

Особенности кинетики аллостерических (регуляторных) ферментов

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

«аллос» (греч.) – другой, «стерео» (греч.) – пространственный.

Аллостерические ферменты – особая категория ферментов, **их функция – регуляция активности метаболических путей («ключевые» ферменты).**

Активность аллостерических ферментов регулируется, в основном, с помощью **аллостерических регуляторов (активаторов и ингибиторов).** Эффект этих регуляторов проявляется чрезвычайно быстро. Возможна также регуляция активности под влиянием концентрации собственного субстрата.

Аллостерические регуляторы не обладают структурным сходством с субстратом. Эти регуляторы с высоким сродством нековалентно (обратимо) связываются со специальными сайта-ми, лежащими за пределами активного (каталитического) центра молекулы аллостерического фермента. Регуляторы действуют в низких концентрациях.

Теория аллостерических ферментов была разработана в 1956-1963 гг. **Амбуржье, Моно, Шанжё и Жакобом.**

Особенности строения и функционирования:

- состоят из нескольких субъединиц (олигомерные белки);
- содержат **два типа пространственно разделенных связывающих центров:**

I тип: несколько активных (каталитических) центров – чаще всего по количеству субъединиц ;

II тип: несколько регуляторных (аллостерических) центров, предназначенных для **специфического связывания аллостерических регуляторов**: активаторов и ингибиторов.

- аллостерические регуляторы не обладают структурным сходством с субстратом (это послужило основанием для появления термина аллостерический);
- не подчиняются кинетике Михаэлис-Ментен. График зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата имеет сигмовидную (S-образную) форму;

- **сигмовидная форма кривой обусловлена тем, что связывание субстрата в одном каталитическом центре всегда приводит к увеличению сродства к субстрату второго каталитического центра. Это происходит опосредованно – через изменение конформации второго каталитического центра.**

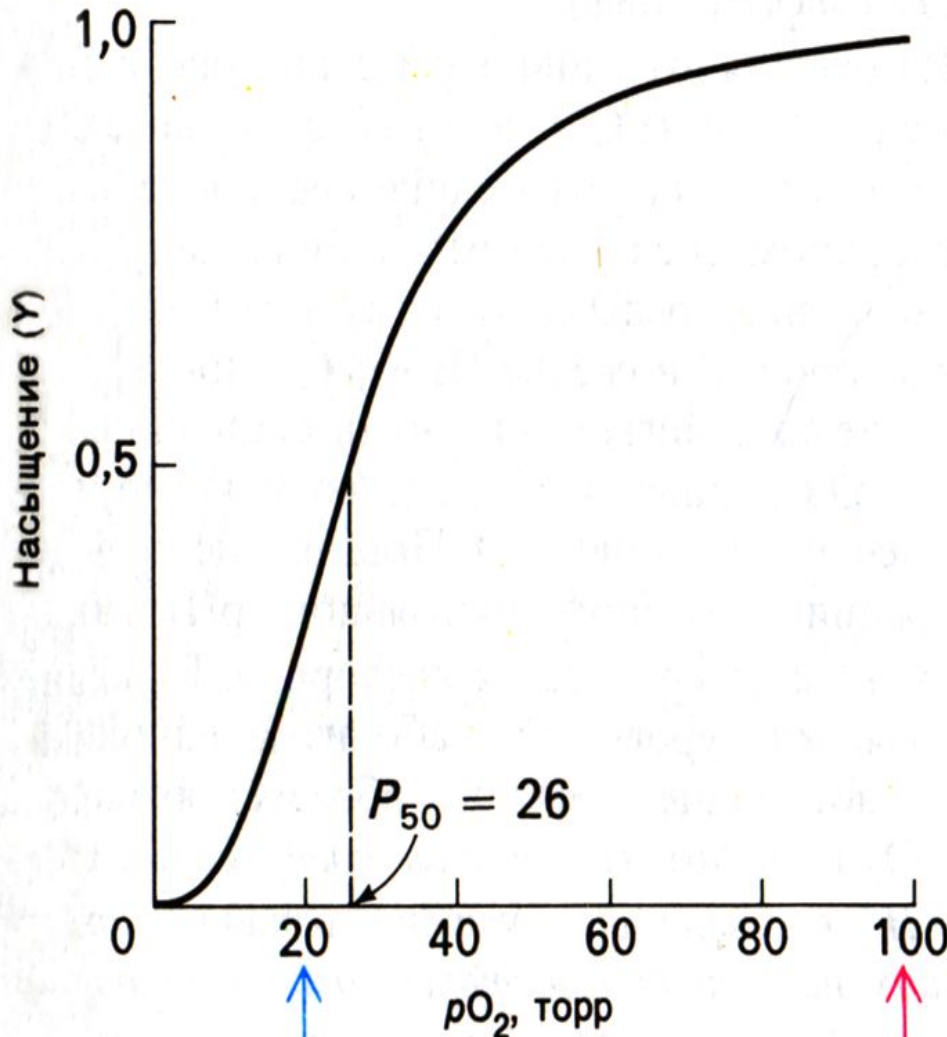
Так проявляется **кооперативность** взаимодействия между активными (каталитическими) центрами в молекуле аллостерического фермента.

