

Лекция

Регуляция активности ферментов

Ферменты -биокатализаторы белковой природы, обладающие высокой специфичностью и эффективностью действия, присутствующие во всех живых клетках. Они катализируют только:

1. Энергетически выгодные реакции, как и химические катализаторы
2. Не изменяют направление реакции
3. Не расходуются в процессе реакции
4. Структурно не изменяются

Отличие от химич. катализаторов:

1. Высокая *эффективность действия*
2. Действуют в *мягких условиях*
3. Обладают высокой *специфичностью*
4. Активность ферментов контролируется и регулируется
5. Механизм ферментативного катализа при котором *энергетический барьер* преодолевается путем снижения *энергии активации*
6. Чаще действуют *полиферментные системы*, кот. поэтапно последовательно осуществляют реакции определенного важного процесса

Классификация ферментов (1961г. Международная комиссия по ферментам)

I. **Оксидоредуктазы** - катализируют процессы окисления и восстановления. Окисляют субстраты в аэробных и анаэробных условиях.

Типы окисления:

- Дегидрирование
- Гидроксилирование
- Оксигенация и т.д.

Осуществляют очень важный процесс – **биологическое окисление**. Это сложные ферменты, имеющие **коферменты** НАД, НАДФ, ФАД, производные порфиринов. Подразделяются на *подклассы по критерию окисления* тех или иных группировок. **Например:**

Подкласс 1.1. - ферменты, окисляющие СН-ОН группу (малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа).

Подкласс 1.2 - окисляют кето и альдегидные группы.

Подкласс 1.6. - ферм., донором водорода для которых являются восстановленные НАД, НАДФ, т.е. НАДН, НАДФН₂.

Всего 17 подклассов.

II. Трансферазы- осуществляют перенос групп атомов и название составляется - донор:акцептор-транспортируемая группа-трансфераза. Подклассы –определяют природу транспортируемой группы, содержат углеродные остатки или азот.

Подкласс 2.1- переносит одноуглеродные метильные, формильные, карбоксильные и др.группы (метилтрансфераза, формилтрансфераза).

Подкласс 2.2 осущ. перенос кето и альдегидных групп (транскетолаза, трансальдолаза). Имеет 8 подклассов.

III. Гидролазы- расщепляют внутримолекулярные связи при помощи молекулы воды(H_2O). Названия состоят из субстрат-гидролаза.

Подкласс 3.1- катализирует гидролиз эфирных связей (обладают широкой специфичностью). Этот подкласс катализирует тиоэфирные связи.

Подкласс 3.2. –кат. гликозидные N- или S- связи. 11 подклассов.

IV. Лиазы (синтазы)-ферменты, разрывающие связи C-C, C-N, C-O, C-S, с образованием двойных (=)связей. Возможна обратная реакция присоединения H_2O . по месту разрыва двойных связей или NH_3 , CO_2 , а также некоторые обратимые реакции синтеза. Они называются «синтазами».

Важнейшие группы альдолазы (4,1), гидротазы(4,2), дегидротазы, декарбоксилазы, например - пируватдекарбоксилаза, альдолазы, цитратсинтетаза.

V. Изомеразы-катализируют внутримолекулярные превращения. Это в основном простые белки.. Систематическое название исходит из названия субстрата и типа изомеризации. Например,

Подкласс 5.1 Представители этого класса – рацемазы – катализируют превращение , например L-аминокислот в D-аминокислоты.

Подкласс 5.2 Представители цис-транс-изомеразы или эпимеразы. Эти ферменты вызывают взаимные переходы сахаров (галактоза – глюкоза). Всего класс изомераз содержит 6 подклассов.

VI. Лигаза(синтетаза)- катализируют процессы конденсации двух молекул за счет энергии АТФ, например аспартат-аммиак-лиазы.

Подкласс 6.1 –катализируют образование C-O.

Подкласс 6.2 катализируют образование C-S связей в процессе присоединения кислотных остатков к КоА. Включает 5 подклассов.

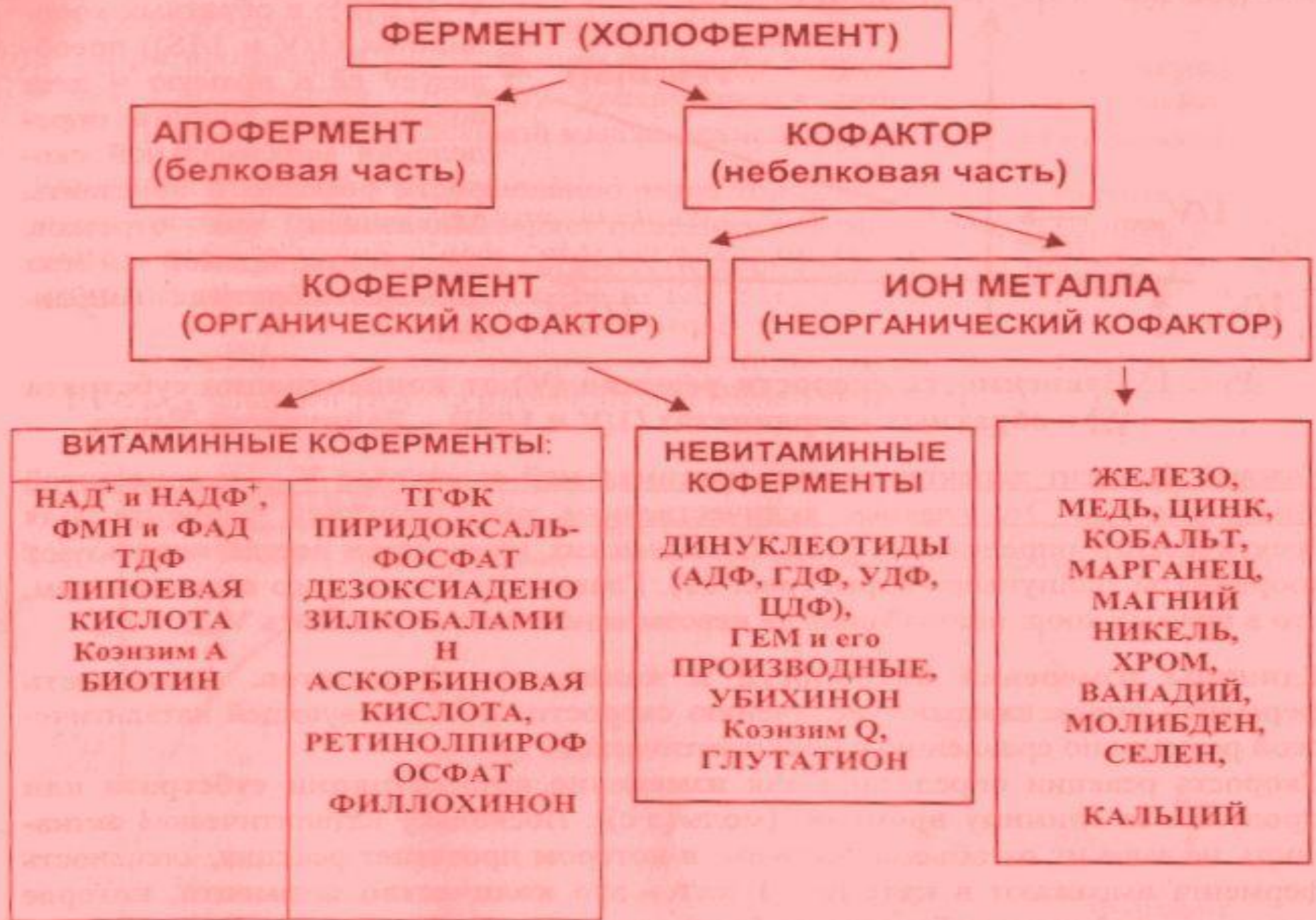
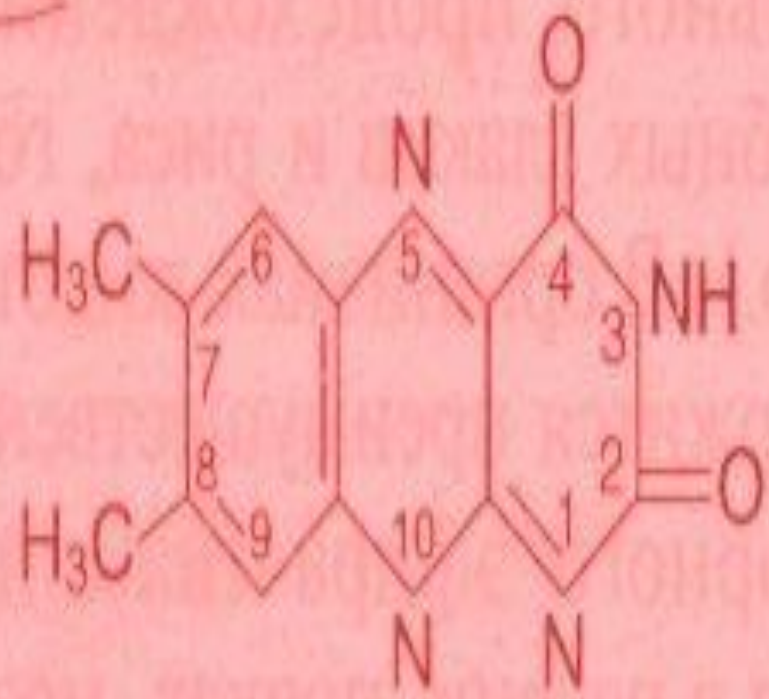
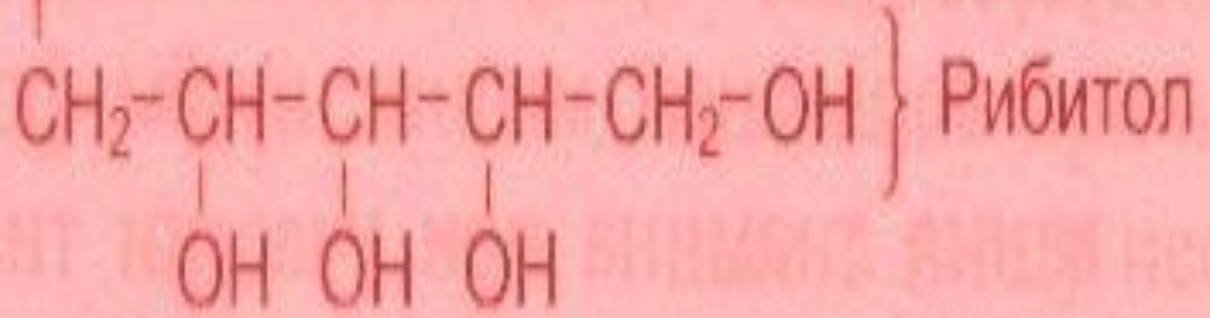


