

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.

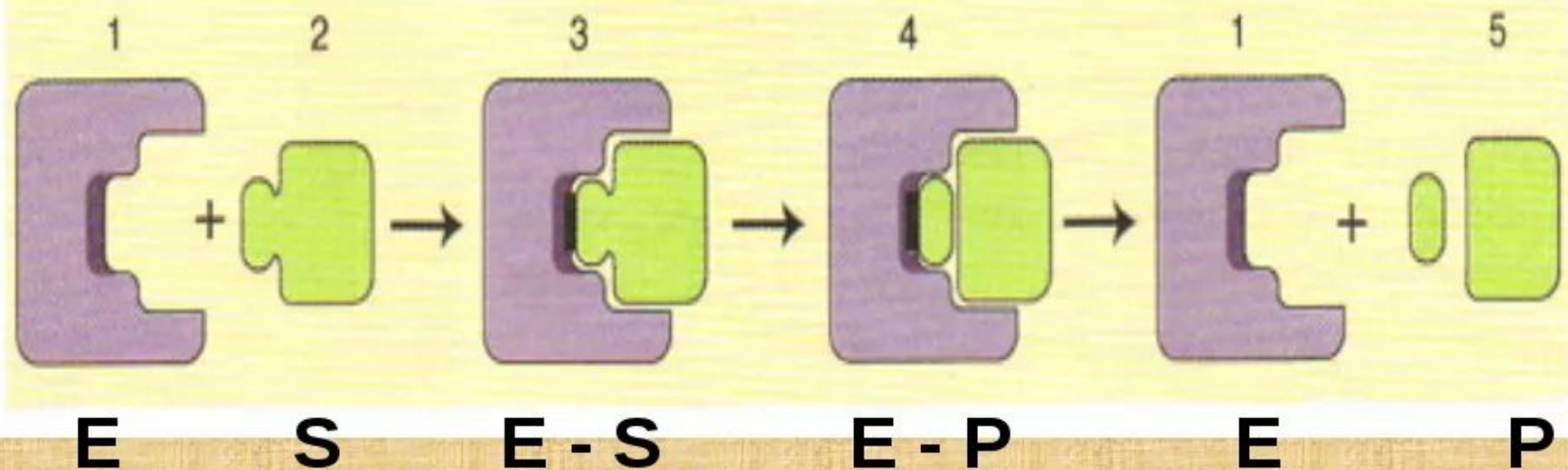
Основные принципы и механизмы регуляции ферментативных реакций

- 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**».

