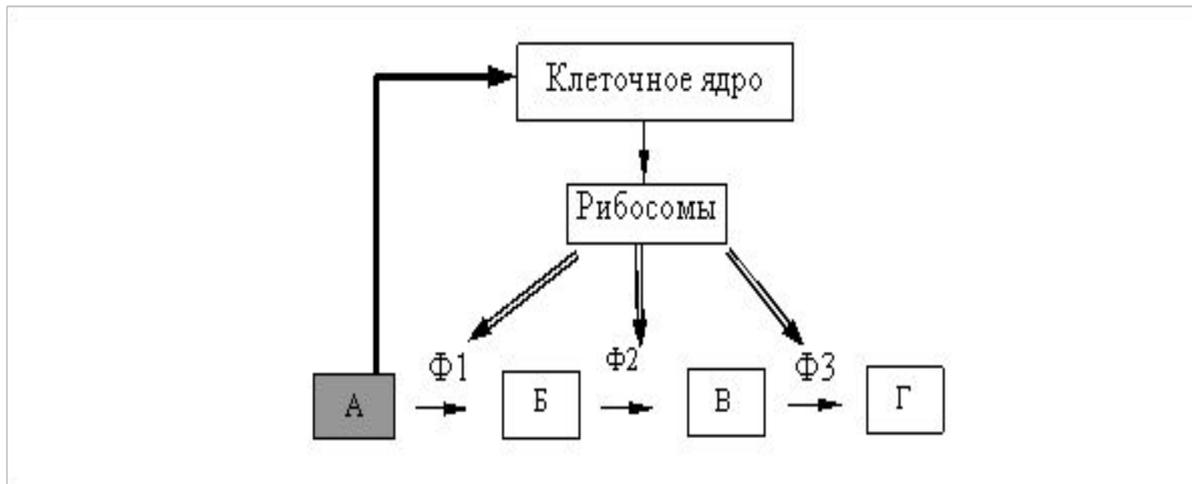
- Путь регуляции ферментативных реакций через изменение количества фермента является путем длительной адаптации метаболических процессов в организме, требует для своего осуществления часы и дни и включения генетического аппарата. Выделяют **конститутивные** ферменты, которые синтезируются с постоянной скоростью и адаптативные (**индуцибельные**) ферменты, синтез которых начинается при поступлении в организм субстратов или других регуляторов, необходимых для разблокировки соответствующих генов.

## Индукцибельные ферменты - ферменты адаптации

- К **индукцибельным** ферментам относят ферменты метаболизма чужеродных веществ (**монооксигеназы**), синтез которых начинается при поступлении в организм токсических соединений, или ферменты **глюконеогенеза**, синтез которых усиливается при увеличении потребности организма в глюкозе. Пусковым звеном в этих процессах чаще всего выступают сами субстраты, гормоны (стероидные), которые непосредственно регулируют активность генов, или циклические нуклеотиды (цАМФ, цГМФ), которые активируют целые ферментные каскады.

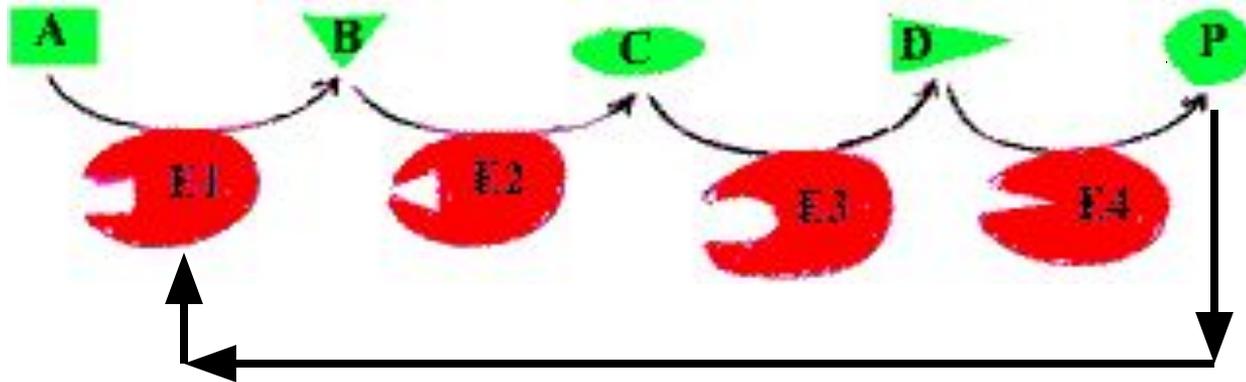
# Схема индукции ферментов

- Субстрат А, присутствующий в высокой концентрации, стимулирует синтез ферментов  $\Phi 1$ ,  $\Phi 2$  и  $\Phi 3$ , участвующих в реакциях его метаболизма (распада), через промежуточные продукты Б и В, до конечного продукта Г



## Схема репрессии синтеза ферментов

Метаболическая цепь: A, B, C, D - метаболиты, E1, E2, E3, E4 - ферменты



Продукт реакции репрессирует синтез ферментов начальных этапов его образования (*пример: холестерол в избытке снижает синтез ОМГ КоА редуктазы и синтеза самого эндогенного холестерола*).