Рис. 16 Органические и неорганические кофакторы

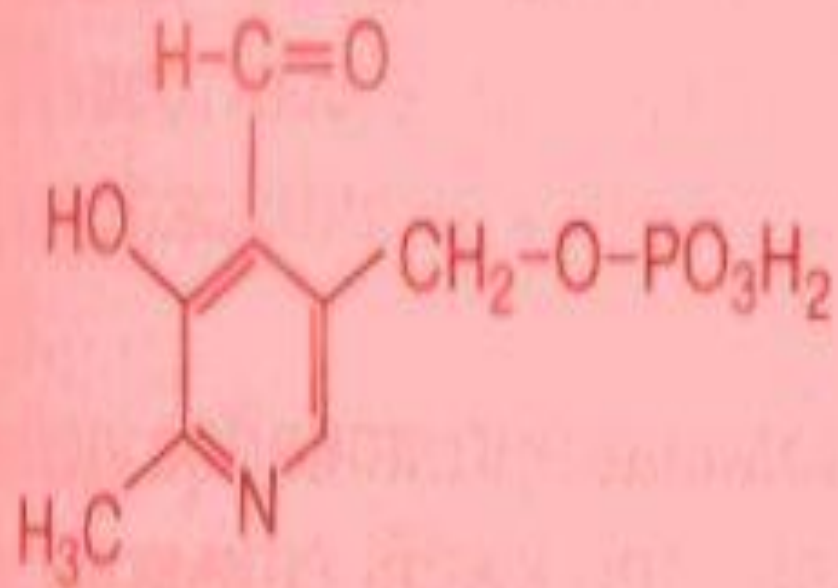


Изоаллоксазин

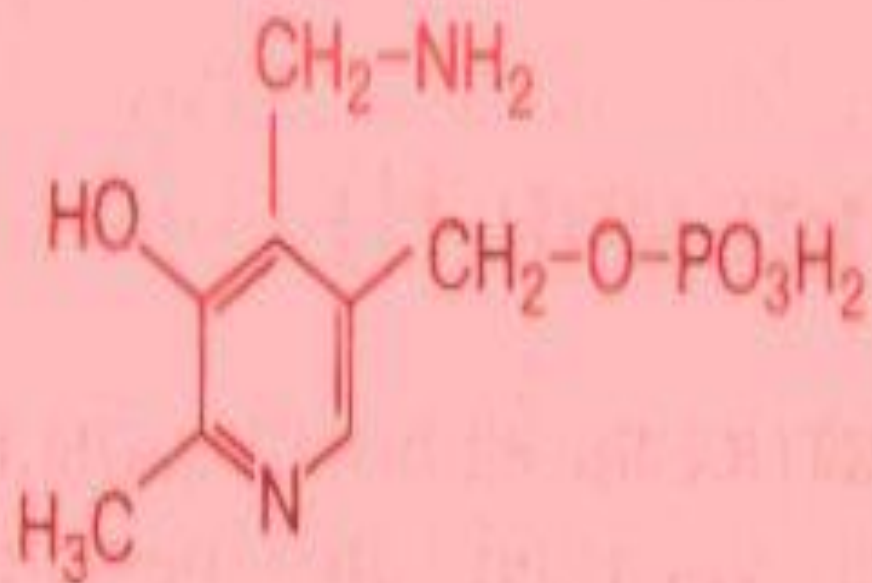


Рибитол

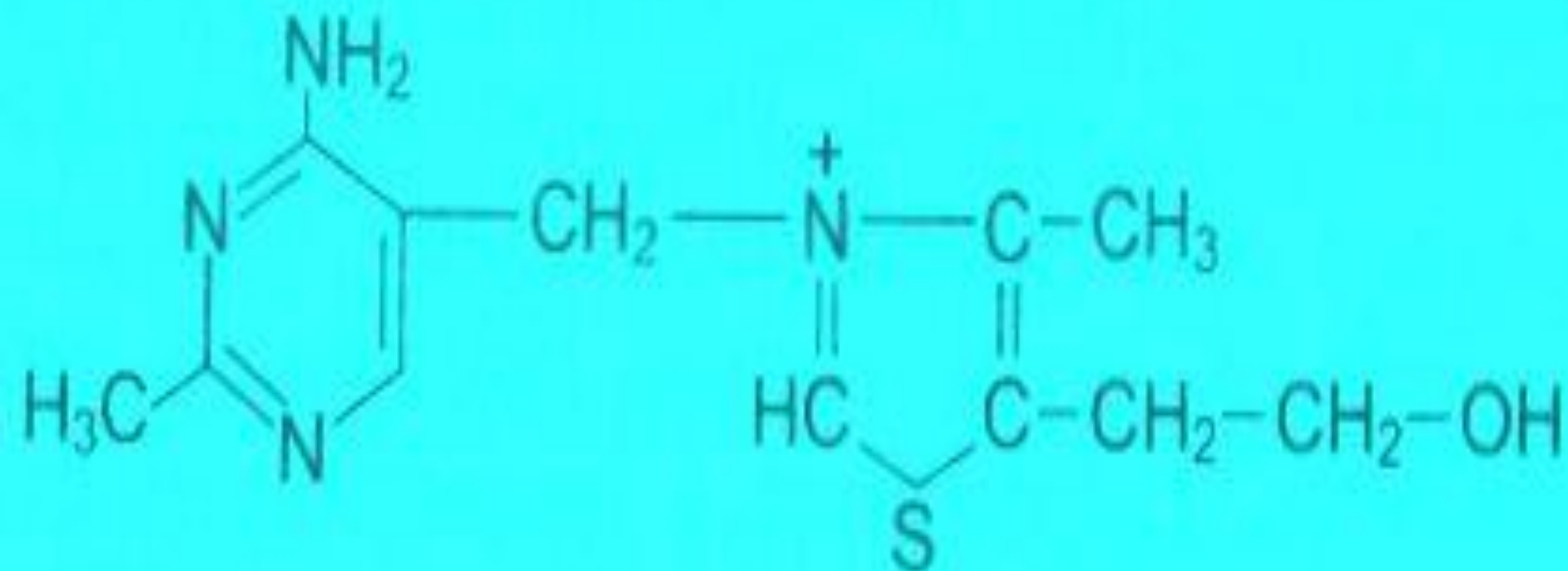
Витамин В₂



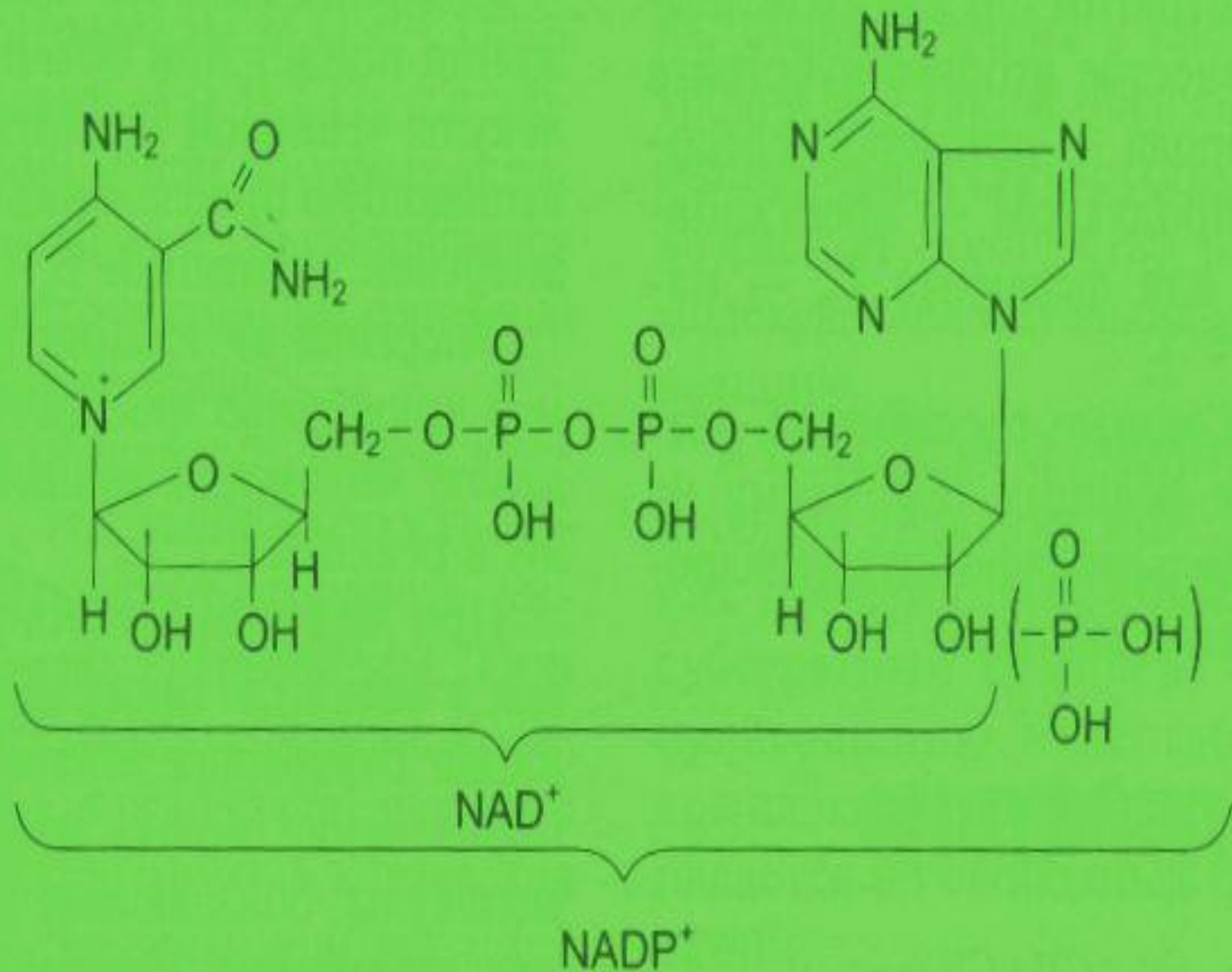
Пиридоксальфосфат



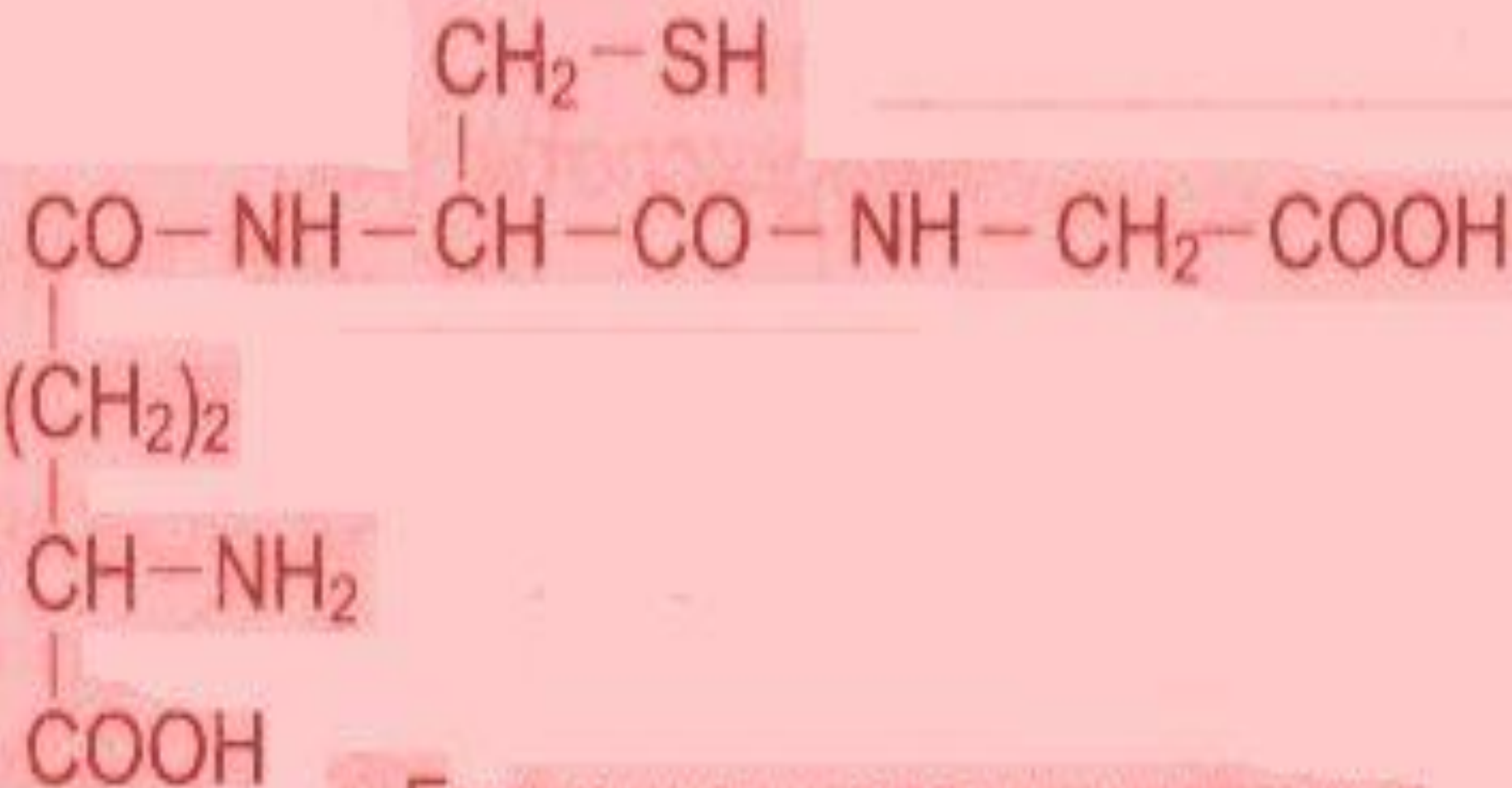
Пиридоксаминфосфат



Б



Структура (А) и химическое строение (Б) коферментов NAD⁺ и NADP⁺.



γ -Глутамилцистеинилглицин
(Глутатион)

Активный центр фермента

Участок связывания

Каталитический участок

Обеспечивает
субстратную специфичность
(выбор субстрата)

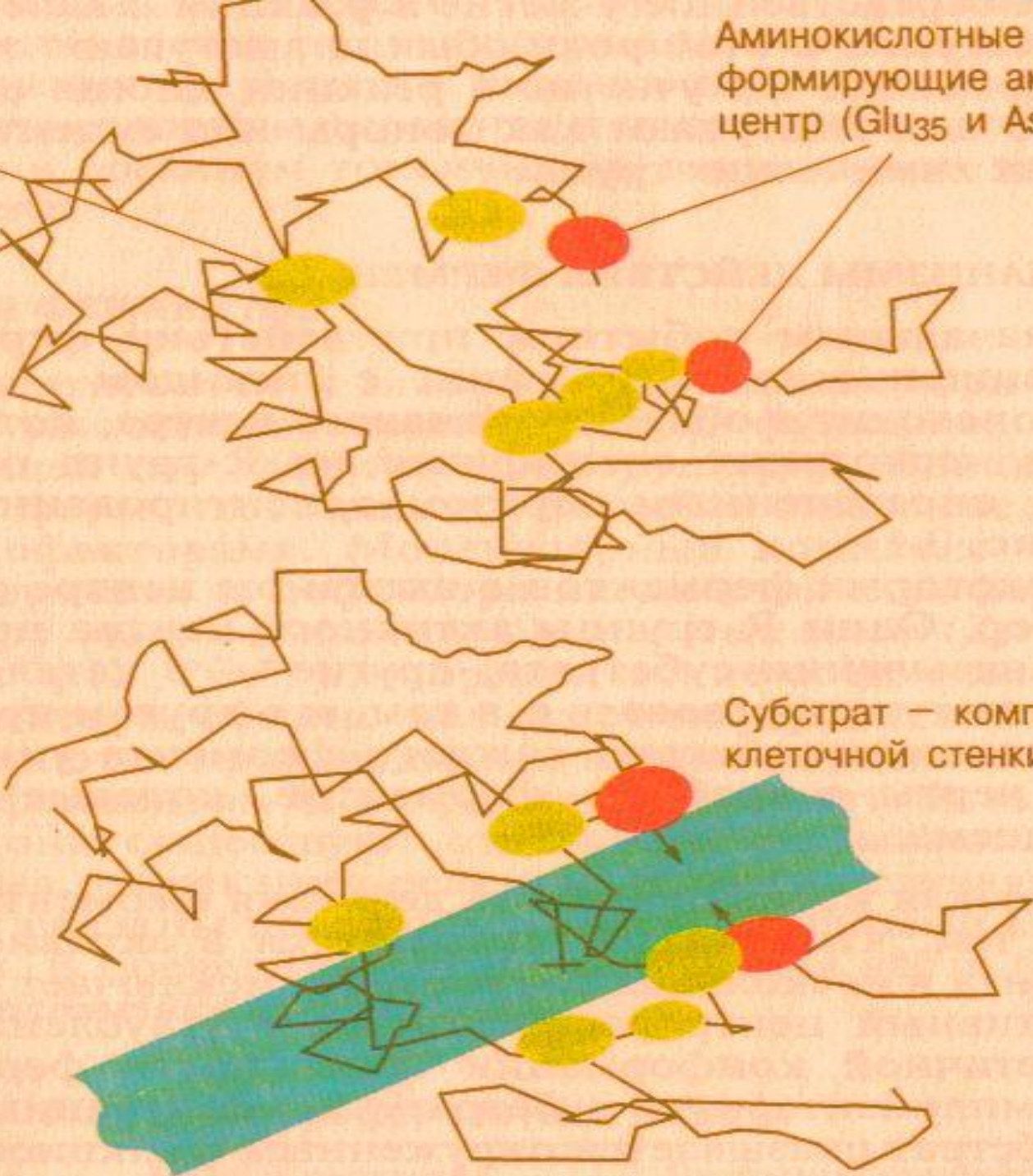
Обеспечивает выбор пути
химического превращения
данного субстрата