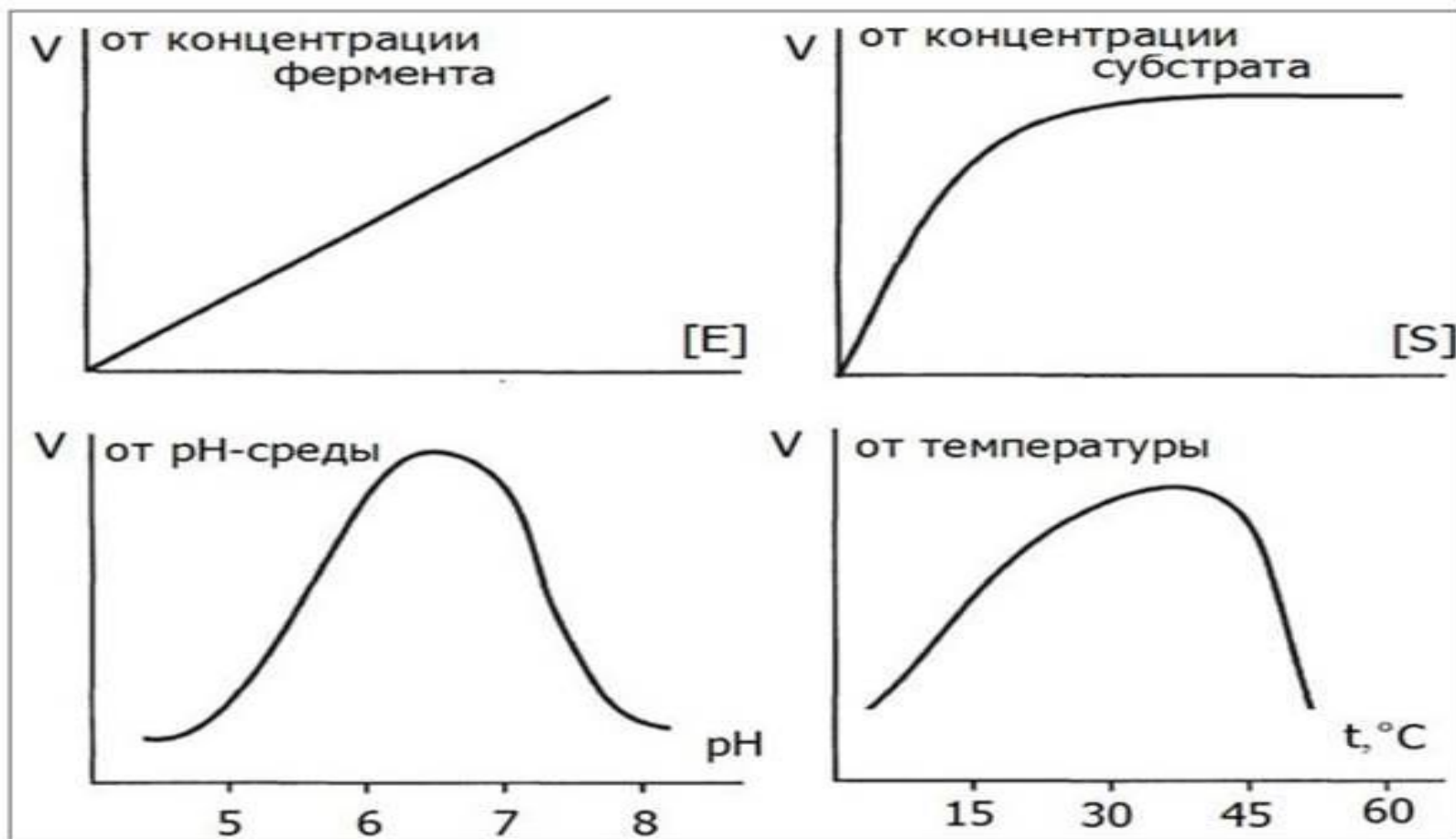
Кинетические свойства ферментов

- 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, Δc – изменение концентрации субстрата или продукта реакции, t – время.

Зависимость скорости ферментативной реакции от условий



Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

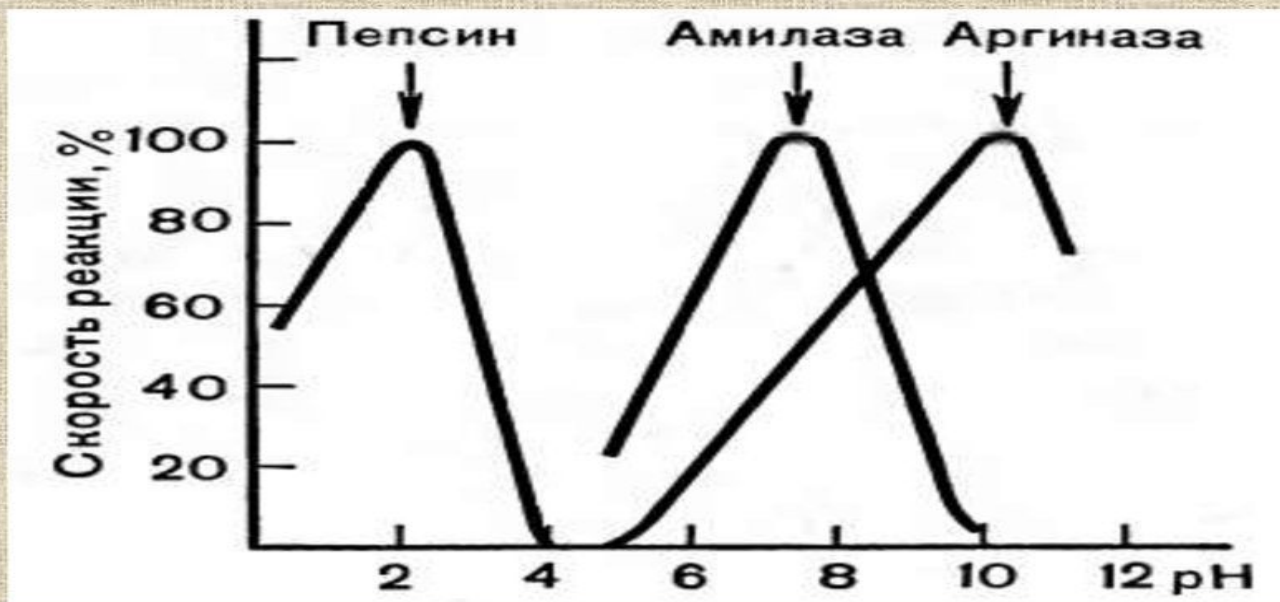
Термолабильность (Оптимальная температура для действия ферментов 37-40°C. При температуре 50°C фермент инактивируется из-за денатурации белковой структуры)