Гемоглобин – первый белок, на примере которого было открыто явление **кооперативности во взаимодействии связывающих O₂ центров**. Много позже кооперативность была выявлена для других белков и аллостерических ферментов.

Кооперативность – согласованное взаимодействие между центрами субъединиц в процессе связывания с ними лигандов, приводящее к изменению сродства лиганда к центру.

Кооперативность широко распространена в живой природе. Она описана при функционировании многих белков и нуклеиновых кислот.

Кривая насыщения O_2 для гемоглобина



pO_2 в капиллярах
работающей мышцы

pO_2 в легочных
альвеолах

Степень насыщения участков, связывающих кислород (Y), показана как функция парциального давления O_2 (pO_2) в растворе.

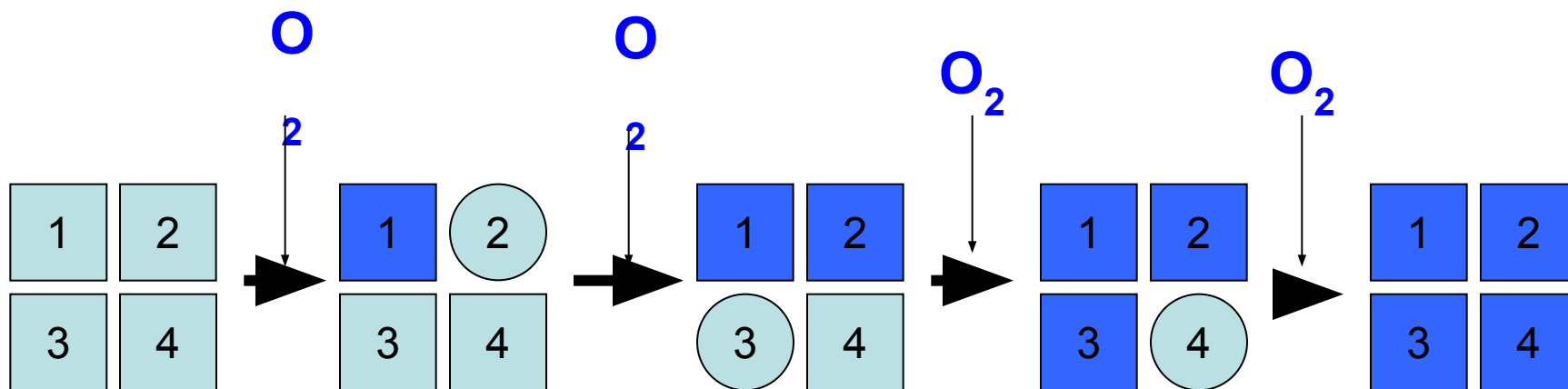
P_{50} – характеризует сродство к O_2 – это парциальное давление, при котором насыщены 50% участков связывания ($Y=0,5$).

Кривая зависимости имеет типичную сигмоидную форму.

Впервые этот феномен в 1904 г. описал Кристиан Бор [Bohr C. (1904)

Zentralblatt Physiol., 23, 688–690].

Кооперативность в процессе связывания кислорода с гемоглобином



Каждая молекула O₂ связывается с субъединицами гемоглобина в последовательности: 1(α_1) □ 2(α_2) □ 3(β_1) □ 4(β_2).

В результате этого **меняется конформация следующей субъединицы**, что приводит к **увеличению сродства центра связывания** в этой субъединице к молекуле O₂. В целом происходит **нелинейное нарастание сродства** всей молекулы гемоглобина к O₂.

