

**Основные
стратегии
регуляции
метаболических
путей**

Живые системы включают в свой состав все химические элементы, которые находятся в окружающей его среде. Наибольшая доля приходится на элементы **О, Н, С и N.**

Одно из важнейших отличий состава живых системы от неживых - присутствие **биомакромолекул: белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других биополимеров.**

Биомолекулы сами по себе не являются «живыми». Они «оживают» только тогда, когда:

- Располагаются в пространстве клетки **в строго определенном порядке (компарментализация, как проявление высокого уровня структурной организации);**
- Взаимодействуют **строго определенным образом (ферментативный катализ, как проявление высокоэффективной саморегуляции).**

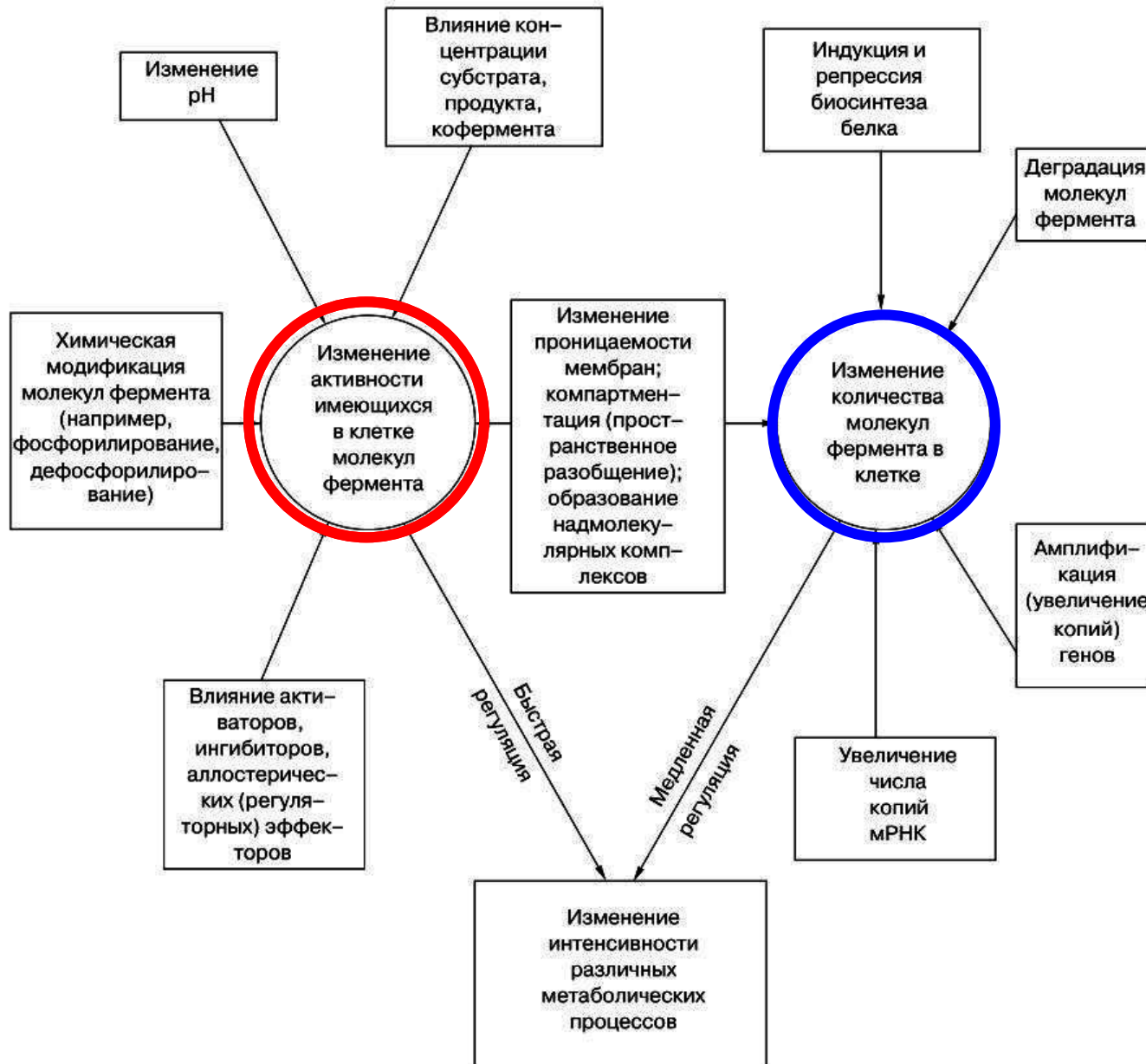
Живые системы – открытые системы, способные к саморегуляции, самоорганизации и самовоспроизведению. Они обладают, в частности, свойством **раздражимости**: живые системы **отвечают специфическими реакциями на определенные внешние воздействия.**

Адекватный и своевременный ответ клетки, органа, организма на внешнее воздействие **возможен только на основе интеграции метаболических процессов.**

Интеграция проявляется через регуляцию активности ферментов.

На прошлой лекции были перечислены пять стратегий регуляции метаболизма. Теперь каждая из них будет рассмотрена подробно.

Схема внутриклеточной регуляции действия ферментов



I стратегия: Быстрое изменение каталитической активности ключевых (регуляторных) ферментов под влиянием аллостерических регуляторов.

Ключевые (регуляторные) ферменты – аллостерические ферменты. Демонстрируют особую кинетику, отличающуюся от классической. Эта особенность обусловлена **субъединичностью строения молекул данных ферментов и наличием нескольких каталитических центров**. На этой основе реализуется **кооперативность взаимодействия каталитических центров: согласованное изменение сродства субстрата к центру**. Конечный эффект всегда больше, чем просто сумма активностей каждого центра.