- абсолютная субстратная специфичность
- групповая субстратная специфичность
- стереоспецифичность

Специфичность пути
превращения

Аминокислотные
остатки,
участвующие
в связывании
субстрата

Аминокислотные остатки,
формирующие активный
центр (Glu35 и Asp52)



Субстрат – компонент
клеточной стенки



Аминокислоты, образующие активный центр фермента



Табл. 3 Изоферменты лактатдегидрогеназы и их присутствие во внутренних органах

Изоферменты ЛДГ	Субъединичное строение	Преимущественная локализация
ЛДГ ₁	4Н	Эритроциты, лейкоциты, миокард, почки
ЛДГ ₂	3Н1М	Эритроциты, лейкоциты, миокард, почки
ЛДГ ₃	2Н2М	Лимфоидная ткань, тромбоциты, опухоли.
ЛДГ ₄	1Н3М	Печень, скелетные мышцы, неопластические ткани.
ЛДГ ₅	4М	Печень, скелетные мышцы, неопластические ткани.

Ферментативный катализ-

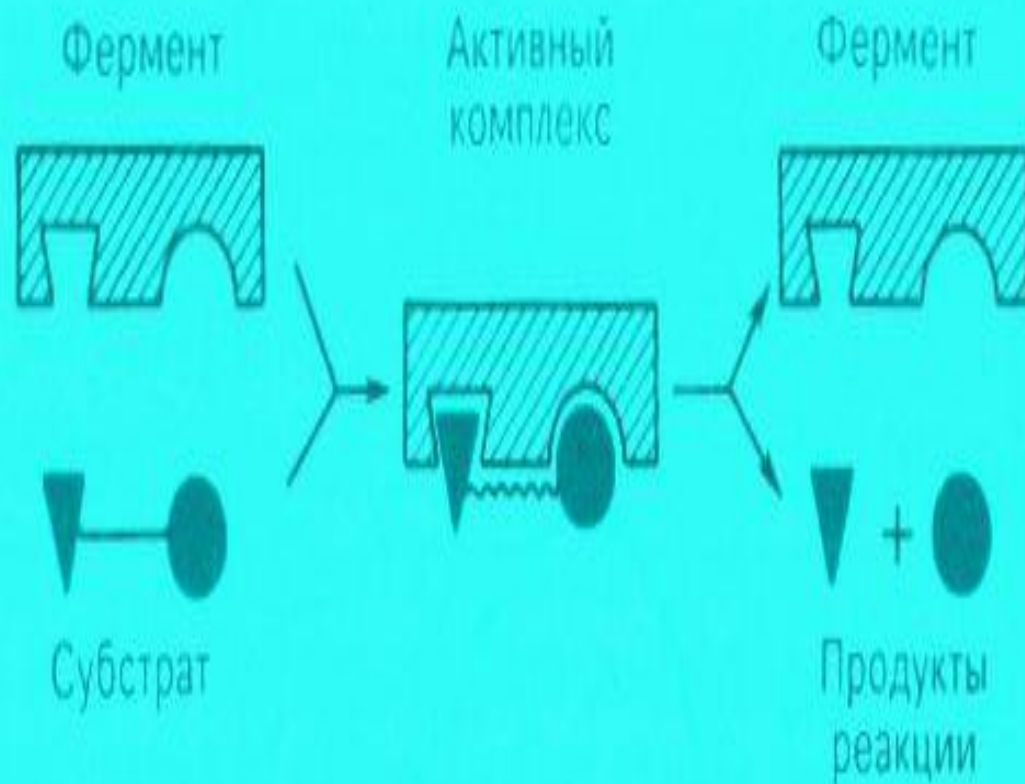
осуществляется при контакте субстрата с ферментом.

Существуют две теории ферментативного катализа:

1. **Теория Фишера** – фермент взаимодействует с субстратом по принципу полного пространственного и топографического соответствия (как ключ к замку).
2. **Гипотеза Кошленда:** основан на принципе комплементарного взаимодействия фермента при контакте с субстратом (индукция соответствия).

Любой субстрат состоит из молекулы и обладает внутренней энергией, которая складывается из 1 энергии поступательного и вращательного движения молекул, 2 энергия движения электронов, ядерная энергия.

Рис. 4.7. Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок».



В состоянии покоя – преобладают молекулы с малой свободной энергией (СЭ). Из состояния покоя систему выводит энергия активации (ЭА).

ЭА – это та энергия, которую необходимо сообщить молекулам системы для достижения энергетического барьера и преодоления его, начало реакции.

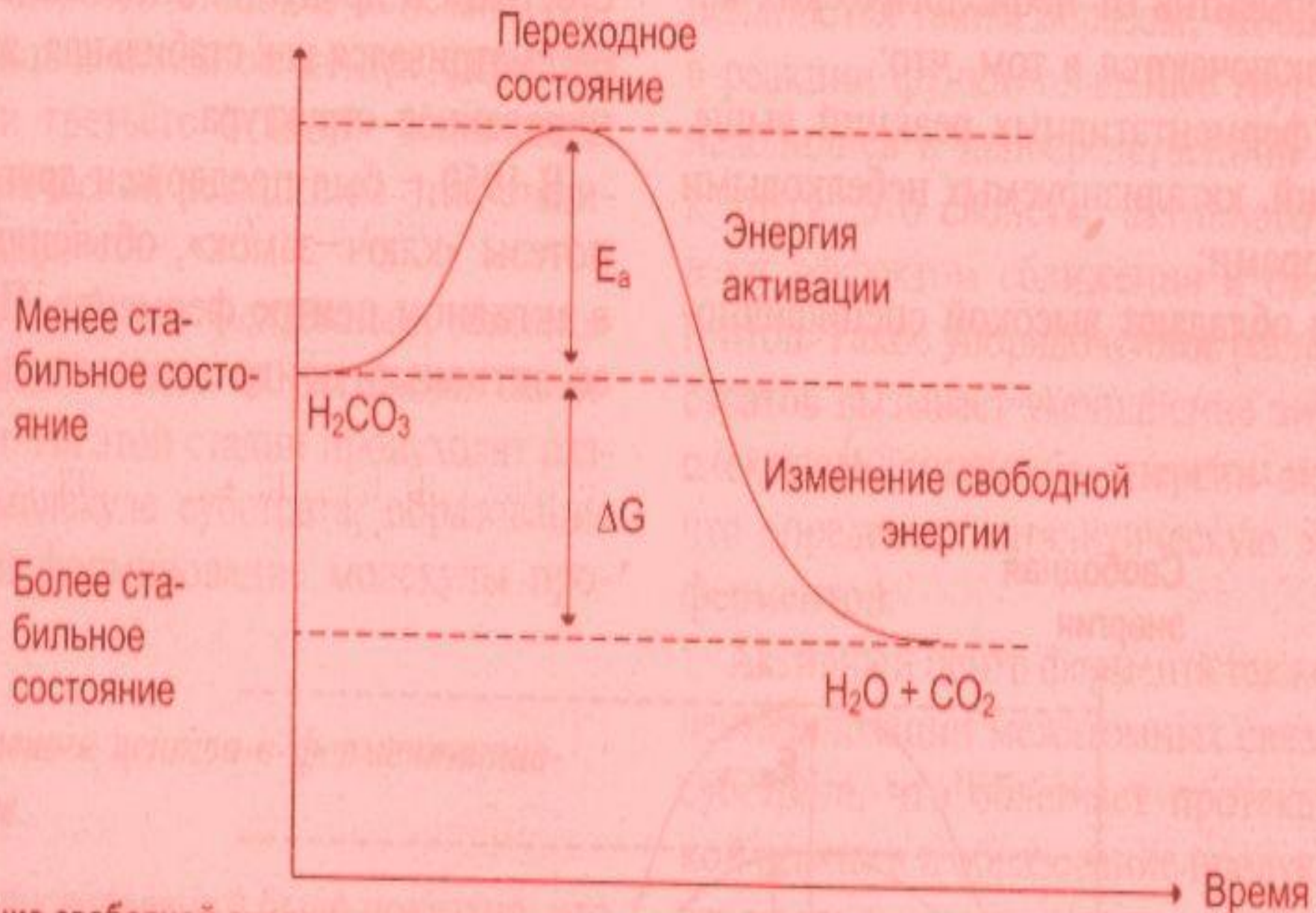
Энергетический барьер (ЭБ)- это минимальный уровень энергии системы, который необходимо преодолеть для начала реакции.

Энергия активации (ЭА)- переводит субстрат из состояния покоя в состояние возбуждения, или переходное состояние, которое характеризуется непрерывным разрывом и образованием химических связей. Достичь этого переходного состояния можно двумя путями: 1.Повышая ЭА (путем повышения температуры); 2. Снижением ЭА.

Второй путь возможен при использовании катализаторов.

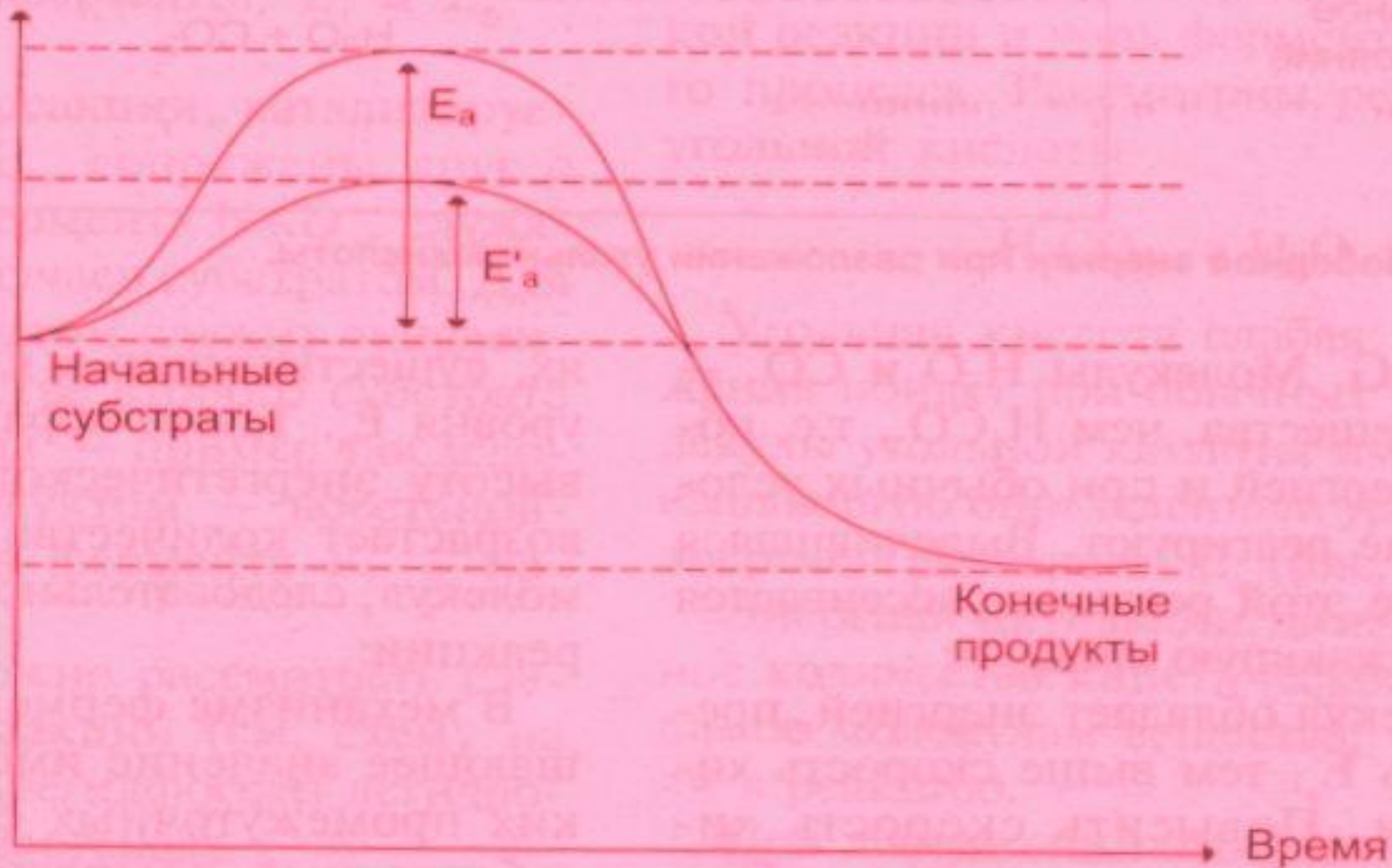
Ферменты помогают субстратам принять переходное состояние за счет энергии связывания с субстратом и образования ES – комплексов. Исходный активационный барьер дробится на более низкие барьеры , образованные слабыми связями, на преодоление которых затрачивается меньше ЭА.