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



II ацетилхолин

ацетат

холин

O функционирует как
нейромедиатор

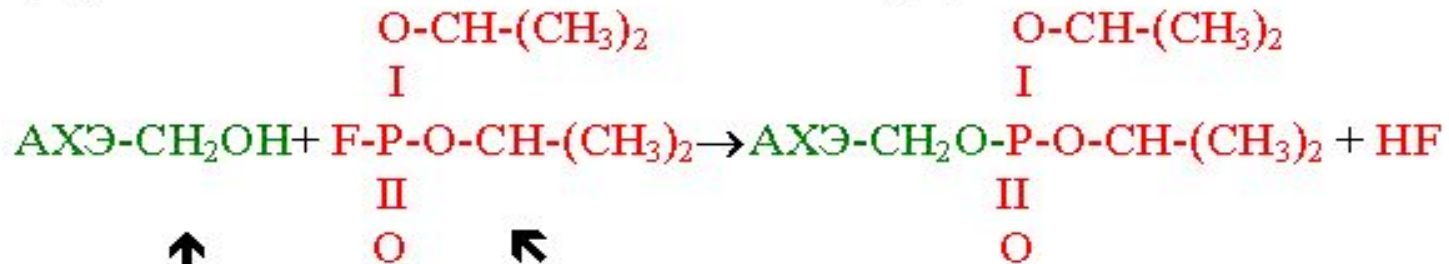
*продукты распада,
не способные действовать как
нейромедиаторы*

- 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



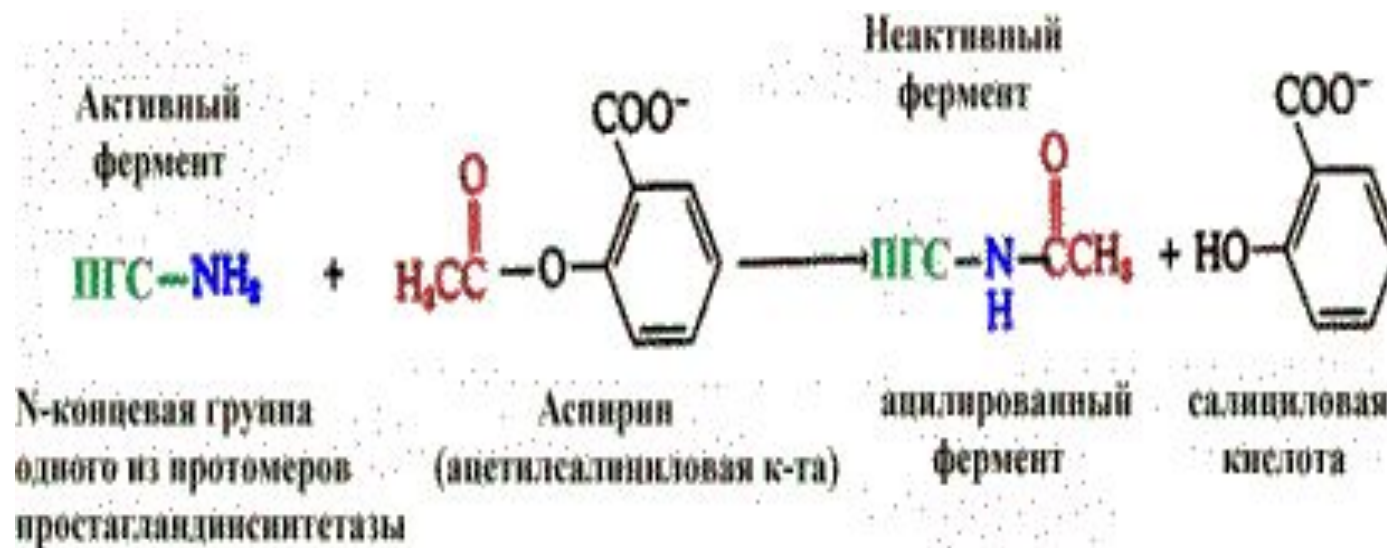
↑
R-группа в активном центре ацетилхолинэстеразы

↖
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.