Аллостерические регуляторы, действуя в очень малых концентрациях, с высоким сродством взаимодействуют с **регуляторными центрами**. Каждый регулятор имеет собственный центр для связывания. **Итог – кратное изменение активности фермента при неизменной концентрации субстрата.**

В ферментативном катализе принципиально важен этап образования комплекса фермент-субстрат (ES):

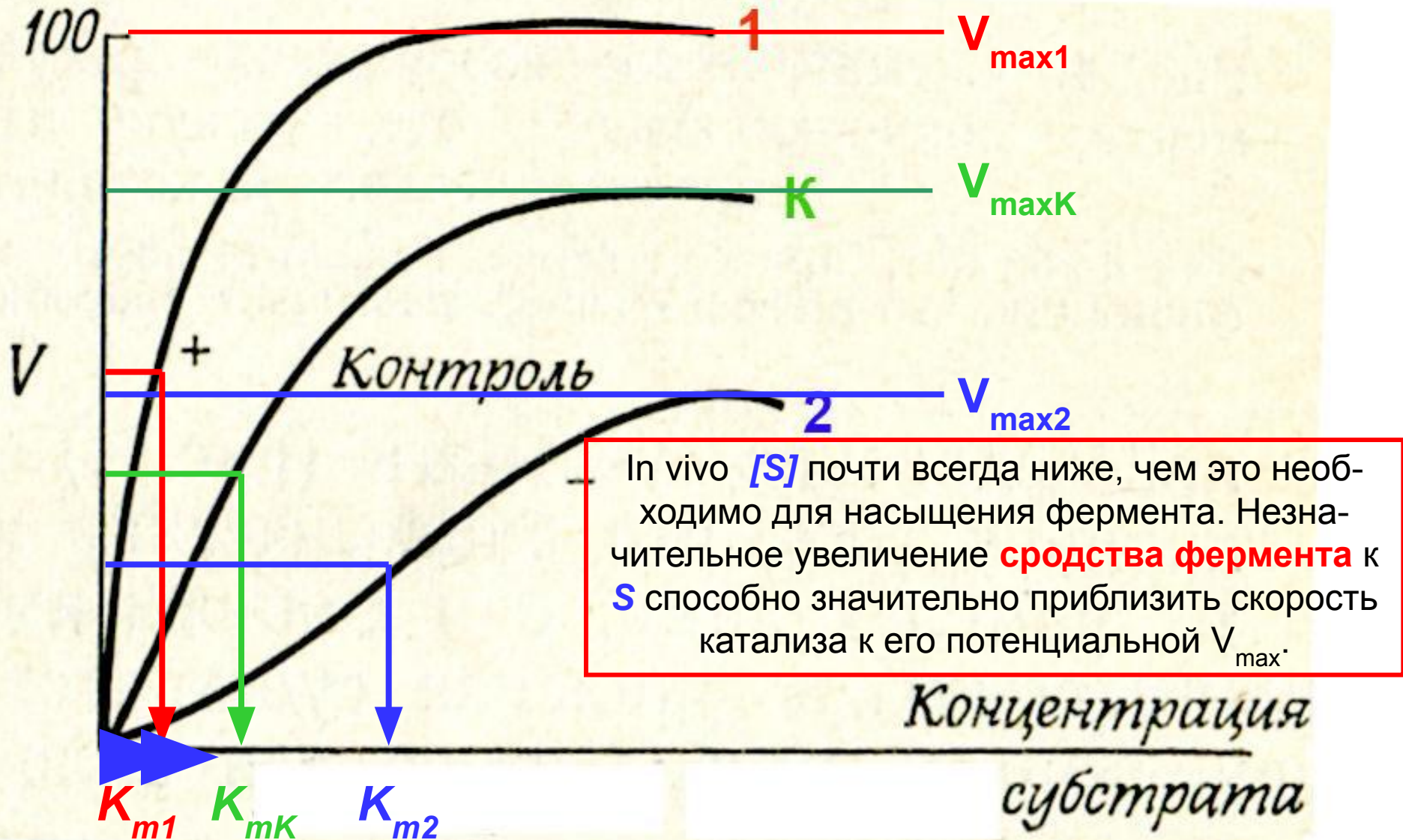


При действии **аллостерических регуляторов**, почти во всех известных случаях, регуляторный эффект обусловлен **изменением скорости** образования комплекса **ES**.

Увеличение скорости образования ES в присутствии аллостерического регулятора обусловлено **увеличением сродства** активного центра **E** к **S**.

Сравнительно небольшие сдвиги сродства активного центра фермента к субстрату приводят к значительным изменениям скорости реакции (интенсивности катализа).

Влияние аллостерических регуляторов на V_{max}



II стратегия: А. Ковалентная модификация ферментов путём фосфорилирования – дефосфорилирования. Эта модификация обратима.

Действует параллельно с аллостерической регуляцией и реализуется также сравнительно быстро. Это одна из самых распространённых форм обратимой посттрансляционной модификации белков.