Свободная энергия



Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты.

Свободная энергия



E_a - энергия активации некатализируемой реакции

E'_a - энергия активации катализируемой ферментами реакции

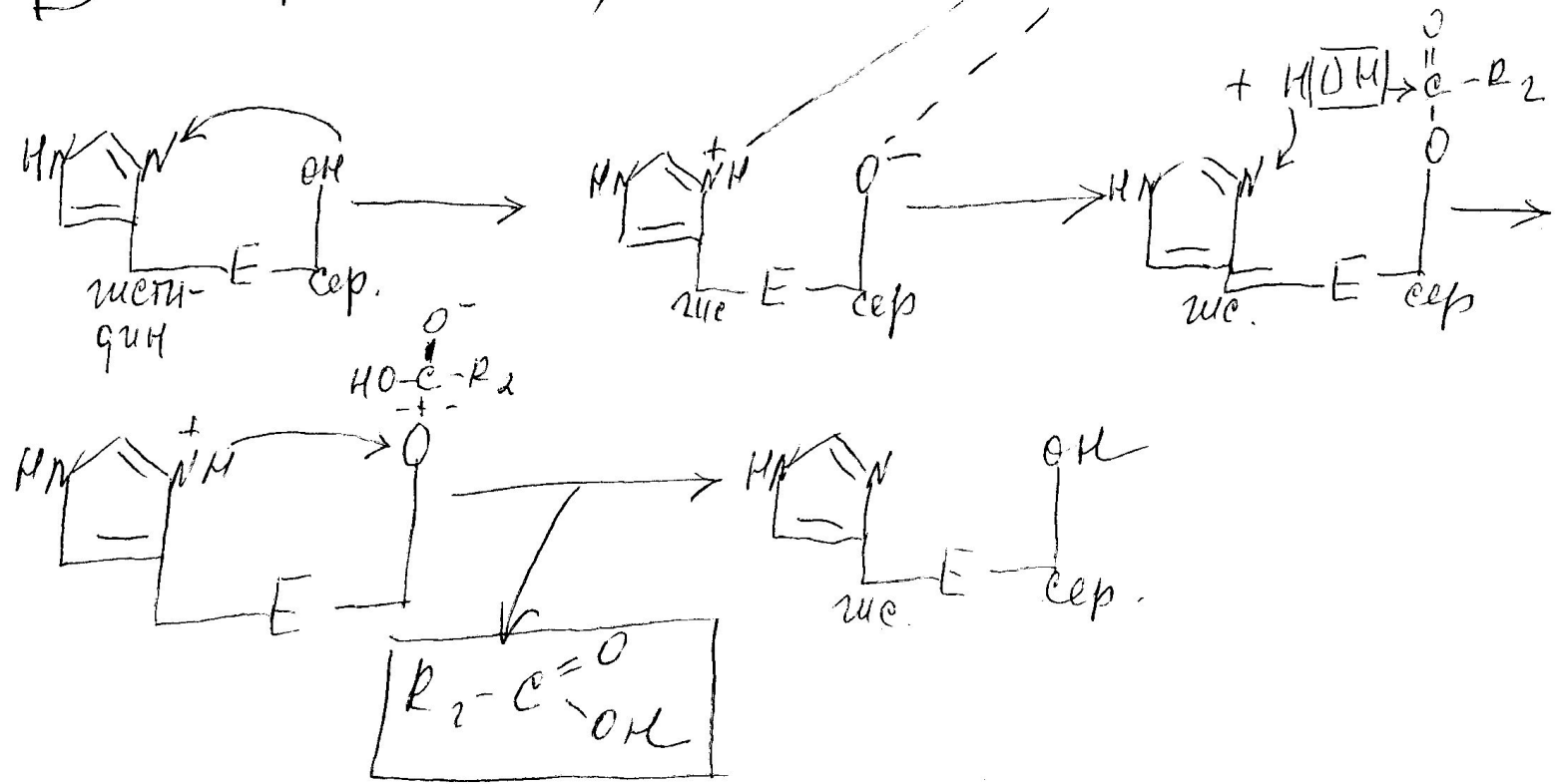
Образовавшийся новый субстрат становится менее комплементарным ферменту. Фермент – субстратный комплекс диссоциирует. Фермент структурным изменениям не подвергается и может взаимодействовать с новой молекулой субстрата. В механизме ферментативного катализа различают:

Кислотно – основной катализ;

Ковалентный катализ :

- а) Нуклеофильный ;
- б) Электрофильный.

Кислотно – основной катализ



Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента



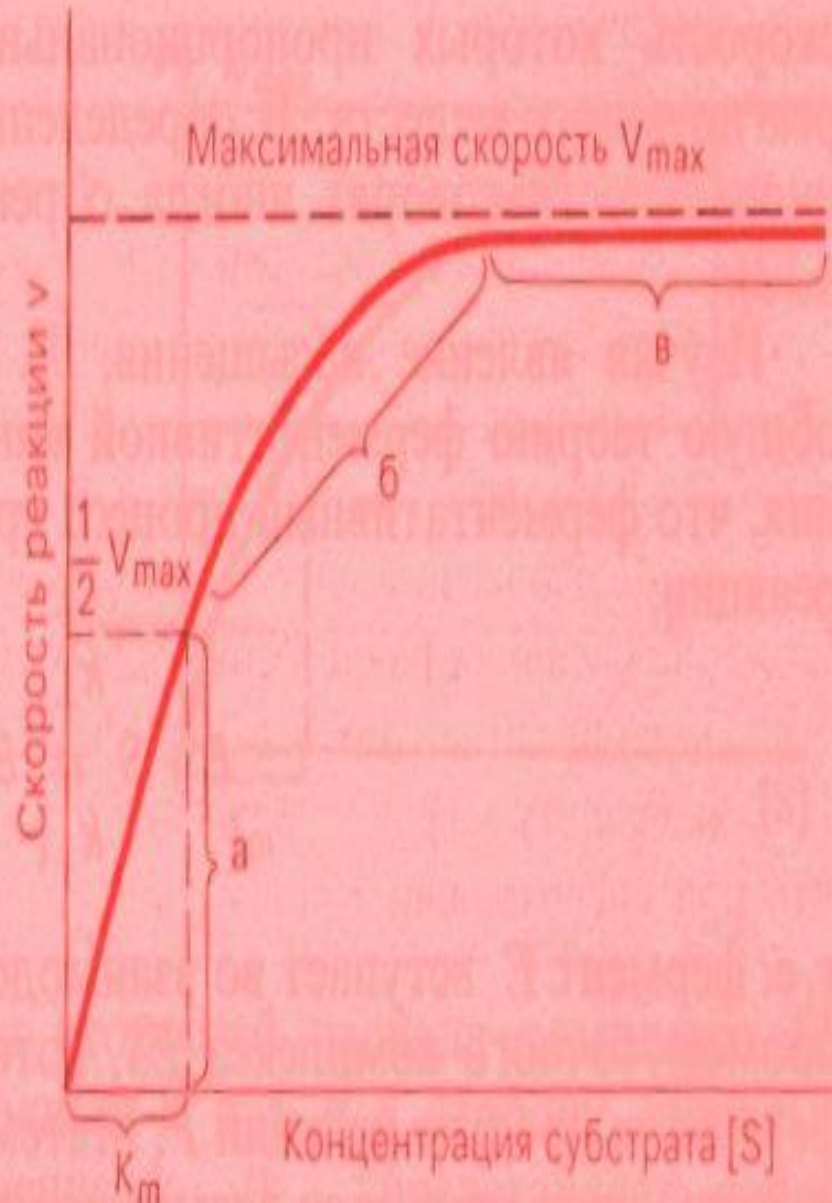
тупи, а также «близко» к началу координат, где скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата. По мере увеличения концентрации субстрата скорость реакции приближается к максимальной скорости V_{\max} .

В зависимости от концентрации субстрата реакция может быть:

- а) реакцией первого порядка (при $[S] < K_m$);
- б) реакцией смешанного порядка;
- в) реакцией нулевого порядка (при $[S] > K_m$).

Рис. 4.12. Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента.

а – реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата); б – реакция смешанного порядка; в – реакция нулевого порядка, когда $v = V_{\max}$ и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.



Регуляция метаболических путей осуществляется на 3-х уровнях (по Ленинджеру):

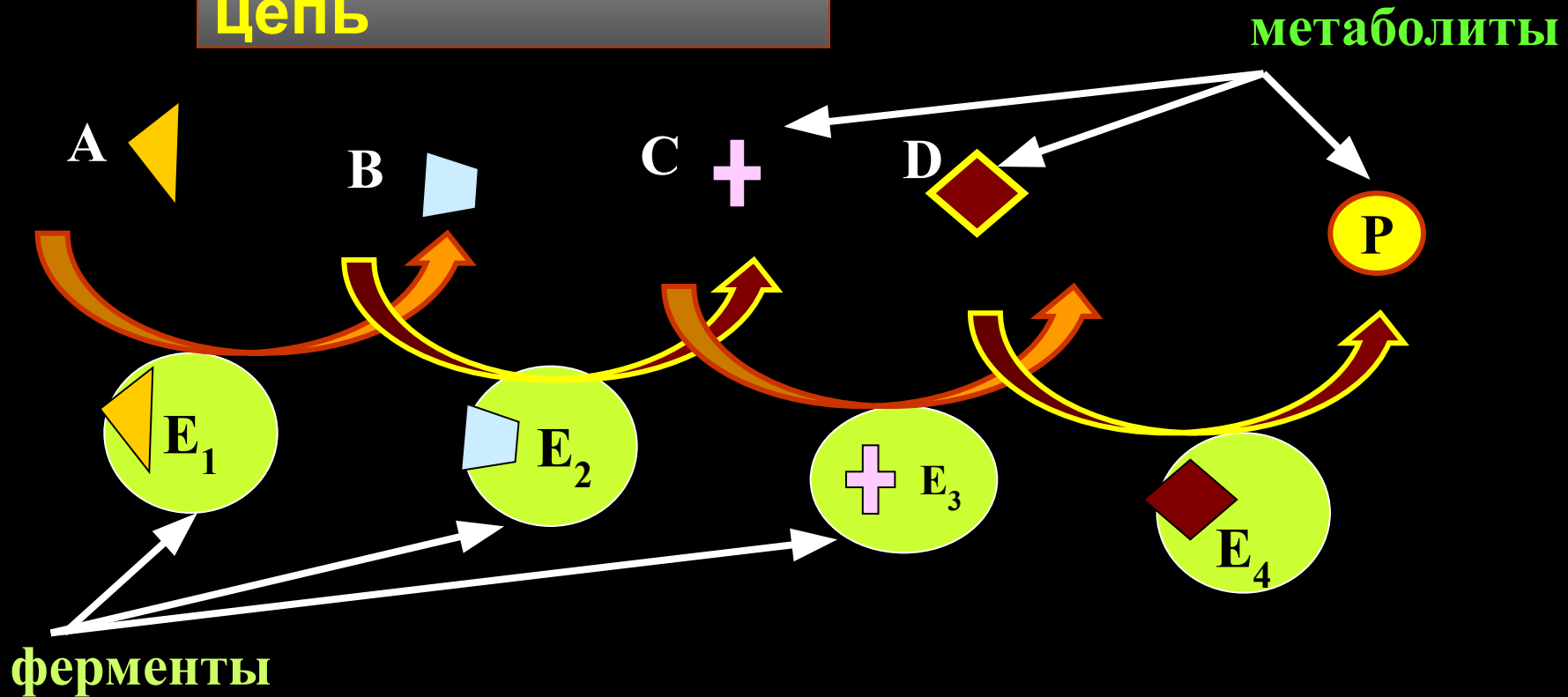
- **Быстрое реагирование**, связанное с действием аллостерических ферментов, каталитическая активность которых может меняться под влиянием особых веществ, оказывающих стимулирующее или тормозящее действие (эфффекторы, модуляторы). Ими могут быть межучточные и конечные продукты метаболических процессов в клетке, циклические нуклеотиды и их производные, металлы, имеющие переменную валентность.
- **Нейрогормональная регуляция** – у высших организмов (посредством дистантных гуморальных сигналов, действующих через мембраны, химическую модификацию или геном клетки). Ими могут быть гормоны, пептиды, биогенные амины.
- **Регуляция метаболизма** – долговременная, связанная с изменением концентрации данного фермента в клетке.

Концентрация всякого фермента в любой данный момент определяется соотношением скоростей его синтеза и распада (индукция синтеза, например – диетой).