Типичная сигмовидная (S-образная) кривая зависимости скорости реакции аллостерического фермента от концентрации субстрата



Аллостерические ферменты

```
graph TD; A[Аллостерические ферменты] --> B[Гомотропные ферменты]; A --> C[Гетеротропные ферменты];
```

Гомотропные ферменты

Их аллостерический центр связывает молекулу S. При этом S не подвергается каталитическому превращению, он действует как регулятор.

Гетеротропные ферменты

Аллостерические регуляторы не являются субстратами фермента.

В молекуле аллостерического фермента, активный центр пространственно отделен от центров связывания аллостерических регуляторов.

Аллостерические регуляторы

```
graph TD; A[Аллостерические регуляторы] --> B[Положительные регуляторы]; A --> C[Отрицательные регуляторы];
```

Положительные регуляторы – увеличивают активность: при одной и той же [S], $\downarrow K_m$ и/или $\uparrow V_{max}$

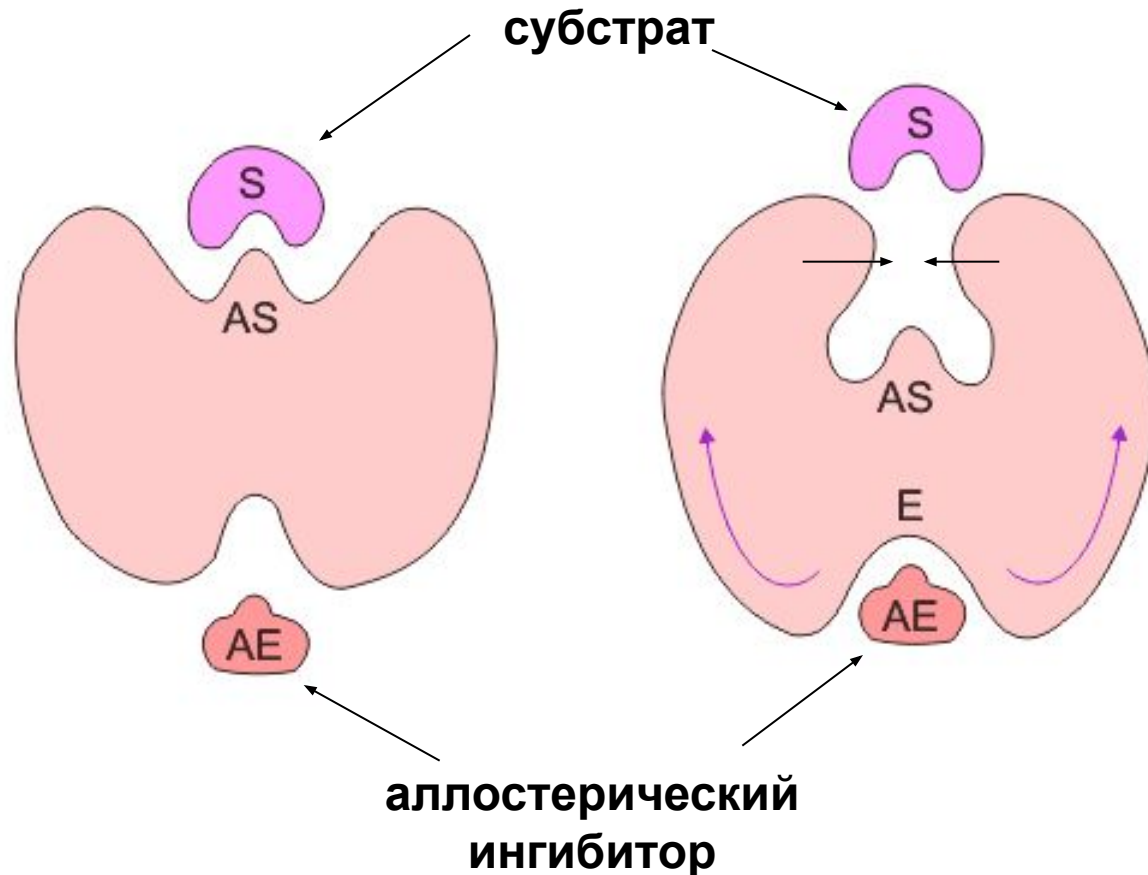
Отрицательные регуляторы – снижают активность: при одной и той же [S], $\uparrow K_m$ и/или $\downarrow V_{max}$

Общий механизм действия аллостерических регуляторов

Аллостерические регуляторы, связавшись со своими центрами, вызывают конформационные перестройки всей молекулы фермента, в первую очередь – каталитического центра.