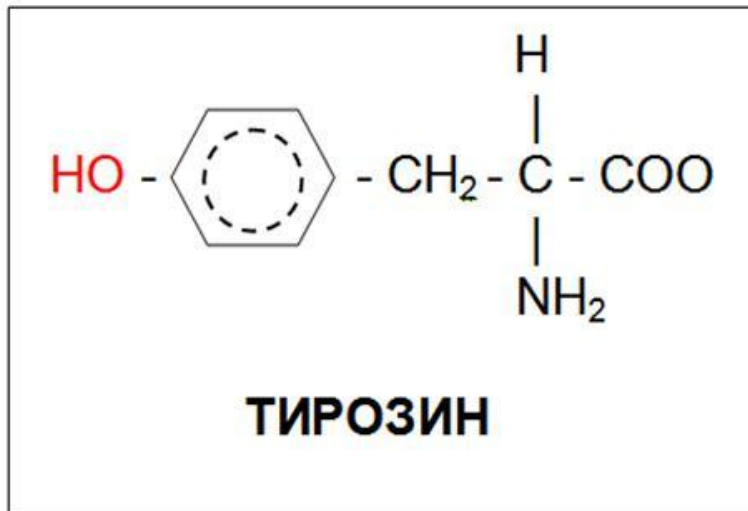
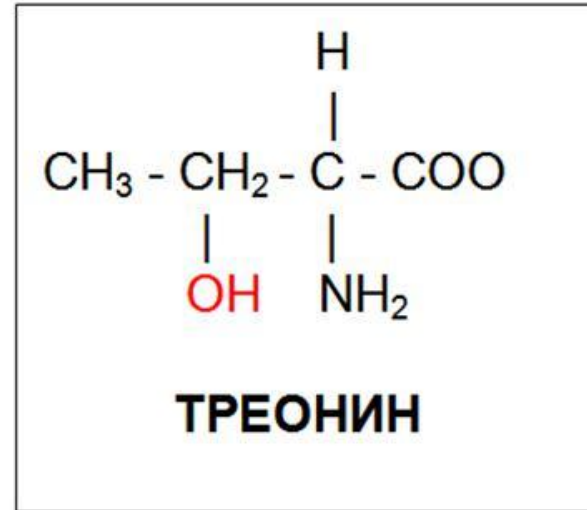
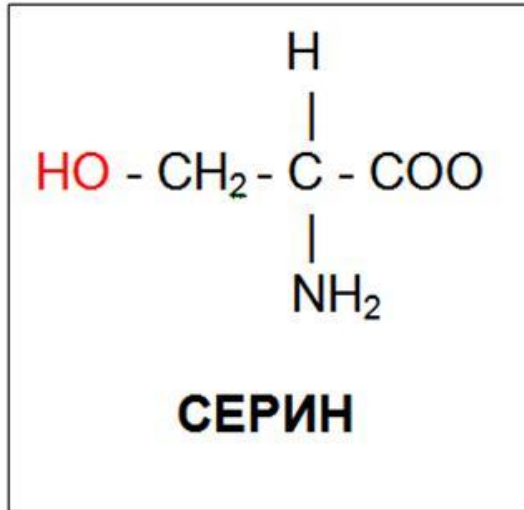
Фосфорилирование молекулы фермента идёт с участием протеинкиназ. Протеинкиназы (ПК) - подкласс ферментов киназ (фосфотрансфераз, КФ 2.-.-.-).

ПК модифицируют белки (не только ферменты) путем фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы - **серин, треонин и тирзин**.

ПК отщепляют фосфатную группу от АТФ и ковалентно присоединяют её к остатку соответствующей аминокислоты:



Серин, треонин и тирозин, как мишени для протеинкиназ



Содержат незаряженные, но полярные группы. При pH вблизи 7,4 – гидроксилы не диссоциированы. Максимальная полярность у гидроксила тирозина. Хорошая водорастворимость, поскольку гидроксильные группы образуют водородные связи с молекулами воды.

Протеинкиназы (ПК) классифицируют по остаткам фосфорилируемых ими аминокислот

Серин-, Треониновые ПК:

1. **ПК А** или **цАМФ-зависимая ПК**.
Функции разнообразны.
2. **ПК В (Akt)**. Подавляет апоптоз, стимулирует рост и выживание клеток.
3. **ПК С**. Опосредует фосфатидилинозитол/ Ca^{2+} сигнальный путь.
4. **Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые ПК**.
Регулируют активность множества белков.
5. **МАРК (митоген-активируемые ПК)**.
Отвечают на внешние стимулы. Образуют ПК-каскад. Участвуют в пролиферации клеток, индуцируют синтез белков, регулируют апоптоз.

Тирозиновые ПК:

1. **Цитоплазматические тирозиновые ПК: (Src)** – передают пролиферативный сигнала.
2. **Рецепторные тирозинкиназы** – передача сигнала от инсулина, факторов роста, цитокинов.

ПК со смешанной специфичностью (фосфорилируют три аминокислоты)

Дефосфорилирование молекулы фермента или другого белка происходит с участием протеинфосфатаз.

Протеинфосфатазы, PP (protein phosphatase)

```
graph TD; A[Протеинфосфатазы, PP (protein phosphatase)] --> B[Тирозин-специфичные PP: Участвуют в регуляции MAPK-сигнального пути, в контроле пролиферации, дифференцировке клеток и клеточного цикла.]; A --> C[Серин-, треонин-специфичная PP: Регулируют пролиферацию, дифференцировку клеток, эмбриональное развитие и апоптоз.]; A --> D[PP с двойной специфичностью: Примером могут служить PP, дефосфорилирующие активные MAPK];
```

Тирозин-специфичные PP:
Участвуют в регуляции MAPK-сигнального пути, в контроле пролиферации, дифференцировке клеток и клеточного цикла.