Активаторы и ингибиторы ферментов

- **Активаторы** – это вещества: **1)** формирующие активный центр фермента (чаще – ионы 2-х валентных металлов, реже – одновалентных); **2)** облегчающие образование фермент-субстратного комплекса (Mg^{2+}); **3)** восстанавливающие S-H группы (глутатион, цистеин...); **4)** стабилизирующие нативную структуру белка-фермента. Активируют ферменты различные вещества, но чаще всего катионы металлов.
- **Ингибиторы** – это соединения, которые взаимодействуя с ферментом, препятствуют образованию нормального фермент-субстратного комплекса, уменьшая, тем самым, или прекращая скорость реакции.

Метаболическая цепь



В каждой метаболической цепи есть фермент, который задает скорость всей цепочке реакций. Он называется **регуляторным**

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

МЕХАНИЗМ СРОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ (интенсивная)

МЕХАНИЗМ ХРОНИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ (Экстенсивная)

АКТИВИРОВАНИЕ

ИНГИБИРОВАНИЕ

ИНДУКЦИЯ
ГЕНА

РЕПРЕССИЯ
ГЕНА

ХИМИЧЕСКАЯ
МОДИФИКАЦИЯ

АССОЦИАЦИЯ И
ДИССОЦИАЦИЯ

ОБРАТИМОЕ

НЕОБРАТИМОЕ
(НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ И
СПЕЦИФИЧЕСКОЕ)

А) КОВАЛЕНТНАЯ
МОДИФИКАЦИЯ
(ФОСФОРИЛОВАНИЕ,
ДЕФОСФОРИЛОВАНИЕ)

АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ
РЕГУЛЯЦИЯ

БЕСКОНКУРЕНТНОЕ

НЕКОНКУРЕНТНОЕ

Б) КОФЕРМЕНТ,
КОФАКТОР

В) ЧАСТИЧНЫЙ
ПРОТЕОЛИЗ

КОНКУРЕНТНОЕ

Различают ферменты:

- **Конститутивные** – концентрация которых в клетках всегда примерно одинаковая (поэтому их синтез не регулируется);
- **Индукцибельные** (индуцируемые, адаптивные) – при необходимости подвержены регулировке (синтез их стимулируется соответствующим индуктором);
- **Репрессируемые** (репрессибельные)– синтез которых подавляется при накоплении в клетке корепрессоров (продуктов различных процессов).

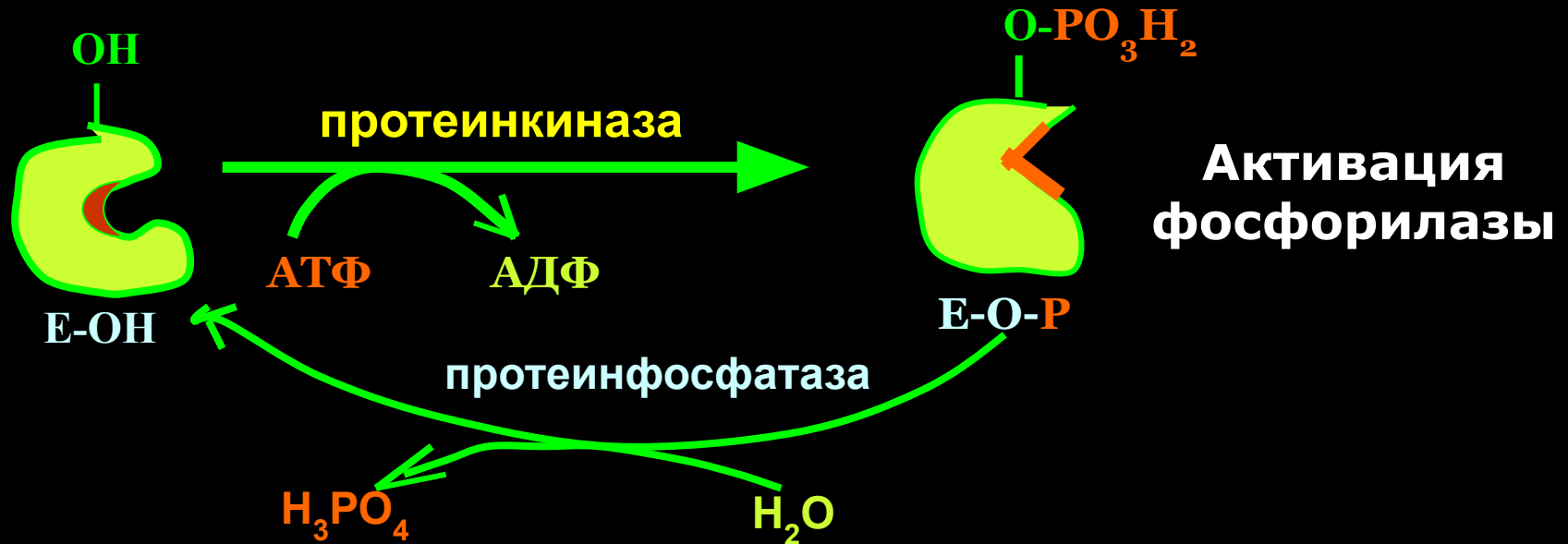
Химическая модификация

Фосфорилирование и дефосфорилирование

– обратимая ковалентная модификация при участии ферментов **протеинкиназ** и **протеинфосфатаз** соответственно (относятся к классу трансфераз).

Они катализируют образование сложноэфирной связи между фосфатной группой и ОН-группой сер, тре или тир.

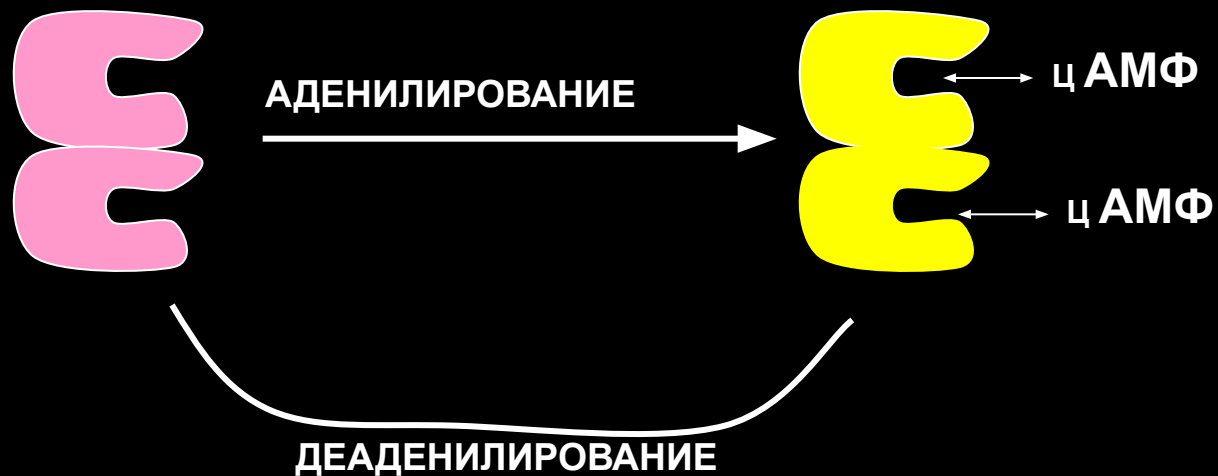
Донором фосфатной группы чаще всего является АТФ. Активность данных ферментов регулируется гормонами.





АКТИВ. ФОРМА

ГЛИКОГЕН
СИНТЕТАЗА
НЕАКТИВ. ФОРМА



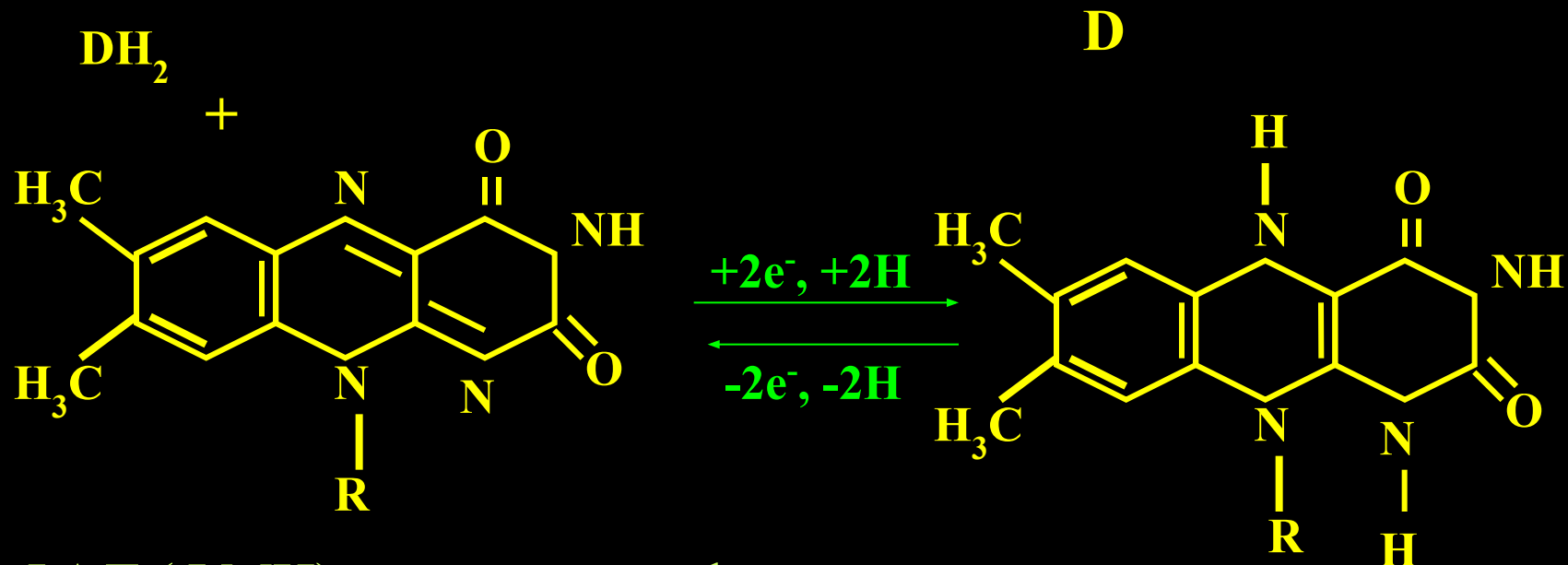
Регуляция активности ферментов при помощи коферментов и кофакторов

Кофакторы – НМС, соединенные нековалентными связями с белком, необходимые для активации фермента. Каталитически активный комплекс «фермент-кофактор» называется **холоферментом**. Отделение кофакторов приводит к образованию неактивного **апорфермента**.

Коферменты – это органические вещества. Их предшественниками являются витамины. Коферменты локализуются в активном центре фермента и выступают в качестве акцептора или донора химических группировок, атомов, электронов. Кофермент может быть связан с белком-ферментом ковалентно (простетическая группа) – ФАД, ФМН, гем, биотин, липоевая кислота, или нековалентно (рассматривается как второй субстрат) – НАД⁺, НАДФ⁺, ацетил-КоА, Н₄-фолат.

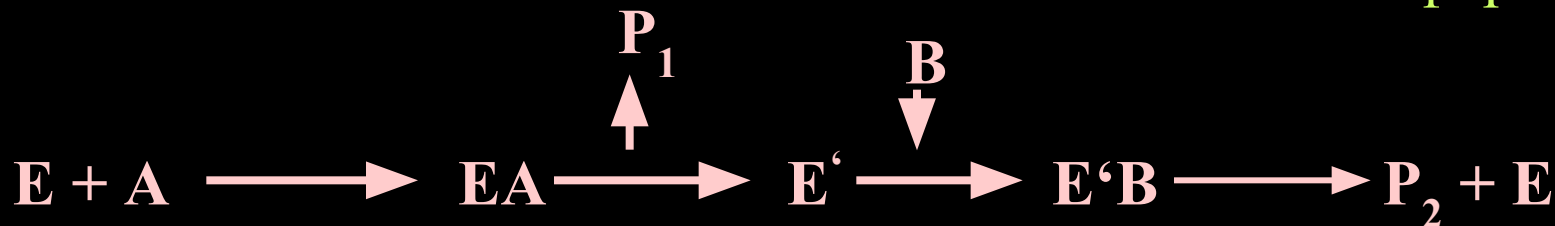
Мультисубстратные реакции

«ПИНГ-ПОНГ»