В результате этого меняется сродство субстрата к ферменту ($\uparrow\downarrow K_m$) или меняется ($\uparrow\downarrow V_{max}$). Возможно и то, и другое одновременно.

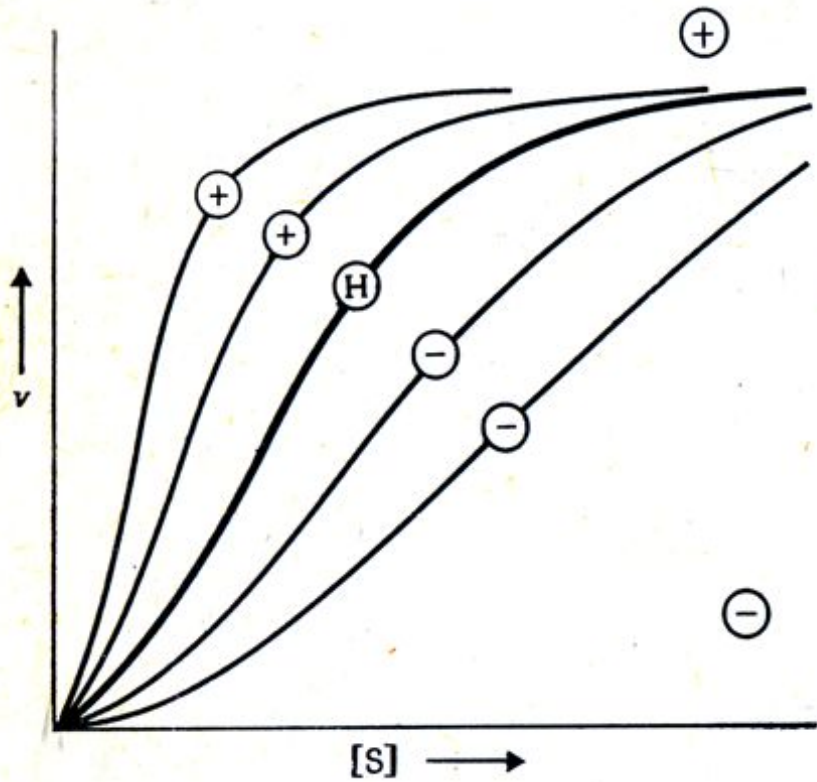
Схема механизма влияния
аллостерического ингибитора (АЕ) на
активный центр аллостерического фермента
(АС)



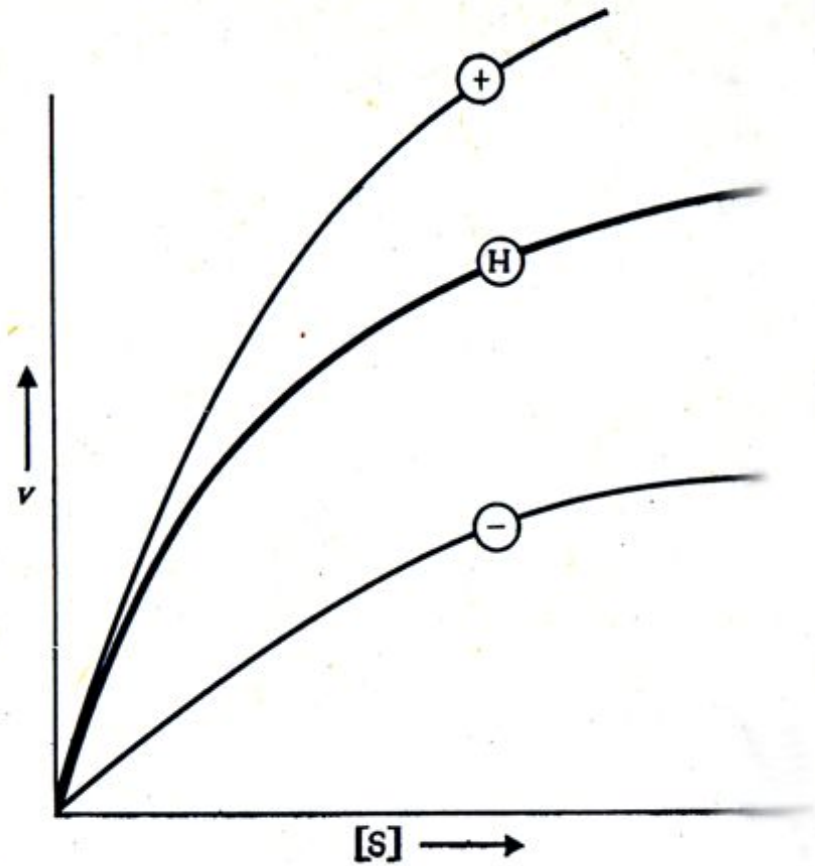
- В случае **аллостерического фермента**, незначительные сдвиги **[S]** приводят к существенным изменениям скорости ферментативной реакции – **основное проявления кооперативности во взаимодействии активных центров.**
- Под влиянием незначительных концентраций **аллостерических регуляторов** происходят значительные изменения каталитических свойств аллостерических ферментов: ΔK_m и/или ΔV_{max} .