## Активация ферментов путем частичного протеолиза

Некоторые ферменты синтезируются первоначально неактивными и лишь после секреции из клетки переходят в активную форму. Неактивный предшественник называется **проферментом**. Активация профермента включает модификацию первичной структуры с одновременным изменением конформации.

**Пример**, трипсиноген, синтезированный в поджелудочной железе, затем в кишечнике превращается в трипсин путем удаления фрагмента с N-конца:

**трипсиноген**  $\xrightarrow{\text{энтеропептидаза}}$  **трипсин** + Val-(Asn) -Lys

Расщепление определенных пептидных связей «запускает» новые взаимодействия R-групп по всей молекуле, приводя к новой конформации, в которой R-группы активного центра занимают оптимальное положение для катализа.

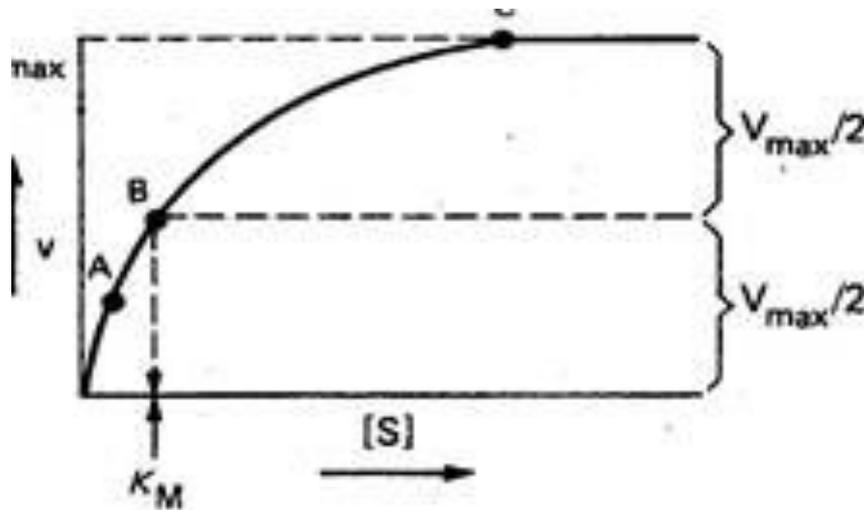
## Зависимость между количеством субстрата и скоростью ферментативной реакции

В физиологическом диапазоне концентраций существует прямая зависимость между количеством субстрата и скоростью ферментативной реакции, т.е. при увеличении концентрации субстрата и сохранении всех остальных условий скорость ферментативной реакции увеличивается.

Это может продолжаться до тех пор, пока не произойдет полного насыщения фермента субстратом, в этом случае в комплексе с субстратом будут находиться все молекулы фермента и дальнейшего повышения скорости реакции не будет. В физиологических условиях насыщающих концентраций, как правило, не наблюдается, поэтому изменением уровня субстрата можно изменить скорость реакции, как в сторону повышения, так и в сторону уменьшения.