Серин-, треонин-специфичная PP:
Регулируют пролиферацию, дифференцировку клеток, эмбриональное развитие и апоптоз.

PP с двойной специфичностью:
Примером могут служить PP, дефосфорилирующие активные MAPK

II стратегия: Б. Нековалентная модификация ферментов. Реализуется путем ограниченного (лимитированного) протеолиза. Как правило, **носит каскадный характер и необратима.**

Ферменты, катализирующие многие важные превращения биомолекул, **изначально синтезируются в неактивной форме (проферменты или зимогены).**

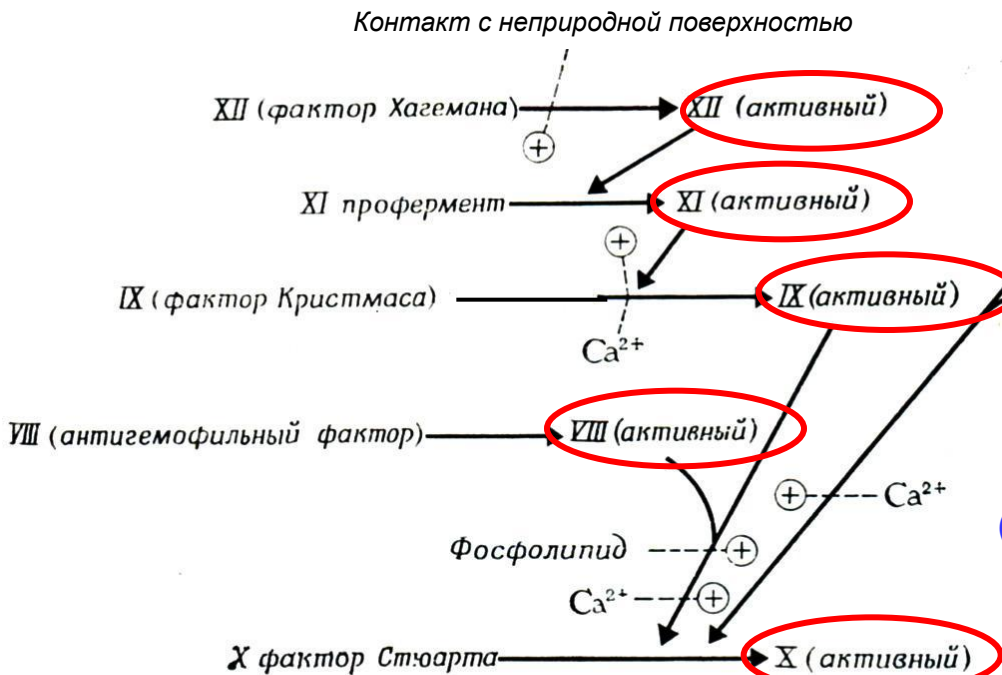
Активация профермента (зимогена) происходит с участием различных протеаз.

Примеры:

- активация химотрипсина
- активация каскада ферментов свертывающей системы крови
- активация каскада каспаз для релизации апоптоза.

Каскадный механизм, приводящий к свертыванию крови

Внутренний механизм



Внешний механизм

Тромбопластин (липопротеид, высвобождающийся в кровь из поврежденной ткани)

Последовательность из 5 ферментов, в которой каждый фермент активирует следующий путем отщепления небольшого фрагмента пептидной цепи (ограниченный / лимитированный протеолиз).

Природа процесса – каталитическая, что позволяет каждому фактору запускать реакцию, присутствуя изначально в очень малых количествах.

Протромбин → Тромбин (тоже протеолитический фермент)

Фибриноген → Фибрин (рыхлый сгусток)