У аллостерических ферментов, **сигмовидная форма кривой** зависимости скорости реакции от концентрации субстрата – **отражает явление кооперативного взаимодействия** каталитических центров в составе субъединиц фермента.

- + кооперативность** – регулятор повышает сродство фермента к субстрату, активизирует фермент.
- кооперативность** – регулятор снижает сродство фермента к субстрату, снижает активность фермента.



Пример изменения сродства фермента к субстрату (K_m) без изменения V_{max} под влиянием + или - аллостерических регуляторов.



Пример изменения V_{max} без изменения сродства фермента к субстрату под влиянием + или - аллостерических регуляторов.

Характерные примеры регуляции активности аллостерических ферментов

Активация протеинкиназы А (ПКА) с помощью цАМФ.

Неактивная ПКА – тетрамер: 2 регуляторных и 2 каталитических субъединицы. цАМФ (аллостерический активатор) связывается со специфическими сайтами на регуляторных субъединицах ПКА, что приводит к диссоциации (освобождению) каталитических субъединиц. Они становятся активными и фосфорилируют соответствующие белки–мишени, изменяя их активность.

Ретроингибирование или отрицательная обратная связь. Конечный продукт метаболического пути, являясь аллостерическим ингибитором, снижает активность регуляторных ферментов, расположенных в начале этого пути (**АТФ** подавляет активность **фосфофруктокиназы** и **пируваткиназы** гликолиза).

В 1910-1913 гг. **Арчибальд Хилл** разработал математический аппарат, позволяющий количественно охарактеризовать степень проявления кооперативности [Hill A.V. (1910) *J. Physiol.*, 40].

А. Хилл рассматривал процесс в динамике: **заполнение центров связывания молекулами лигандов происходит не мгновенно, а последовательно.**

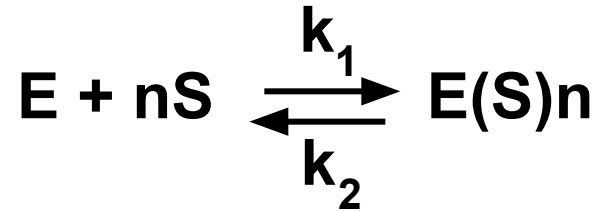
Для количественной характеристики этого явления в каждый данный момент времени им было введено понятие **степень насыщения (Y)**:

$$Y = \frac{y}{1-y}$$

Степень насыщения (Y) – отношение числа центров, связавшихся с лигандом (**y**), к числу центров, оставшихся свободными (**1-y**).

Y = 0, если все центры свободны; **Y = 1**, когда все центры заняты.

Уравнение Хилла



n – число центров, связывающих S

$$k_1 [E][S]^n = k_2 [E(S)_n]$$

$$[E(S)_n] = \frac{k_1 [E][S]^n}{k_2}$$

$$\frac{k_1}{k_2} = K, \text{ то: } [E(S)_n] = K [E][S]^n$$

Для того, чтобы учесть процесс **постепенного** заполнения участков связывания молекулами субстрата, Хилл предложил эмпирическое уравнение:

$$Y = \frac{K [S]^n}{1 + K [S]^n} \quad \text{для случая } \textit{частичного}$$

заполнения участков

Если все участки связывания заняты молекулами S (*случай насыщения*), то уравнение примет вид:

$$Y = K [S]^n$$

Y – степень заполнения активных центров молекулами
субстрата

поскольку $Y = \frac{y}{1-y}$, то для случая насыщения:

$$\frac{y}{1-y} = K [S]^n$$

Уравнение Хилла:

$$\lg \left[\frac{y}{1-y} \right] = \lg K + n_x \lg[S]$$

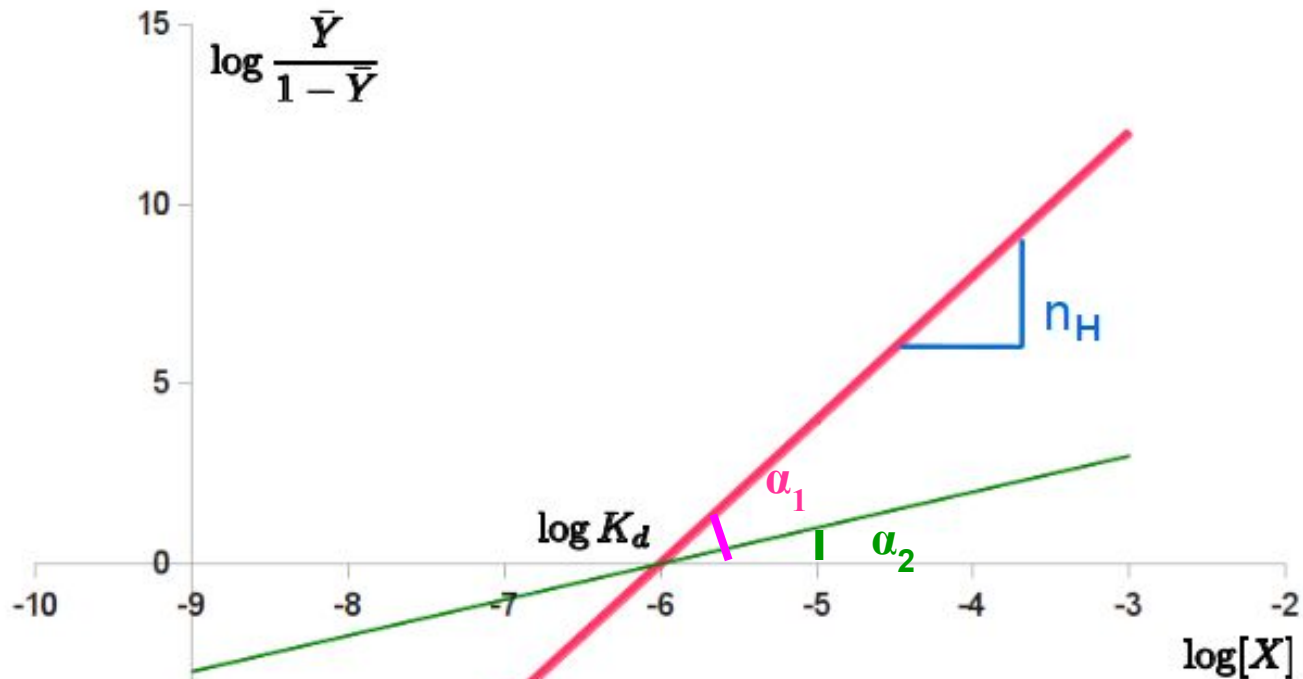
Логарифмирование уравнения позволяет линеаризовать график

График Хилла



*Чем больше величина n ,
тем больше
кооперативность*

График Хилла для кооперативного связывания
(красная линия) и некооперативного связывания
(зеленая линия)



$\text{tg} \alpha_1 > 1$ – при кооперативном связывании;
 $\text{tg} \alpha_2 \leq 1$ – при некооперативном связывании.

Если рассматривать скорость ферментативной реакции, то уравнение Хилла будет иметь вид:

$$\lg \left[\frac{v}{V_{\max} - v} \right] = \lg K + n \times \lg[S]$$

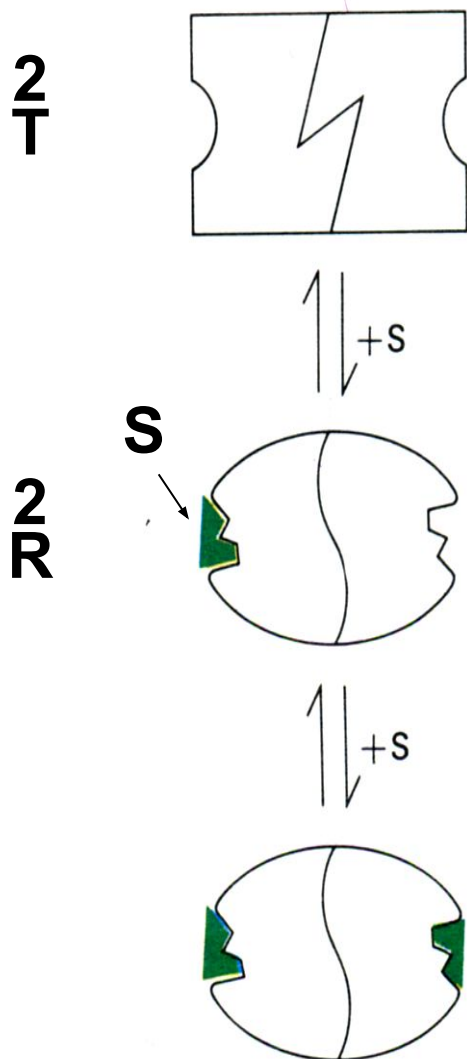
v – скорость реакции при данной степени заполнения центров (определяется концентрацией субстрата).

V_{max} – максимальная скорость.

Основы современных представлений о структуре и механизме функционирования аллостерических ферментов были заложены работами ряда исследователей в период с 1955 по 1963 годы: Робертс, Амбуржье, Герхард, Парди, Моно, Жакоб, Шанжё.

Модель согласованного механизма кооперативного взаимодействия S и E

«Симметричная» модель или модель Моно-Уаймена-Шанжё



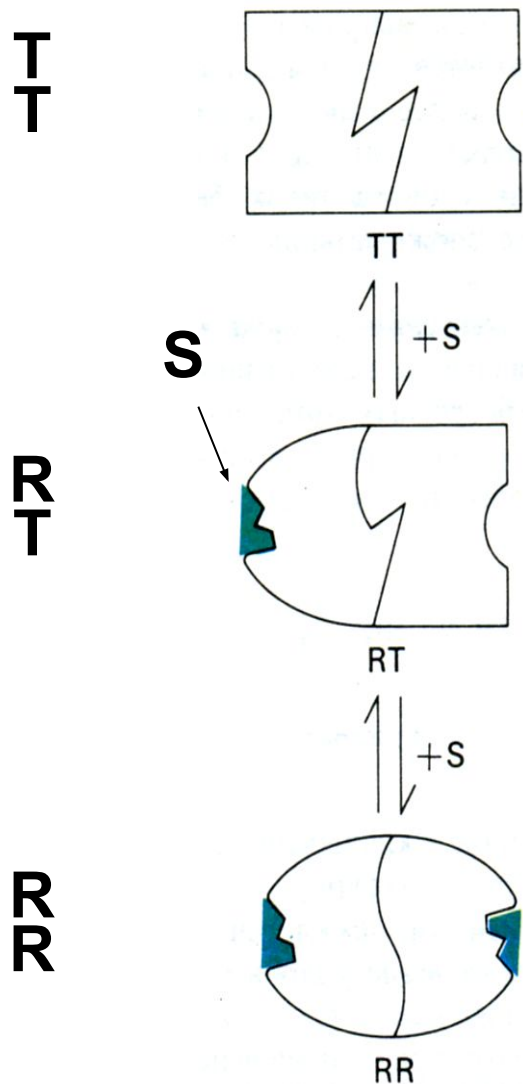
Постулаты модели:

1. Фермент содержит 2 субъединицы: T или R
2. T - напряженная конформация, низкое сродство к S
3. R- релаксированная конформация, высокое сродство к S
4. В отсутствии S: T \square R (равновесие)
5. В присутствии S: T \square R (переход). Связывание первой молекулы S – индукция перехода T \square R
6. Переход T \square R всегда **согласован**: 2T \square 2R

Алlost. ингибитор взаимодейств. с T и стабилизирует её.

Алlost. активатор взаимодейств. с R и стабилизирует её.

Модель последовательного кооперативного связывания S с E или модель Кошленда



Постулаты модели:

1. Фермент содержит 2 субъединицы, существующие в двух независимых конформациях: T и R
2. Связывания первой молекулы S индуцирует переход T \rightleftharpoons R только одной из двух субъединиц
3. Появляется гибридная форма RT
4. Этот процесс изменяет сродство к S второй субъединицы (+ или -)
5. Связывание второй молекулы S завершает переход обеих субъединиц в R конформацию.

Отличие модели Кошленда в том, что переход T \rightleftharpoons R происходит не одновременно, а последовательно.