ФАД (ФМН) – окисленная форма

ФАДН₂ (ФМН-Н₂) –
восстановленная форма

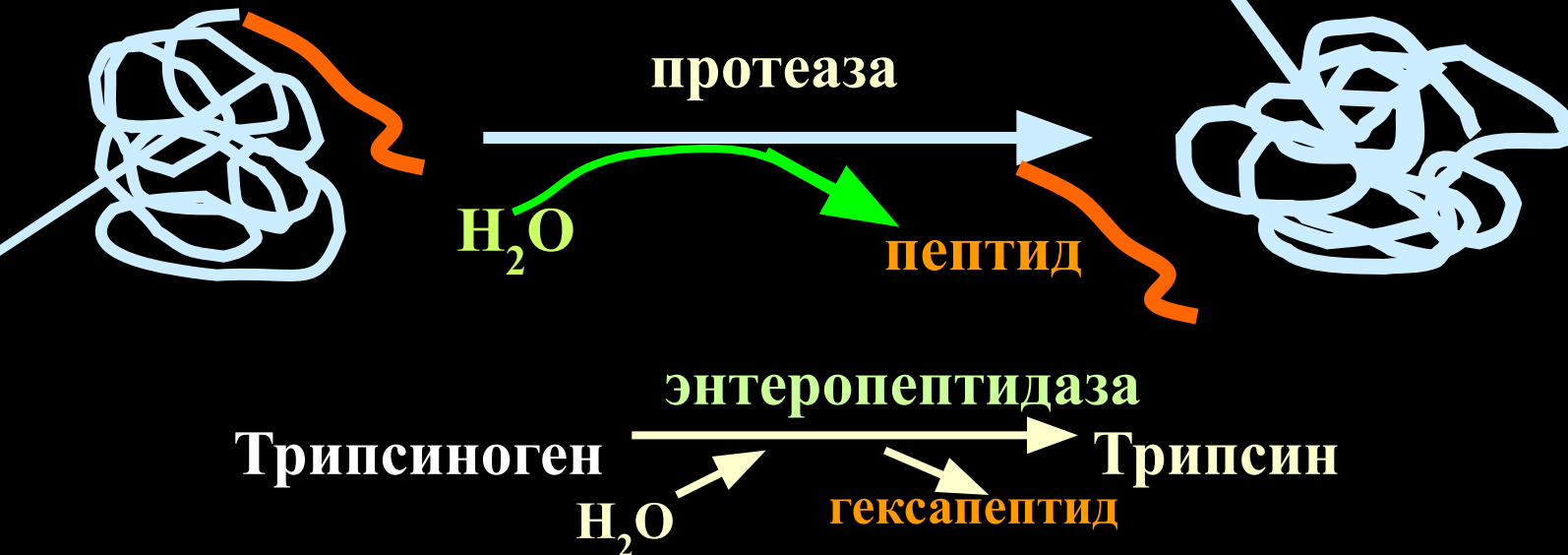


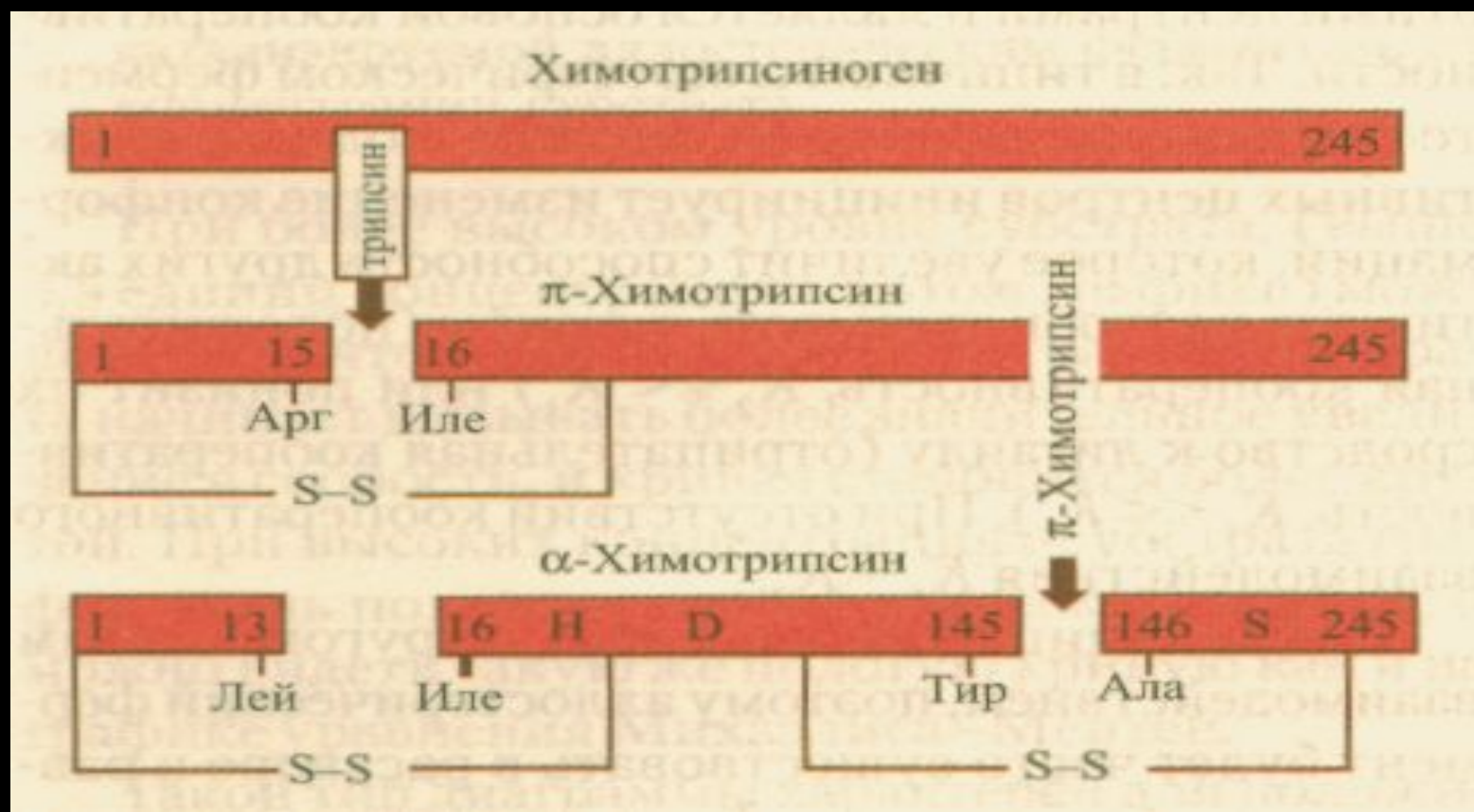
Частичный протеолиз

Активация профермента происходит путем отщепления от него одного или нескольких пептидов. При этом изменяются первичная структура, мМ, конформация фермента. Формируется активный центр.

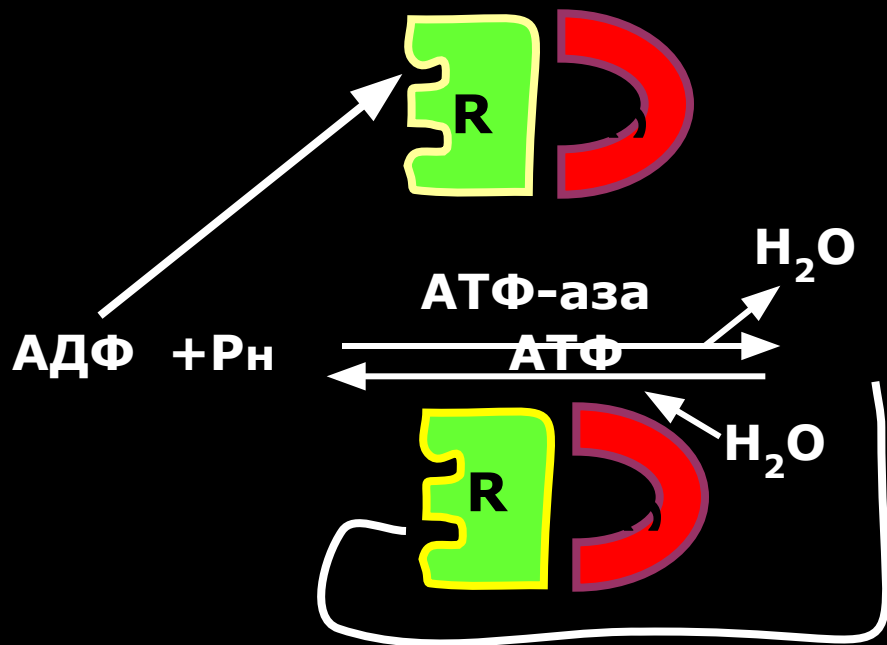
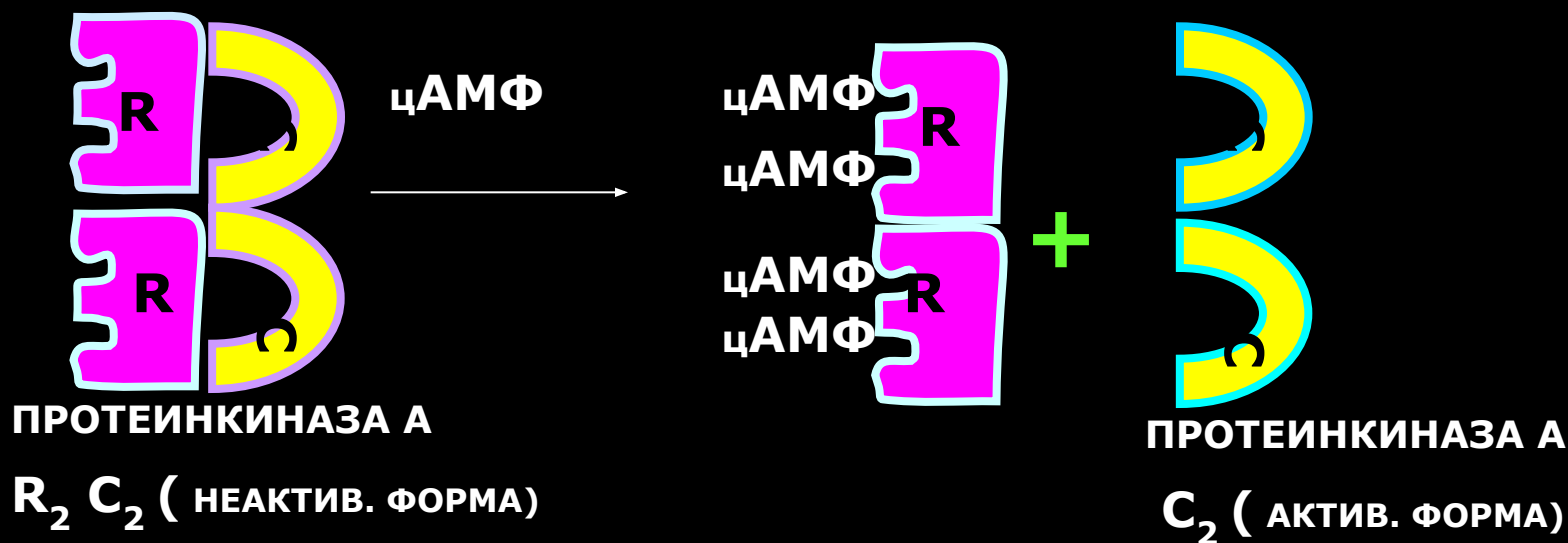
Неактивный фермент

Активный фермент



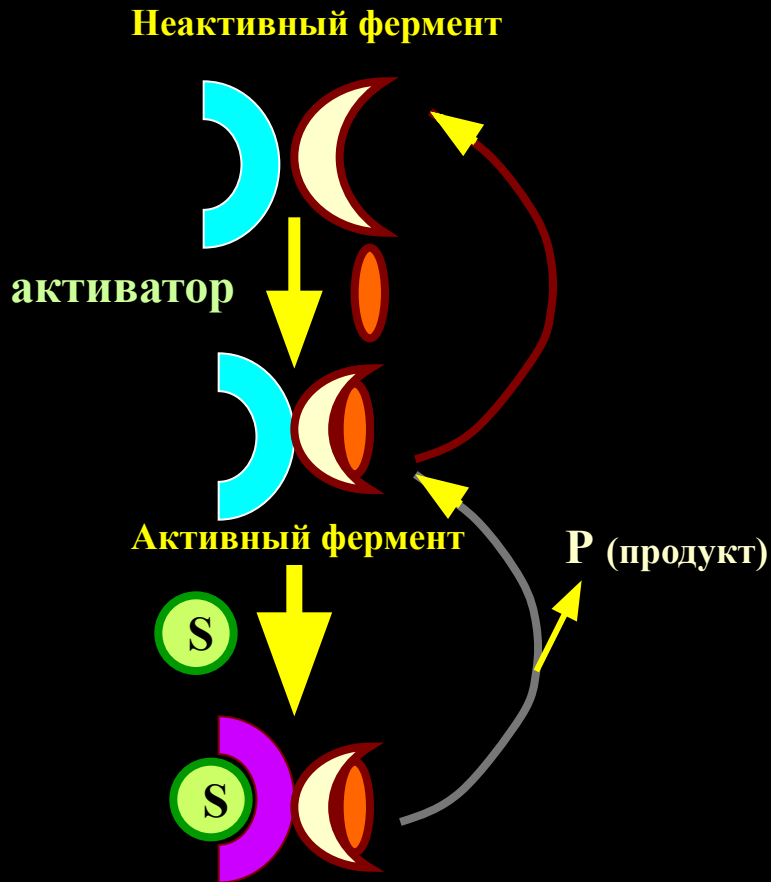


ДИССОЦИАЦИЯ



Аллостерическая регуляция

Если в аллостерическом центре связывается эффектор (активатор), то повышается связывание субстрата в активном центре и возрастает скорость реакции, которую катализирует этот фермент.



Аллостерические ферменты как правило катализируют:

- необратимые (\rightarrow) или частично обратимые (\leftrightarrow) реакции;
- самые медленные, ключевые реакции;
- реакции в местах разветвления метаболического пути

Регуляторными молекулами (эффекторами) этих ферментов могут быть:

- конечные продукты метаболических путей;
- субстраты метаболических путей;
- промежуточные метаболиты или специфические молекулы.