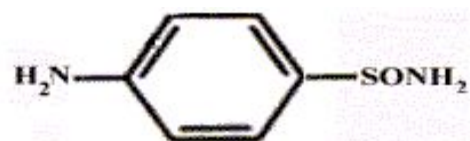
- Так как конкурентный ингибитор обратимо связывается с ферментом, то можно сдвинуть равновесие реакции $E + I \leftrightarrow EI$ влево простым увеличением концентрации субстрата.



Пример: сульфамидные препараты, используемые для лечения инфекционных болезней.

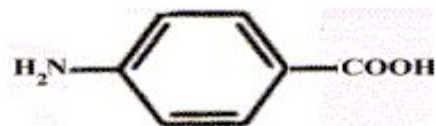
Сульфаниламиды – это структурные аналоги **парааминобензойной кислоты**, из которой в клетке микроорганизма синтезируется кофермент (Н4 - фолат - ТГФК), участвующий в биосинтезе нуклеотидов и нуклеиновых оснований. Нарушение синтеза нуклеиновых кислот приводит к нарушению синтеза жизненноважных белков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

Механизм действия сульфаниламидных препаратов



*Сульфаниламид -
конкурентный ингибитор*

*Субстраты,
в том числе
п-аминобензойная
кислота*



*Фолиевая
кислота*

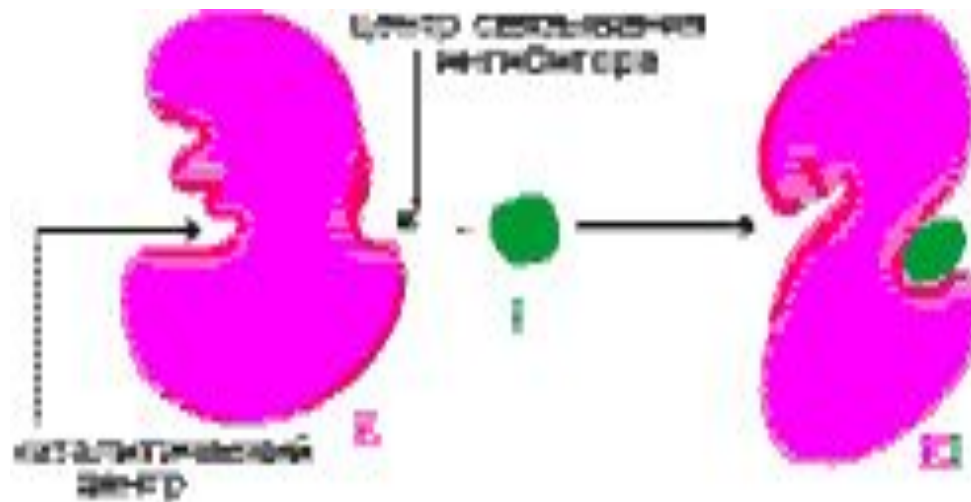
*H₄ - фолат
Кофермент*



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

Не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата

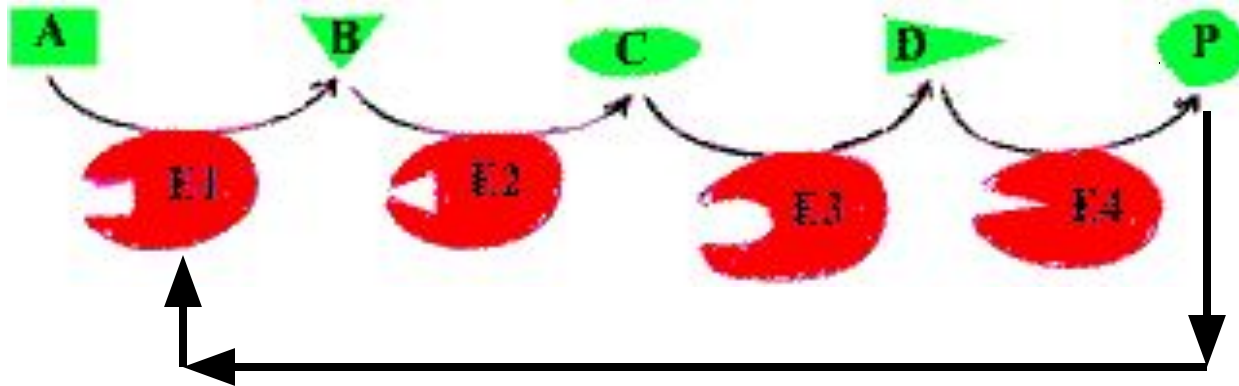
- $E + I \leftrightarrow EI$;
- $ES + I \rightarrow ESI$.



- 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:

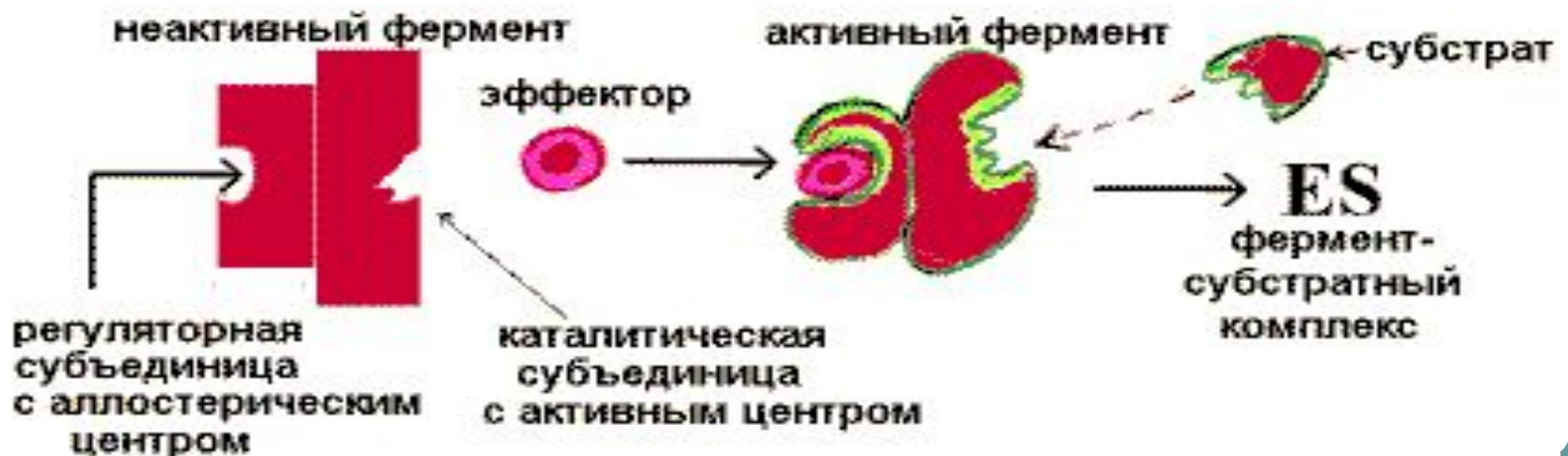
- изменение **активности фермента** при его постоянной концентрации;
- изменение **концентрации фермента**, обычно в результате ускорения (индукции) или торможения (репрессии) синтеза фермента.

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**.