H₂O Пептид

Мономеры образующегося **фибрина** спонтанно образуют фибриллы

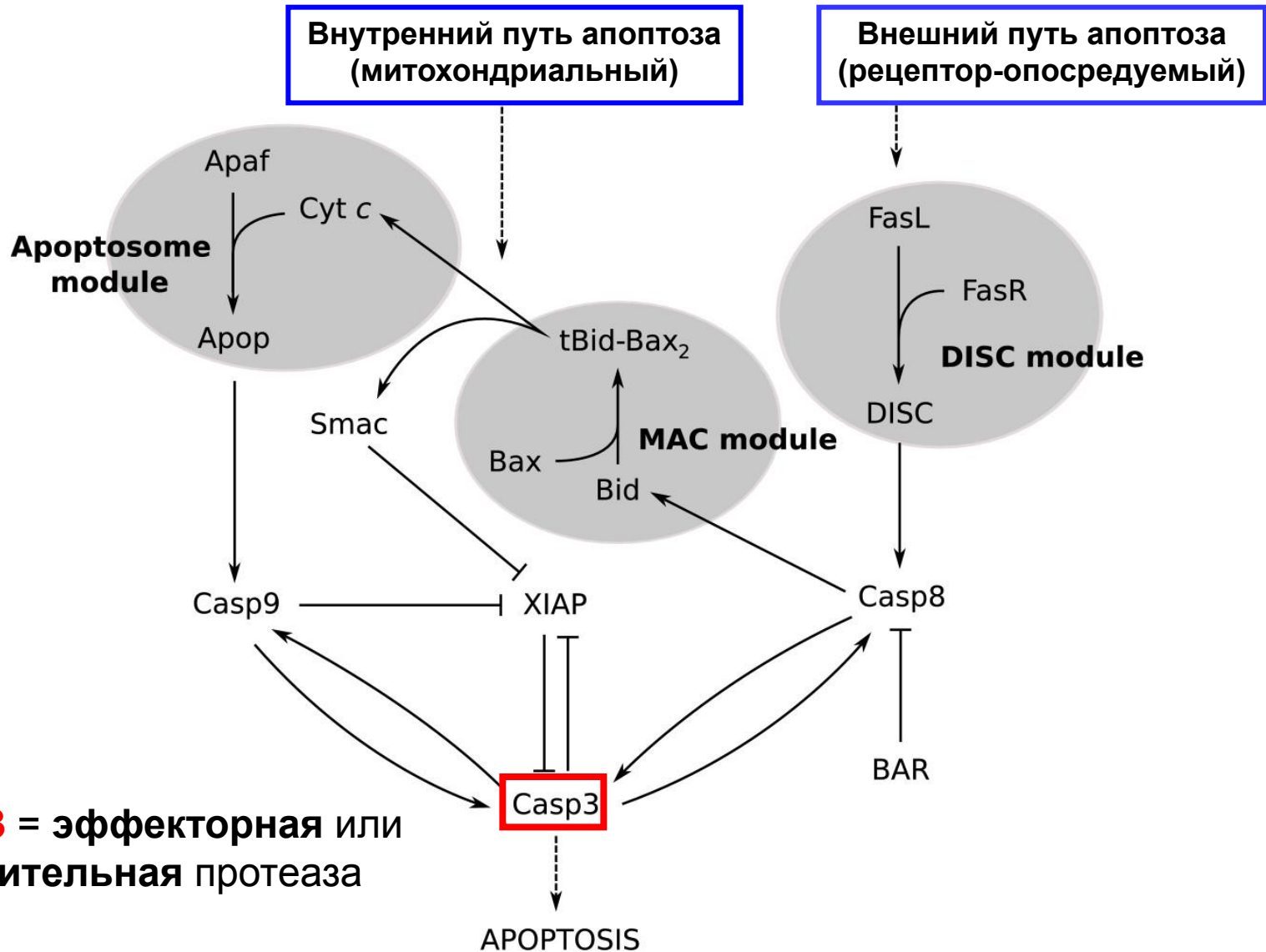
Фибрин-стабилизирующий фактор →

Плотный сгусток

Для полноценно протекающего процесса важны оба механизма.

Внешний и внутренний пути инициирования апоптоза.

Конечный эффект – активация **исполнительной каспазы-3** благодаря работе каскада иницирующих каспаз



Каспаза-3 = эффекторная или исполнительная протеаза

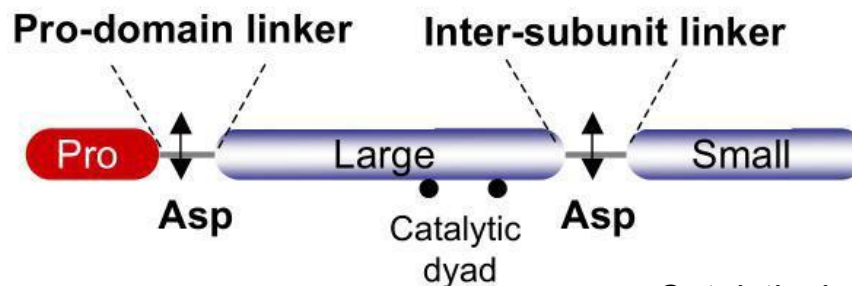
Каспазы (англ. **caspase** + **cysteine-dependent aspartate specific protease**) — семейство внутриклеточных цистеиновых протеаз, расщепляющих пептидные связи белков, следующих после аспартата.

Каспазы всегда вовлечены в процесс **сигнальной трансдукции** (не только в апоптозе). Не известны факты участия каспаз в неспецифическом расщеплении белков.