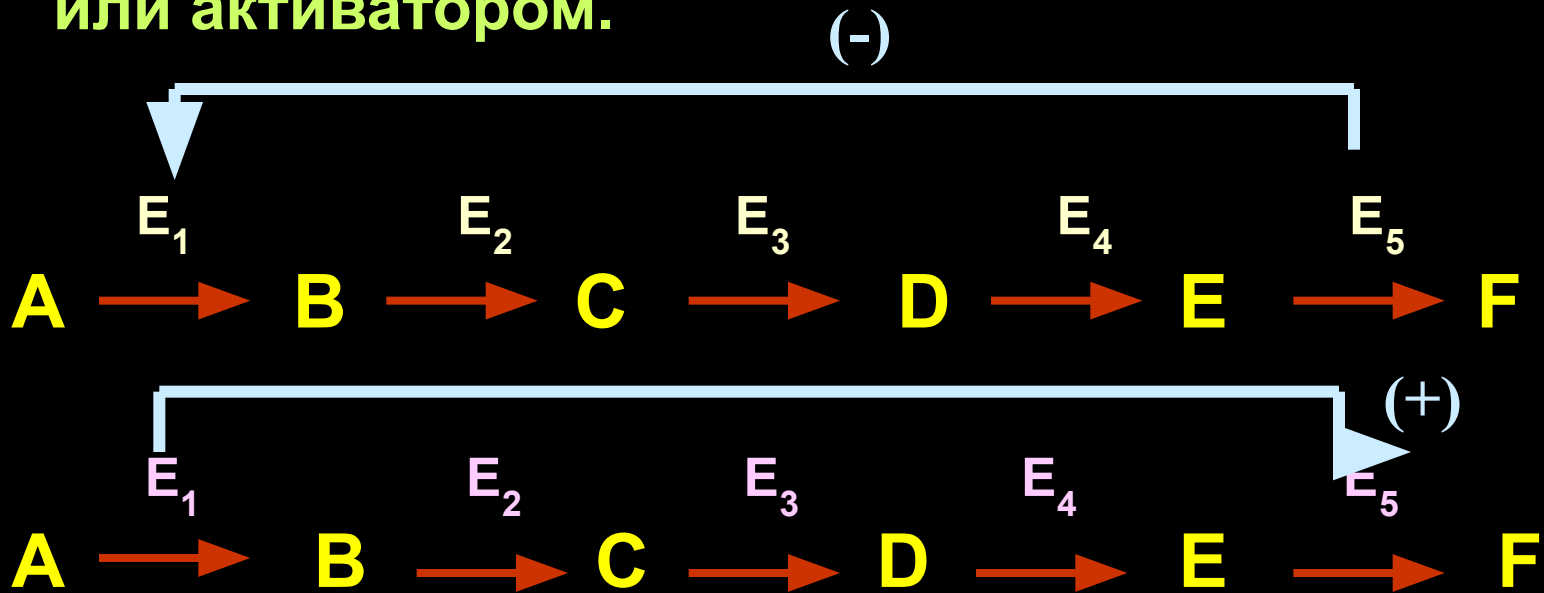
Согласно **теории Моно** аллостерические белки состоят из двух или более протомеров, связанных между собой нековалентными связями. Протомеры могут существовать в двух состояниях T и R , между которыми наблюдается равновесие. Состояния T и R обладают разным сродством к лигандам, поэтому введение в систему определенного лиганда приведет его к связыванию с тем протомером, который находится в состоянии большего сродства к данному лиганду. Вследствие связывания с лигандом равновесие между состоянием T и R будет сдвигаться, что и будет кооперативным переходом к системе (сдвиг равновесия приведет либо к ускорению, либо к замедлению каталитического процесса).

По **мнению Кошланда**, состояния T и R не предсуществуют, а индуцируются под действием связавшегося лиганда. Кроме того, переход состояния T в состояние R проходит ряд промежуточных этапов – переходных состояний.

Т.о., аллостерическая регуляция обеспечивает быстрое «включение» и «выключение» фермента в ответ на малые изменения концентрации регулятора.

Аллостерические эффекторы

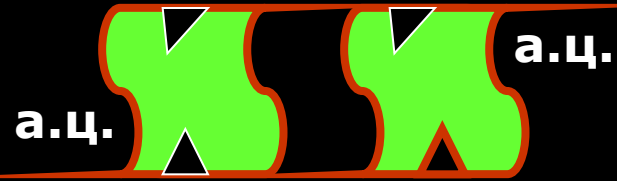
Эффекторы, вызывающие снижение (ингибирование) активности ферментов, называют **отрицательным эффектором, или ингибитором**. Эффектор, вызывающий повышение (активацию) активности ферментов, называют **положительным эффектором, или активатором**.



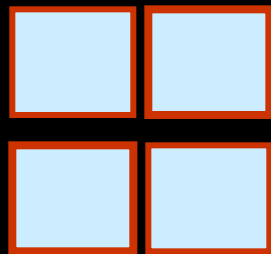
АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ



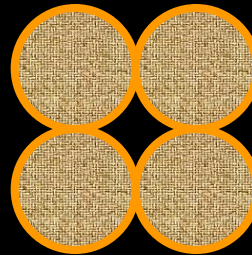
T- КОНФОРМАЦИЯ



R- КОНФОРМАЦИЯ

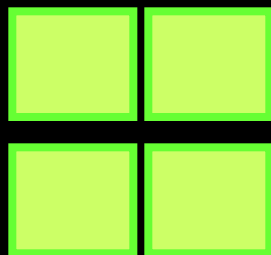


TTTT

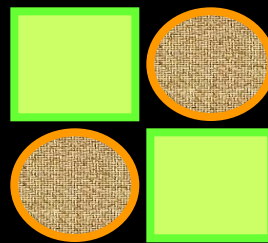
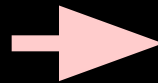


RRRR

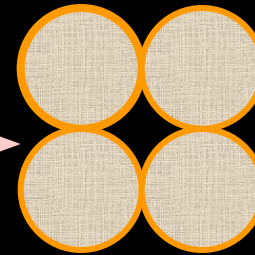
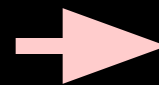
**По Моно,
Уайтману**



TTTT



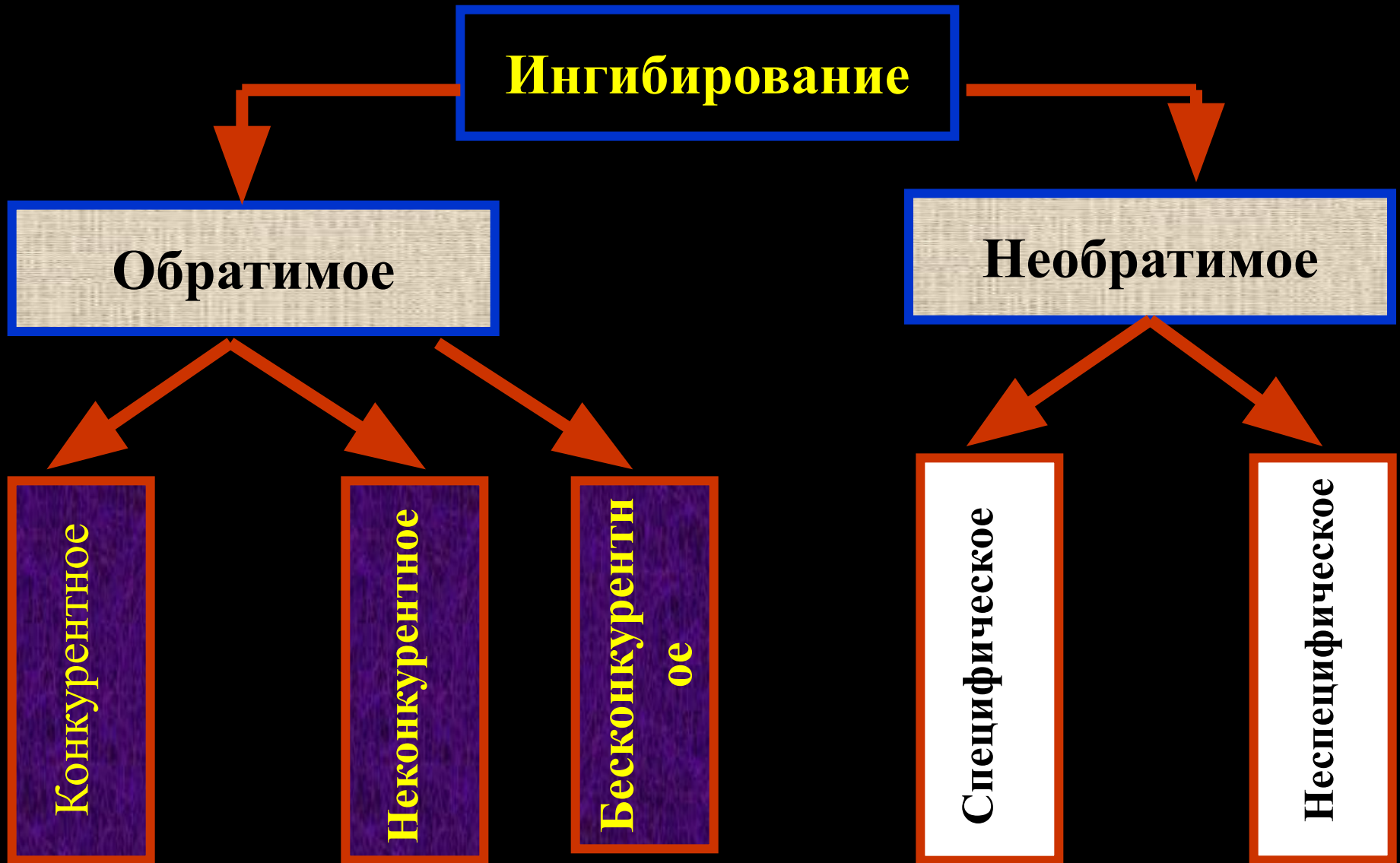
TRTR



RRRR

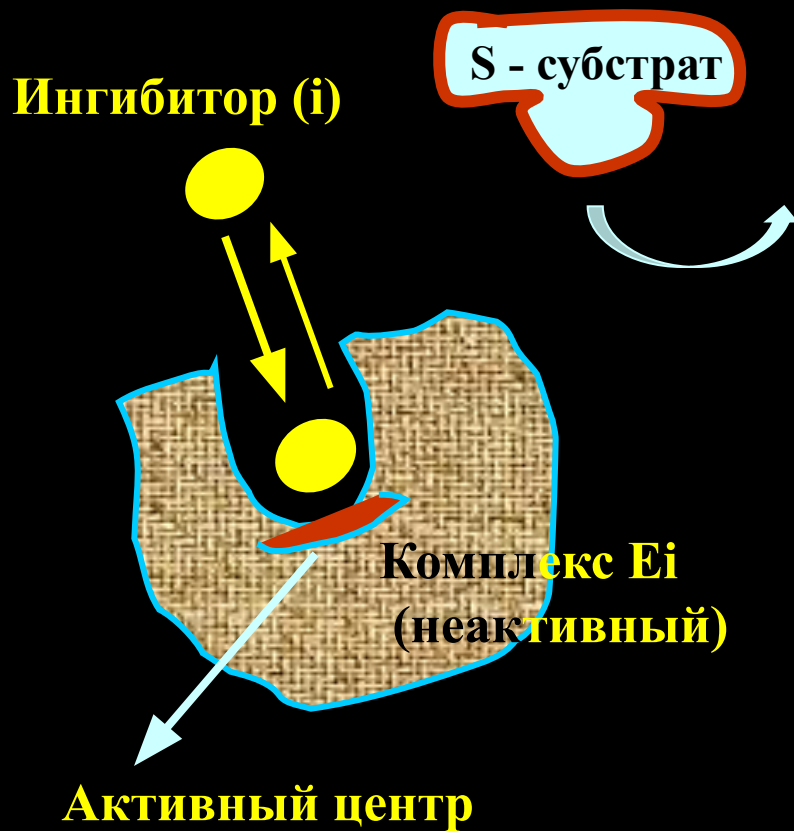
По Кошланду

Типы ингибирования



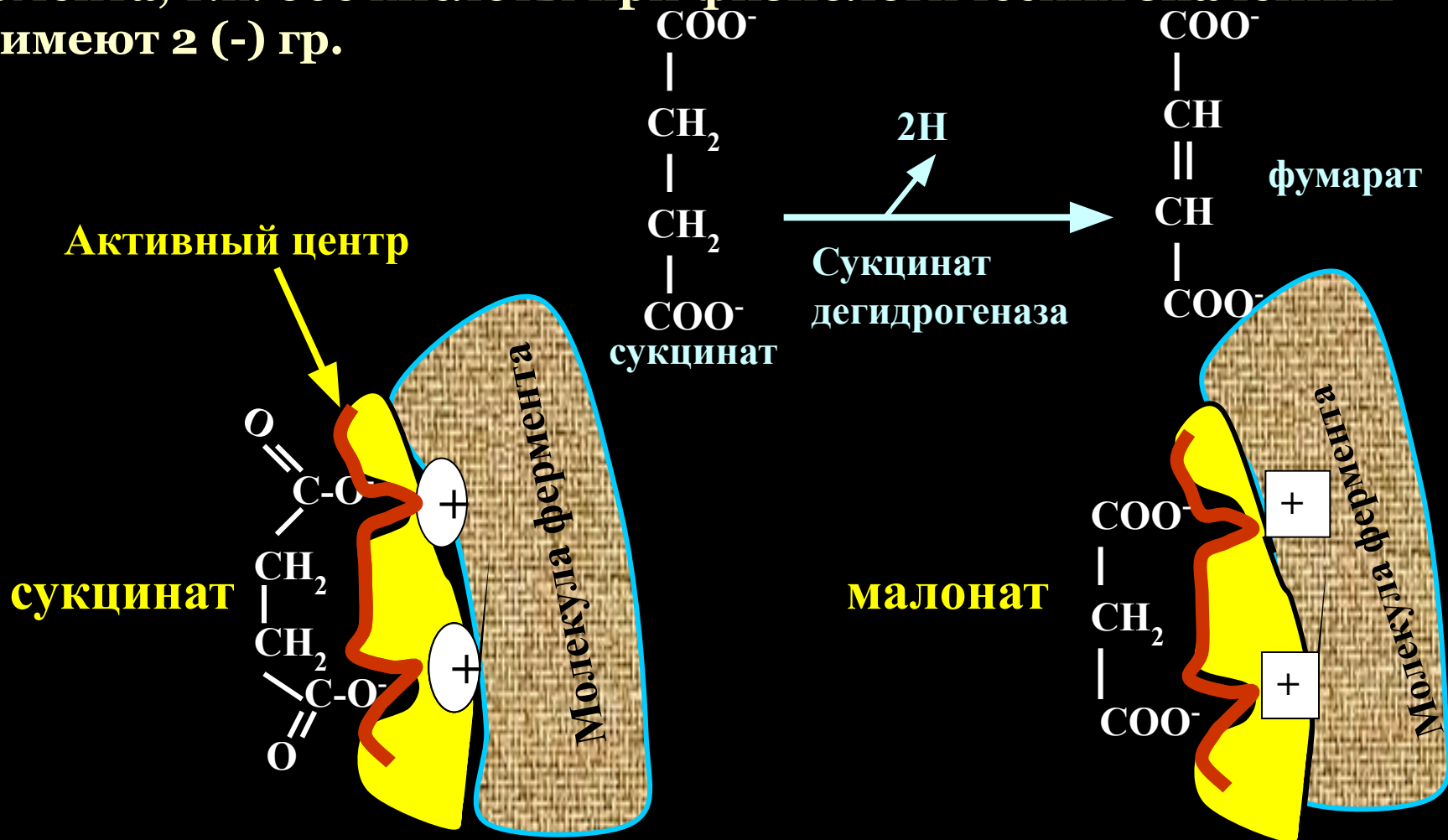
Действие конкурентного обратимого ингибитора