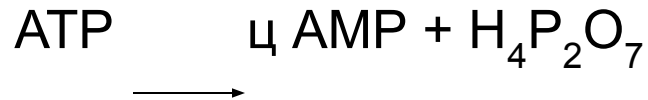
Регуляция активности липазы

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:

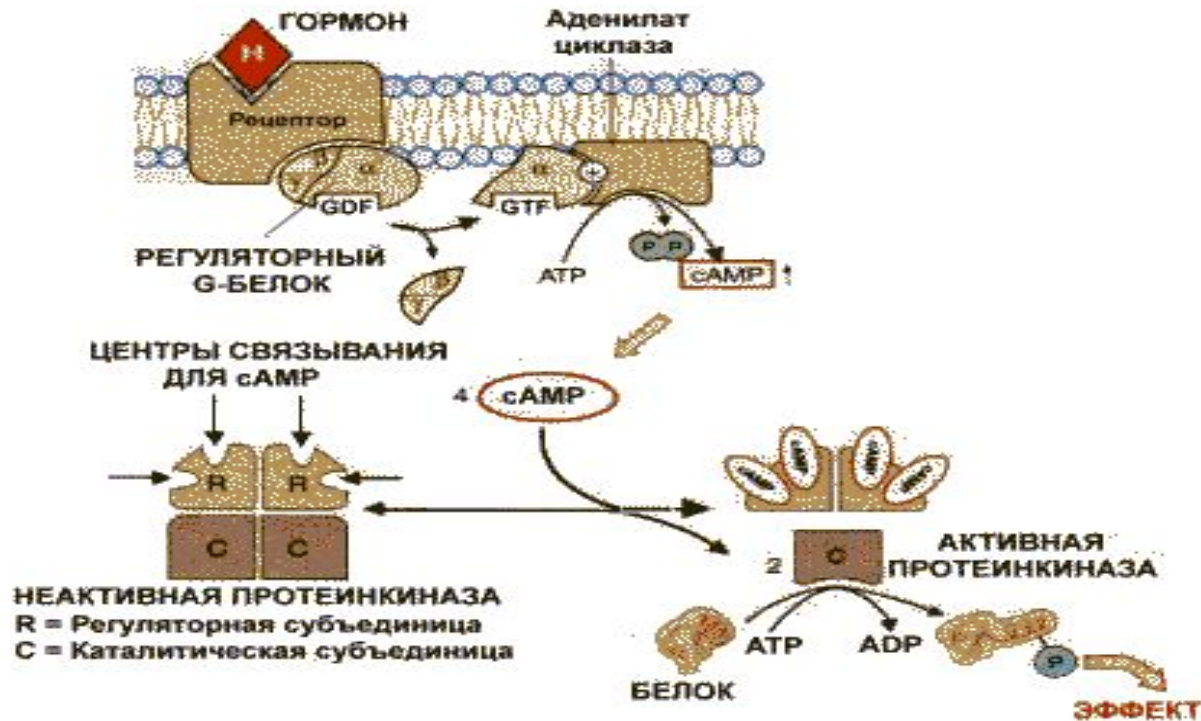


- Циклический АМФ является продуктом АТФ, превращение которой катализирует фермент аденилатциклаза:



Аденилатциклазная система

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



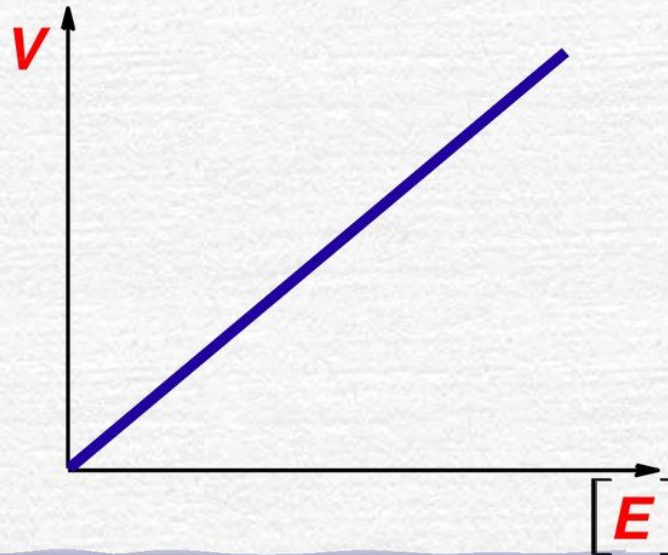
В живой клетке скорость ферментативных реакций зависит от количества ферментов