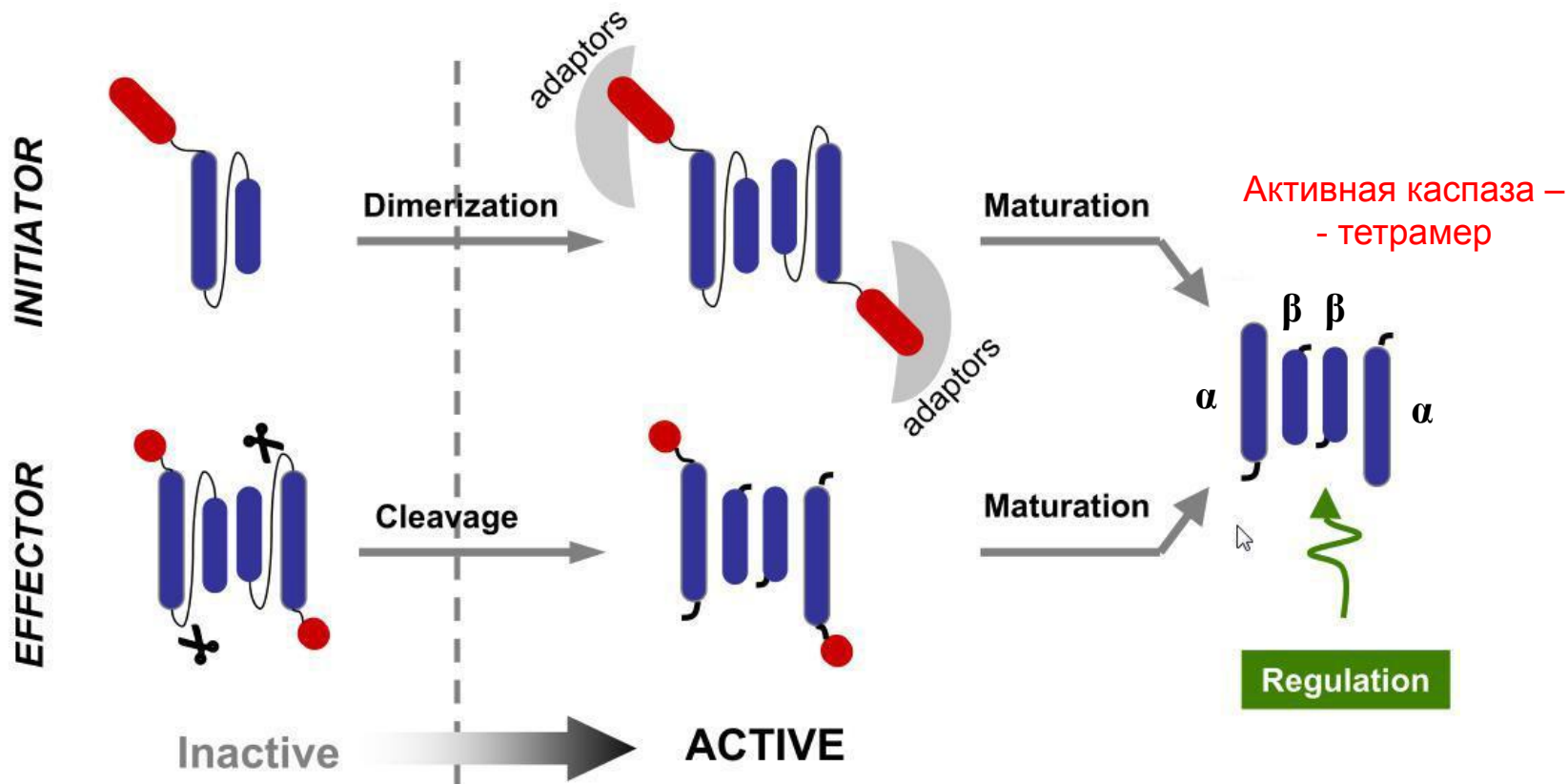
В зависимости от функциональной принадлежности, **неактивные формы каспаз (зимогены)** могут образовывать как мономер, так и димеры. В процессе «созревания» происходит аутокаталитическое расщепление каталитического домена на большую (α) и малую (β) субъединицы, которые в активированной протеазе тесно взаимосвязаны. **В каждой молекуле содержится 2 каталитических центра.**

Общая схема «созревания» / активации каспаз

Зимоген каспазы



Catalytic dyad = каталитическая пара



Очевидно, что I и II стратегии регуляции обеспечивают **не только быстрый**, но и **очень точный механизм контроля метаболизма**.

III стратегия: Изменение количества фермента – усиление его биосинтеза, либо разрушение уже имеющихся молекул фермента. Это путь медленного изменения активности метаболических путей. Реализуется спустя часы, поскольку идет синтез белка *de novo*.

Изменение количества фермента – более грубый механизм регуляции метаболизма (по сравнению с изменением каталитических свойств ферментов).

А. Ферменты конститутивные — ферменты, постоянно синтезируются в клетках организма независимо от условий существования или наличия соответствующих субстратов.

Б. Ферменты индуцируемые – скорость их синтеза изменяется в зависимости от условий существования организма.

Регуляция синтеза происходит на генетическом уровне под действием **индукторов** (соответствующие субстраты или метаболиты).

Ген «выключен», пока с соответствующим участком ДНК связан белок-репрессор.

Белки-репрессоры – типичные аллостерические белки. **Вещества-индукторы синтеза данного фермента, с высоким сродством связываются со своими регуляторными участками на белке-репрессоре,** молекула репрессора диссоциирует и экспрессия гена начинается.

Синтез индуцируемых ферментов - одно из проявлений биохимической адаптации метаболизма клетки к изменившимся условиям существования.

Итог: либо увеличивается количество уже имеющегося фермента, что обеспечивает более быстрое протекание определённой реакции, либо вырабатываются новые ферменты, ранее отсутствовавшие в клетке или ткани.

Синтез ферментативного белка de novo регулируется на:

- этапе **транскрипции**
- этапе **трансляции**
- этапе **деградации мРНК**

IV стратегия: Компарментализация ферментов и метаболических путей. Пространственное разделение метаболических путей позволяет согласованно и одновременно протекать анаболическим и катаболическим реакциям в пределах одной клетки.

1. Ферменты, встроенные в мембраны.
2. «Растворимые» ферменты (в том числе те, которые образуют полиферментные комплексы).

Компарментализация позволяет регулировать активность фермента с помощью:

- доступности субстрата(ов);
- доступности кофактора(ов);
- удаления продуктов и направление их в другие компартменты клетки, где они требуются;
- реализации механизма обратной (+/-) связи.

Основные компартменты клетки:

- Плазматическая мембрана
- Ядро
- Цитоскелет
- Митохондрии: внутренняя мембрана и матрикс
- ЭПР (микросомы): мембрана и внутреннее пространство цистерн ЭПР
- Комплекс (аппарат) Гольджи
- Лизосомы
- Пероксисомы
- Везикулы накопления
- Цитоплазма

Существуют ферменты (киназы), которые при переходе из неактивной в активную форму **изменяют своё местонахождение (компартиментализацию)**

1. **Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma) – серин-треониновая ПК.** В неактивной конформации ПК находится в цитоплазме. Факторы роста (посредством рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью) активируют мембранный белок **Ras**. **Ras** взаимодействует с N-концевым доменом неактивного **Raf** и этим рекрутирует **Raf** из цитоплазмы в мембрану, где завершается процесс активации **Raf**.