Обратимое конкурентное ингибирование является структурным аналогом субстратов. Они связываются в активном центре фермента, но не могут превращаться в продукт. Обратимые конкурентные ингибиторы (**i**) конкурируют с субстратом (**S**) за активный центр фермента (**E**). При повышении концентрации субстрата он вытесняет ингибитор из активного центра фермента.

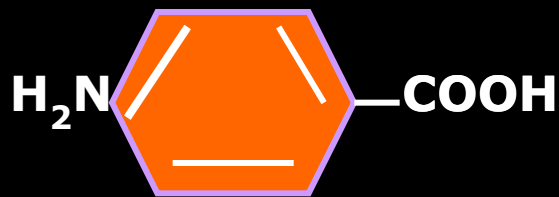


Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом.

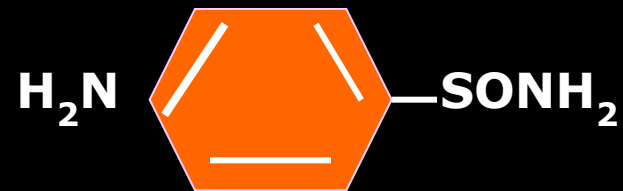
Субстрат (сукцинат) и ингибитор (малонат) взаимодействуют с одними и теми же (+) группами каталитического центра фермента, т.к. обе кислоты при физиологических значениях рН имеют 2 (-) гр.



КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ



**П-АМИНОБЕНЗОЙНАЯ
КИСЛОТА**

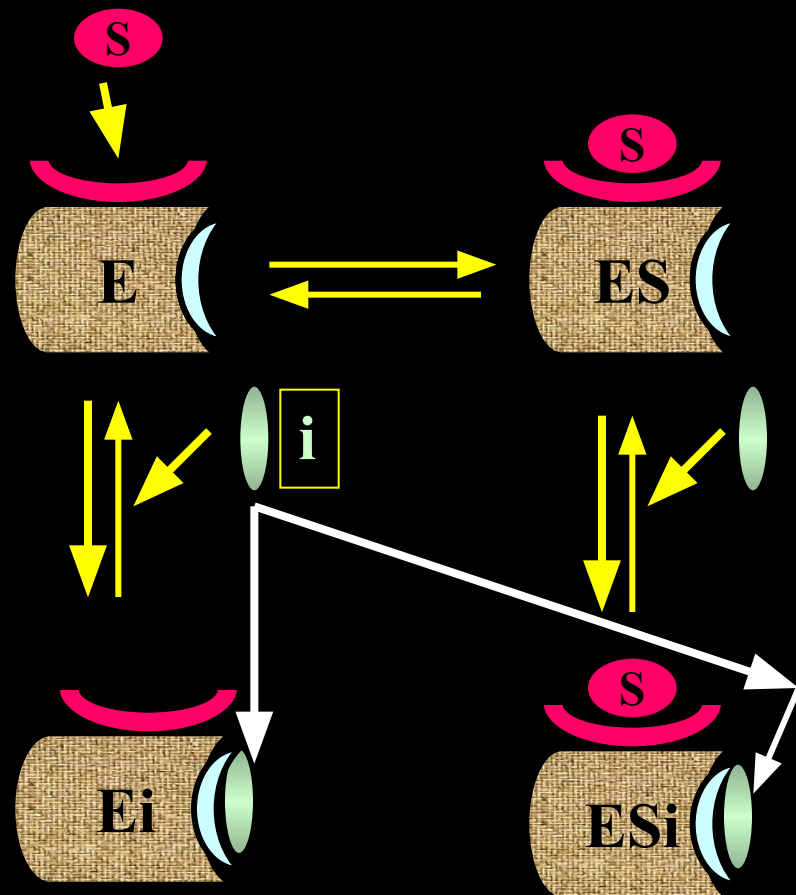


**СУЛЬФАНИЛАМИДНЫЙ
ПРЕПАРАТ**

↓
ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА

↓
ТГФК
↙ ↘
РНК ДНК

Действие обратимого неконкурентного ингибитора

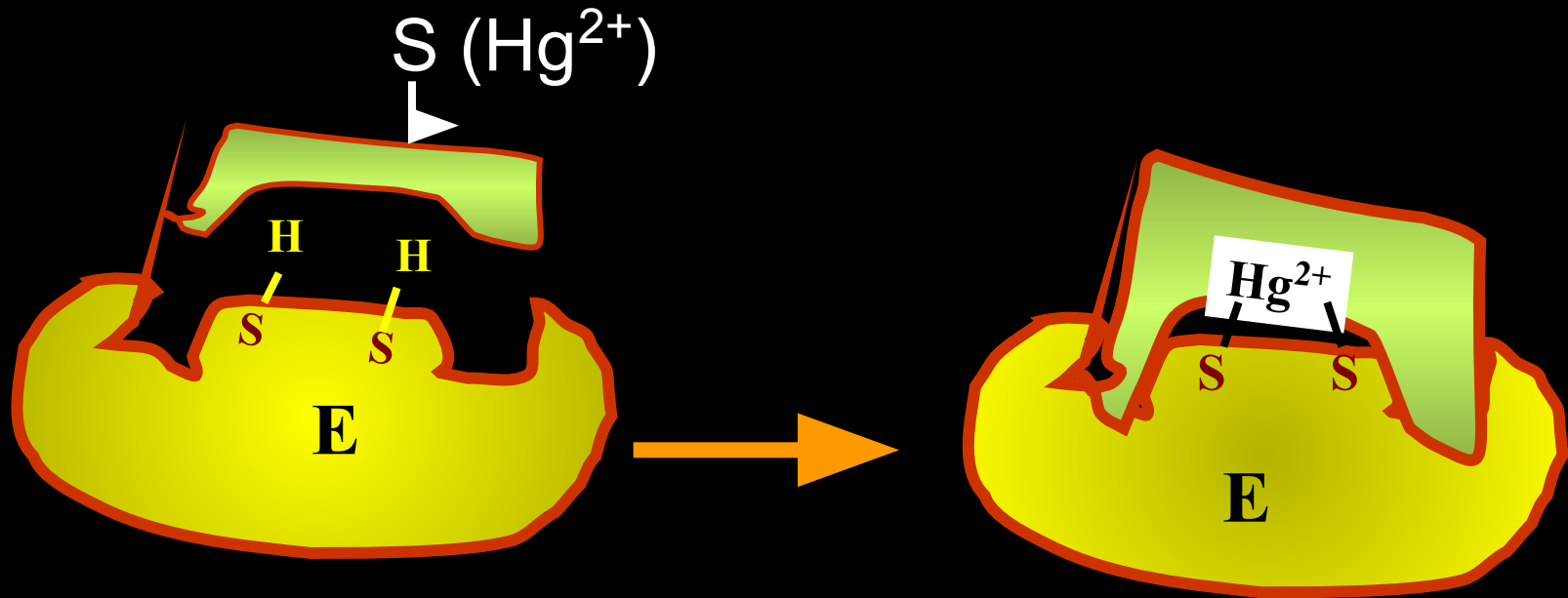


Комплекс
неактивный

Комплекс
неактивный

Неконкурентные ингибиторы присоединяются к ферменту не в активном центре, а в другом месте, вызывая изменение конформации фермента и его активного центра. Поэтому, обратимое конкурентное ингибирование не может быть устранено повышением концентрации субстрата. Такой ингибитор может связываться обратимо как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом. При снижении концентрации (i) он диссоциирует из комплексов Ei и ESi и происходит постепенное восстановление активности фермента

Механизм действия ионов ртути как необратимого ингибитора.

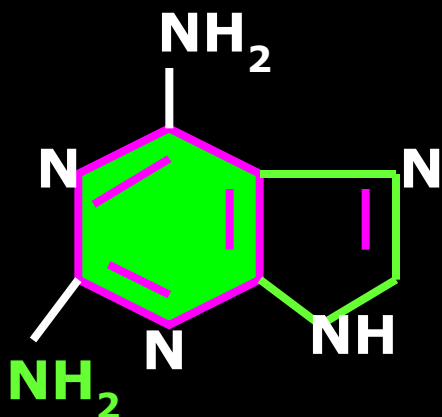


Ионы ртути в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции

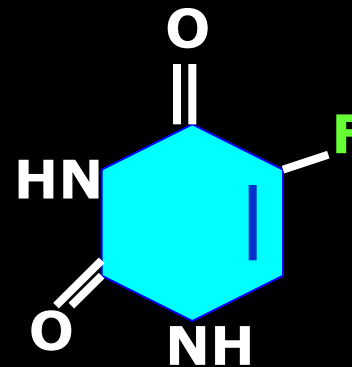
Необратимыми неспецифическими ингибиторами

являются сероводород (H_2S), соли свинца, серебра, ртути. Эти вещества связываются с белковой молекулой фермента вне активного центра и образуют плохо растворимые комплексы. При этом необратимо изменяются конформация всей молекулы фермента и, как следствие, конформация активного центра.

Антиметаболиты

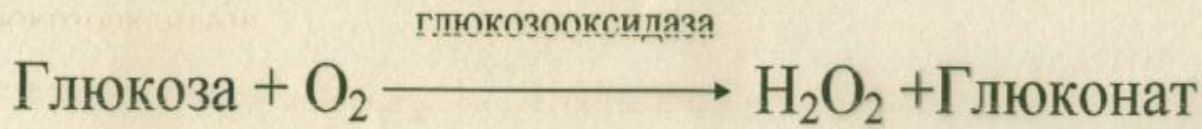


АМИНАДЕНИН



ФТОРУРАЦИЛ



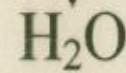


пероксидаза



неокрашенные
субстраты

окрашенный
продукт



Применение ферментов в медицине

Основные разделы	Ферменты	Примеры использования
Диагностика	Лактатдегидрогеназа (изофермент ЛДГ-1)	Инфаркт миокарда
	Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	Инфаркт миокарда
	Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	Заболевания печени (например, инфекционный гепатит), инфаркт миокарда
	КК (изофермент ММ – мышечный тип, изофермент МВ – сердечный тип)	Прогрессирующая дистрофия, инфаркт миокарда
	Кислая фосфатаза (КФ)	Рак предстательной железы
	α-амилаза	Заболевания поджелудочной железы
Лечение	Пепсин	Нарушение переваривания белков в желудке, нарушение синтеза или секреции пепсина
	Трипсин, химотрипсин	Лечение гнойных ран
	Стрептокиназа, урокиназа	Предотвращение тромбообразования при пересадке органов и других операций
	Гиалуронидаза	Рассасывание рубцов
	Аспарагиназа	Лечение некоторых злокачественных образований
	Нуклеазы (ДНКаза)	Вирусный конъюнктивит, ринит, гнойный бронхит
	Уреаза	Удаление мочевины из организма в аппаратах «искусственной почки»
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов	Глюкозооксидаза	Определение содержания глюкозы в крови
	Холестеролоксидаза	
	Липаза	
	Уреаза	

Основные разделы	Ферменты	Примеры использования
Диагностика	Лактатдегидрогеназа (изофермент ЛДГ-1)	Инфаркт миокарда
	Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	Инфаркт миокарда
	Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	Заболевания печени (например, инфекционный гепатит), инфаркт миокарда
Лечение	Пепсин	Нарушение переваривания белков в желудке, нарушение синтеза или секреции пепсина
	Трипсин, химотрипсин	Лечение гнойных ран
	Стрептокиназа, урокиназа	Предотвращение тромбообразования при пересадке органов и других операций
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов	Глюкозооксидаза	Определение содержания глюкозы в крови
	Холестеролоксидаза	
	Липаза	
	Уреаза	

«а»
центрации
естерина в
ацилгли-

церинов в крови
Определение мочевины в крови



Благодарю за внимание!