- 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

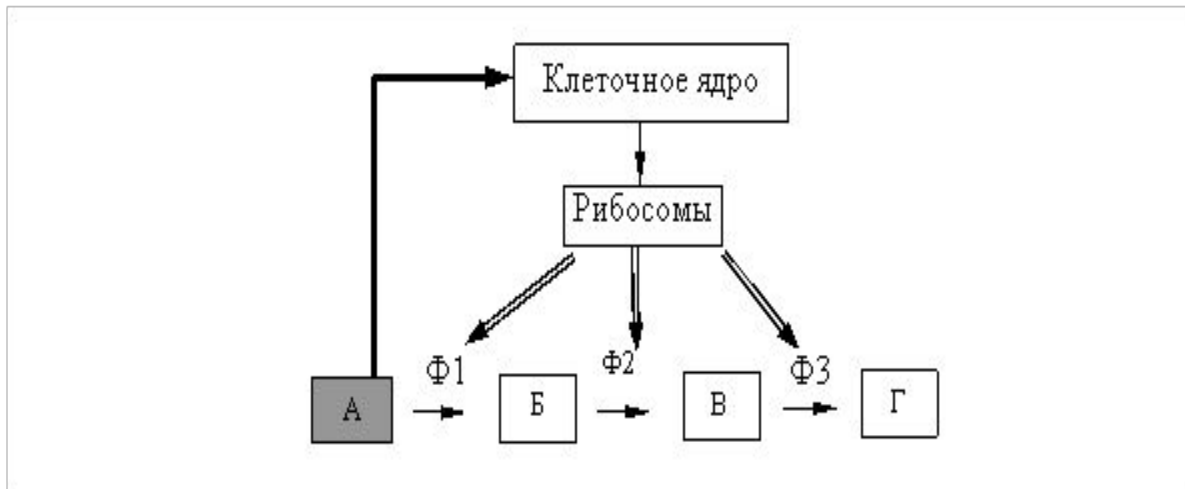
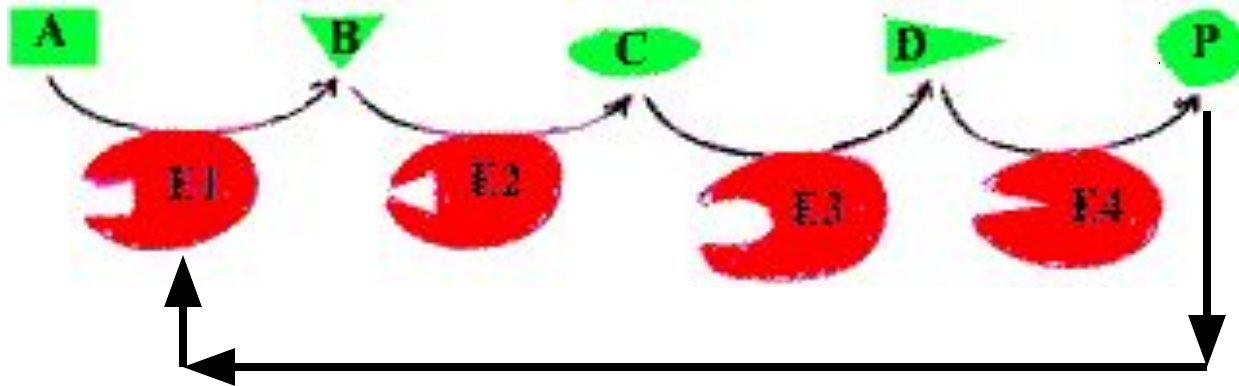