## Содержание субстрата в клетке зависит от следующих факторов:

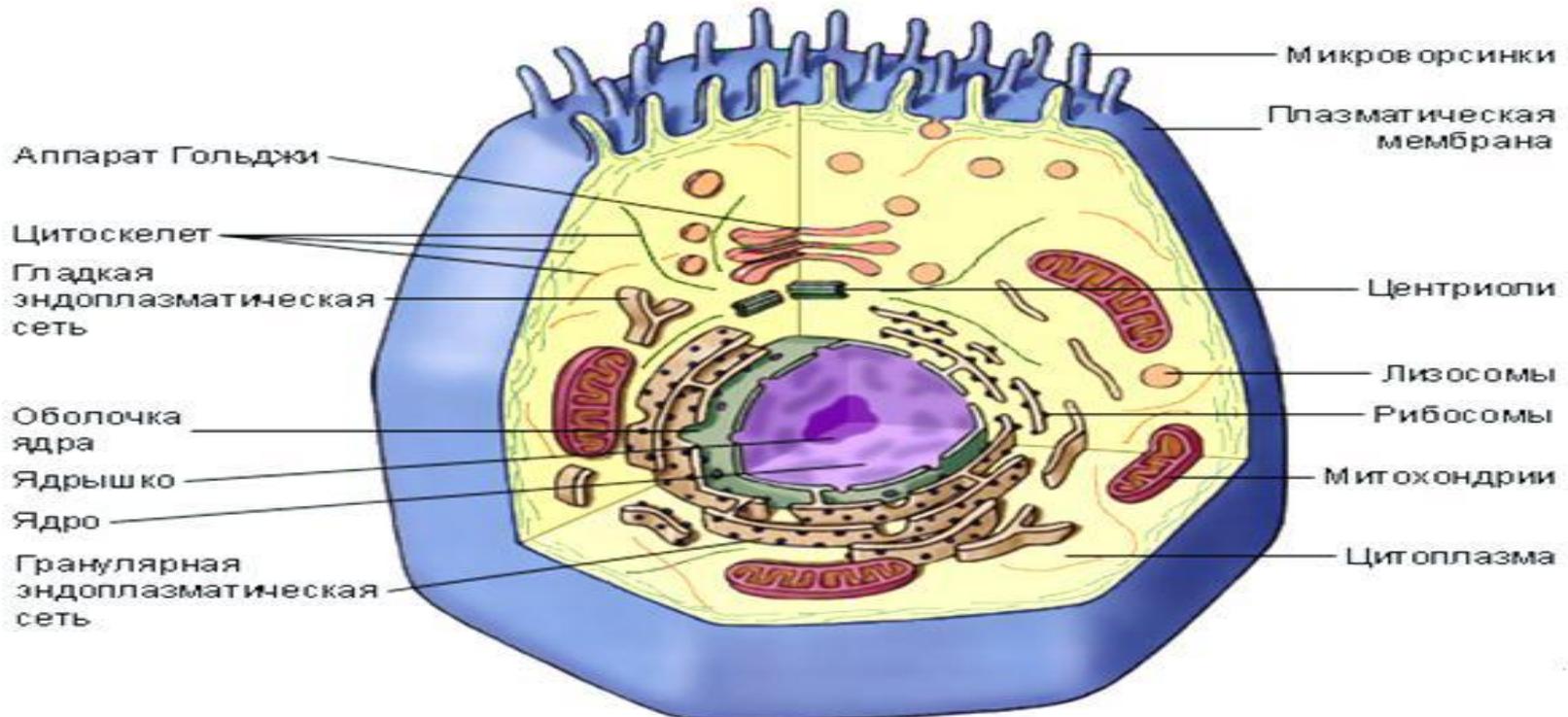
1. от состояния проницаемости мембран для субстратов, поступающих извне в данный компартмент клетки
2. от скорости предыдущей реакции, продукт которой является субстратом для данной реакции
3. от конкуренции ферментов за общий субстрат



*График зависимости скорости ферментативной реакции от количества субстрата.*

# Компартментализация

Регуляция химических реакций осуществляется также за счет пространственного отделения внутриклеточными мембранами одних процессов от других. *Например:* мембраны лизосом ограничивают проникновение лизосомальных гидролаз в другие отделы клеток.



# Изоферменты

- **Изоферменты** - это множественные формы ферментов, которые катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по физико-химическим свойствам и локализации в тканях. Для энзимодиагностики проводят определение активности изоферментов.
- Пример: Изоферменты **лактатдегидрогеназы ЛДГ**.  
Активность ЛДГ1 и ЛДГ2 увеличивается при инфаркте миокарда, активность ЛДГ4 и ЛДГ5 - при заболеваниях печени и скелетных мышц, активность ЛДГ3 - при заболеваниях почек и селезенки.
- *Пример:* Изоферменты **креатинкиназы КК**.  
В крови чаще всего исследуется форма МВ, активность этой формы увеличивается при инфаркте миокарда. При патологических состояниях выход фермента в кровь может усилиться в связи с изменением состояния мембраны клетки.

## Изменения спектра ЛДГ в онтогенезе

- Соотношение разных форм **ЛДГ** в тканях не является постоянным и изменяется в соответствии с меняющимися условиями обитания. Изменения изоэнзимного спектра наблюдаются как при адаптации к меняющимся условиям среды, так и в ходе **онтогенеза**. Эмбрионы всех млекопитающих проходят стадию развития, когда митохондрии еще не готовы к окислению субстратов. В этих условиях особенно велика роль анаэробного гликолиза. На стадии эмбриона основной формой фермента является тетрамер типа М4 (ЛДГ5) . После рождения постепенно нарабатываются другие формы ЛДГ, и к периоду, соответствующему взрослому организму, устанавливается соотношение разных изоформ, типичное для каждой ткани. *Пример:* в почках в эмбриональном состоянии обнаружено пять изоформ фермента, в то время как во взрослом организме в почках ЛДГ представлена в основном двумя изоформами.

# Единицы измерения активности ферментов

## Активность ферментов

**Активность ферментов** – это наличие и количество ферментов в крови и биологических жидкостях (энзимодиагностика).

**1 международная единица (МЕ) активности** – это количество фермента, которое катализирует превращение в продукт (P) одного микромоля субстрата (S) или образование 1 микромоля продукта P за одну минуту.

$$1 \text{ МЕ} = 1 \text{ мкмоль S (P) / мин.}$$

**Катал** - это количество фермента, которое катализирует превращение в продукт (P) одного моля субстрата (S) или образование 1 моля продукта P за одну секунду.

$$1 \text{ кат (kat)} = 1 \text{ моль S (P) / с.}$$

$$1 \text{ МЕ} = 17 \text{ нанокатал} = 17 \cdot 10^9 \text{ катал}$$

$$1 \text{ нкат (нанокатал)} = 10^9 \text{ кат}$$

**Молярная активность («число оборотов»)** - количество молекул субстрата, превращенного в продукт реакции одной молекулой фермента за одну минуту.