Raf – первая ПК в каскаде сигнального пути MAPK – основной сигнальный путь стимулирующий пролиферацию клеток.

2. Протеинкиназа С (ПКС) – серин-треониновая ПК. В неактивной конформации ПК находится в цитоплазме. Многочисленные лиганды рецепторов, сопряженных с G-белком активируют мембранный гетеротримерный G-белок. Активируется связанная с мембраной **ФЛазы С**, специфичная к **ФИФ2**. 1-й продукт ИФ3 (гидрофильный) стимулирует **Ca²⁺-каналы ЭПР**, что повышает внутриклеточную [Ca²⁺]. Неактивная ПКС, связавшись с Ca²⁺, перемещается в внутренний слой плазматической мембраны и связывается с ним за счет «-» заряда головок ФС. В мембране ПКС встречается со 2-м продуктом ФЛазы С – с **ДАГ** (гидрофобен). **Происходит активация ПКС.**

В различных типах клеток присутствуют **различные изоформы ПКС**, каждая из которых имеет свою молекулу-мишень: **клеточное деление, секреция, экзоцитоз, транспорт ионов, сокращении гладких мышц и пр.**

У стратегия: Гормональная (эндокринная) регуляция.

Под действием гормонов (первичных мессенджеров) внутри клетки синтезируются вторичные мессенджеры, которые изменяют активность различных внутриклеточных ферментов и путей обмена.

Эндокринная система координирует (согласовывает) различные типы обмена, протекающего в различных органах, в зависимости от режимов питания или от внешних воздействий на организм.

1. Анаболические гормоны (СТГ, инсулин, андро- и эстро-гены). Обеспечивают рост и аккумуляцию. Интегральный показатель: «+» азотистый баланс.

2. Катаболические гормоны (катехоламины, глюкокортикоиды, глюкагон). Стимулируют реакции расщепления.

Каждый тип клетки содержит **специфическую комбинацию различных рецепторов**, что даёт ей возможность **по разному отвечать на действие нескольких гормонов**.

Каждая из комбинаций рецепторов определяет **характер ответа клетки**: рост, деление или дифференцировку.

Благодаря использованию разными типами клеток различных рецепторов, позволяет им тонко регулировать своё функциональное состояние. При этом вполне достаточно сравнительно небольшого комплекта гормонов.

Мультиферментные комплексы (как пример нековалентной модификации ферментов)

При работе **мультиферментного комплекса**: продукт первого фермента в составе комплекса тут же становится субстратом следующего фермента этого же комплекса.

Благодаря такой структурной организации:

- скорость превращения молекул чрезвычайно высока, поскольку нет ограничений, связанных с диффузией молекулы субстрата к активному центру фермента;
- реализуется высокоэффективная регуляция процесса.

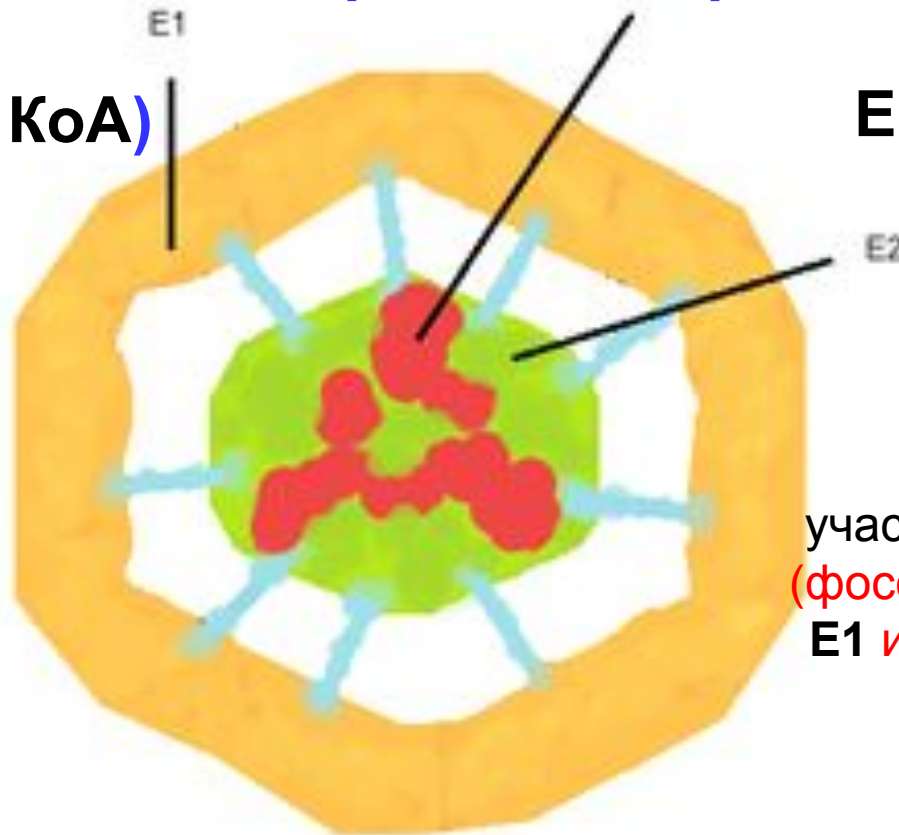
Модель пируватдегидрогеназного комплекса

E1 – пируват дегидрогеназа (кофактор: тиаминпиро-фосфат)

E2 – дигидролипоил трансацетилаза (кофакторы: липоевая кислота и

КоА)

E3 – дигидролипоил дегидрогеназа (кофакторы: ФАД, НАД⁺)



В регуляции активности комплекса участвуют **специфические киназа ПВК-ДГ** (фосфорилирует 3 остатка **серина** в составе **E1** и инактивирует комплекс) и **фосфатаза ПВК-ДГ** (активирует комплекс).