Схема репрессии синтеза ферментов

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

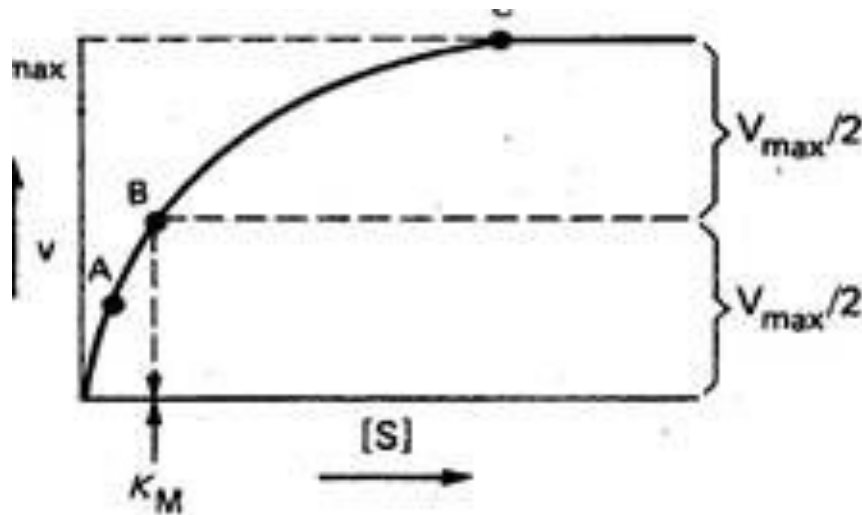
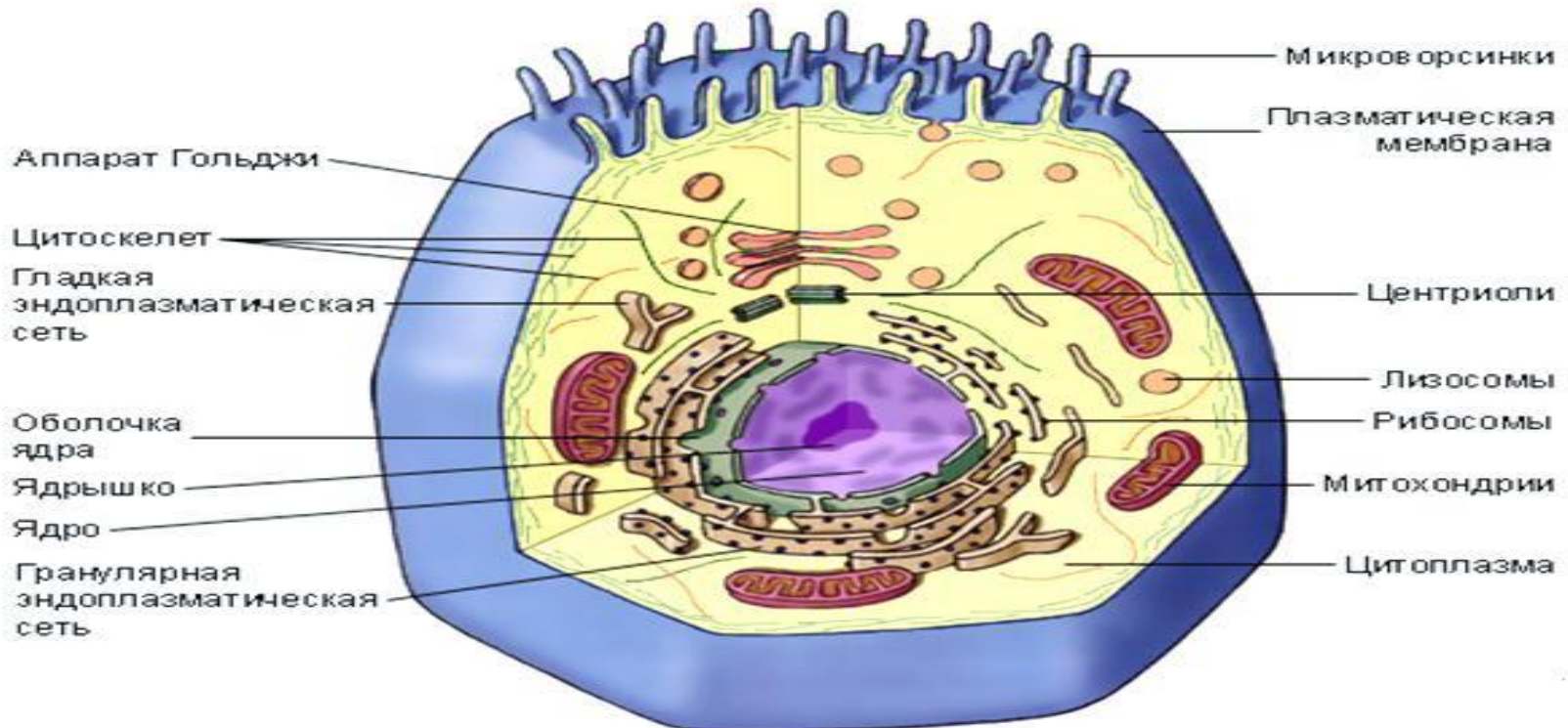


График зависимости скорости ферментативной реакции от количества субстрата.

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.