пируват \square ацетил-КоА + CO₂

Изоферменты (изоэнзимы)

Изоферменты – молекулярные формы (изотипы) одного фермента.

Изоферменты отличаются по их первичной структуре, что детерминировано генетически.

Изоферменты – проявление **полиморфизма генов (различные локусы)** и наличия **нескольких аллелей у гена**.

Они катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по физико-химическим свойствам, э/ф – подвижности, сродству к S, чувствительности к ингибиторам, рН-оптимуму и т.д.

Как правило, каждый из изоферментов локализован в определенной ткани.

Первым ферментом, для которого были выявлены изотипы – **лактатдегидрогеназа (ЛДГ)**.

ЛДГ существует в виде **5** изоферментов. Все они являются вариантами комбинации в различных соотношениях двух типов субъединиц: **Н-тип** и **М-тип**. Таким образом, пять изоферментов ЛДГ, составлены из следующих типов: **Н4**, **Н3М1**, **Н2М2**, **Н1М3** и **М4**

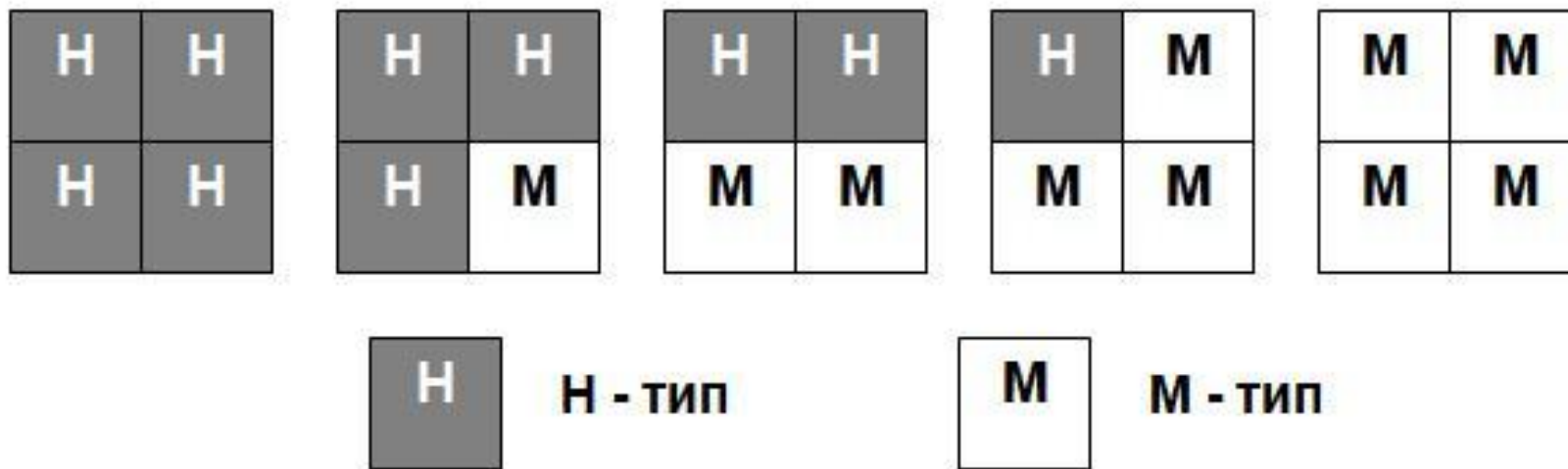


Схема комбинации Н- и М- субъединиц в изоферментах ЛДГ.

М4 = ЛДГ-5 (миокард).

В зависимости от степени подвижности при электрофорезе в крахмальном геле, изоферменты ЛДГ нумеруют:

ЛДГ-1, обладающий наибольшей подвижностью, содержится преимущественно в миокарде;

ЛДГ-5, обладающий наименьшей подвижностью, преимущественно локализован в гепатоцитах;

ЛДГ-4 преимущественно локализован в скелетных мышцах и отчасти в гепатоцитах. Это причина того, что при болезни Боткина, в сыворотке крови больного одновременно повышается активность и содержание ЛДГ-5 и ЛДГ-4;

ЛДГ-3 преимущественно содержится в легких;

ЛДГ-2 преимущественно локализован в эритроцитах и почках.

Биологический смысл существования изоферментов:

В разных тканях существует разная концентрация субстрата для одного и того же биохимического превращения;

Разные ткани в разной степени нуждаются в глюкозе: для ткани ЦНС глюкоза основное «метаболическое топливо».

Гексокиназа клеток головного мозга имеет $K_m = 0,05$ mM; ее изофермент в печени (глюкокиназа) имеет $K_m = 10$ mM (различаются в 200 раз).

Прикладное значение определения активности изоферментов - клиническая лабораторная диагностика (тканевая локализация патологического процесса).

Электрофоретическая оценка содержания изоферментов ЛДГ в сыворотке крови в норме и на различных сроках от начала инфаркта миокарда.



Увеличение общей активности ЛДГ в сыворотке при инфаркте миокарда происходит за счет повышения активности ЛДГ-1 (миокардиального изофермента) и в меньшей степени ЛДГ-2.