

# Регуляция активности ферментов

# **Регуляция каталитической активности фермента осуществляется:**

- 1) присоединением эффекторных молекул (активаторы и ингибиторы);
- 2) регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий;
- 3) путем ковалентной модификации (фосфорелирование, ацетилирование, метилирование);
- 4) регуляция частичным или ограниченным протеолизом.

# **Активаторы ферментов – это вещества:**

- 1) формирующие активный центр фермента ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ );
- 2) облегчающие образование фермент-субстратного комплекса ( $\text{Mg}^{2+}$ );
- 3) восстанавливающие SH-группы (глутатион, цистеин, меркаптоэтанол);
- 4) стабилизирующие нативную структуру белка фермента.

Активируют ферментативные реакции обычно катионы (в таблице Менделеева с 19 по 30). Анионы менее активны, хотя ионы хлора и анионы некоторых других галогенов могут активировать пепсин, амилазу, аденилатциклазу. Активаторами могут быть белки: апопротеин А-І (лецитин-холестерол-ацилтрансфераза — ЛХАТ), апопротеин С-Н (липопротеинлипаза — ЛПЛ), вторичные внутриклеточные посредники.

**Таблица 6.1.** Активаторы сериновых (треониновых) протеинкиназ (D. Fell, 1997)

<b>Вторичный мессенджер</b>	<b>Фермент</b>
Циклические нуклеотиды	цАМФ-зависимая протеинкиназа
	цГМФ-зависимая протеинкиназа
Ионы кальция и кальмодулин	Ca <sup>2+</sup> -кальмодулин-протеинкиназа
	Киназа фосфорилазы или киназа 2 гликогенсинтазы
АМФ	АМФ-активируемая киназа
Диацилглицерол	Протеинкиназа С

Ингибиторы ферментов — это соединения, которые взаимодействуя с ферментом, препятствуют образованию нормального фермент-субстратного комплекса, уменьшая тем самым скорость реакции или прекращая ее.

Ингибиторы делят на две группы — неспецифические и специфические.

Неспецифические ингибиторы вызывают денатурацию белка-фермента (соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи и др.) и их действие не связано с механизмами ферментативного катализа.

Действие специфических ингибиторов связано с механизмами ферментативного катализа.

Специфические ингибиторы делятся на 2 группы: необратимые и обратимые.

При необратимом ингибировании происходит непрерывная модификация молекул фермента, в результате чего фермент частично или полностью теряет свою активность. Такое действие оказывают вещества, которые прочно и необратимо связывают функциональные группы активного центра или препятствуют изменению валентности металла активного центра.

1. Ингибиторы металлосодержащих ферментов (HCN, RCN, HF, CO и др.). Эти соединения связываются с металлами с переменной валентностью (Cu или Fe), в результате чего нарушается процесс переноса электронов по дыхательной цепи ферментов, поэтому эти ингибиторы называются дыхательными ядами.

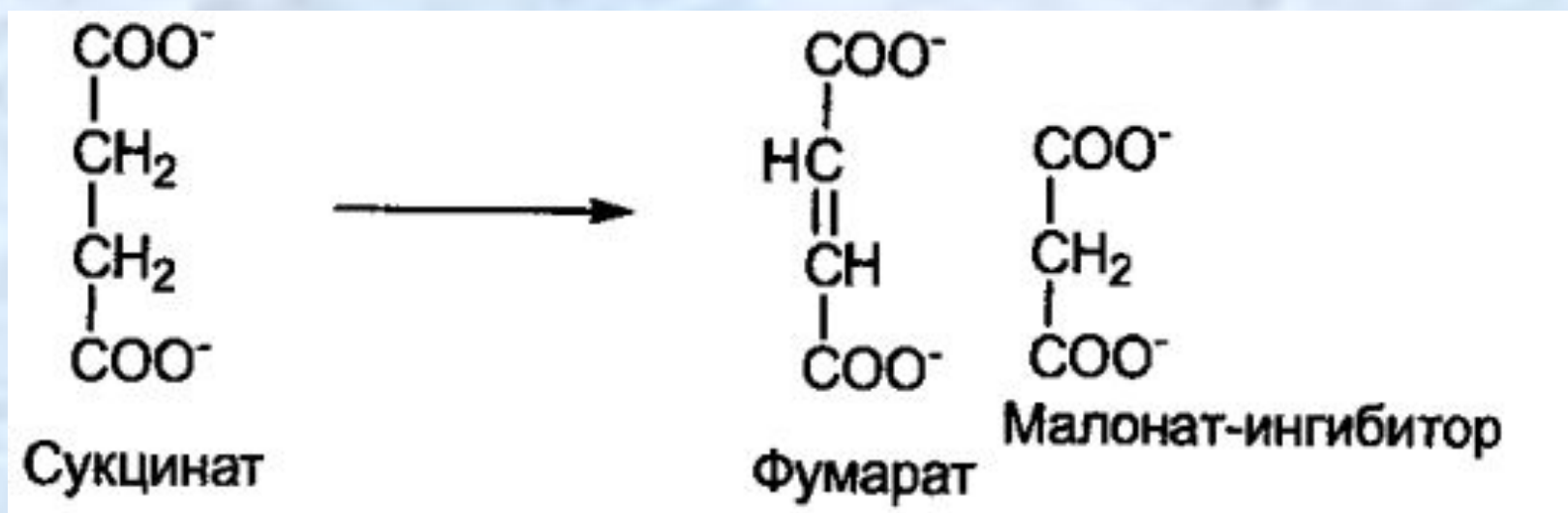
2. Ингибиторы ферментов, содержащих SH-группу в активном центре (монойодацетат, дийодацетат, йодацетамид, соединения мышьяка и ртути).

3. Ингибиторы ферментов, содержащих OH-группу в активном центре (фосфоорганические соединения, инсектициды). Эти ингибиторы тормозят, прежде всего, активность холинэстеразы – фермента, играющего первостепенную роль в деятельности нервной системы.



Конкурентные ингибиторы — это молекулы, настолько похожие на молекулы субстратов реакций, что ферменты «не могут их различить». В результате связывания конкурентного ингибитора с активным центром фермента уменьшается количество истинных ферментсубстратных комплексов и падает скорость катализируемой реакции.

Классическим примером конкурентного ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление янтарной кислоты (сукцината) путем дегидрирования в фумаровую кислоту.



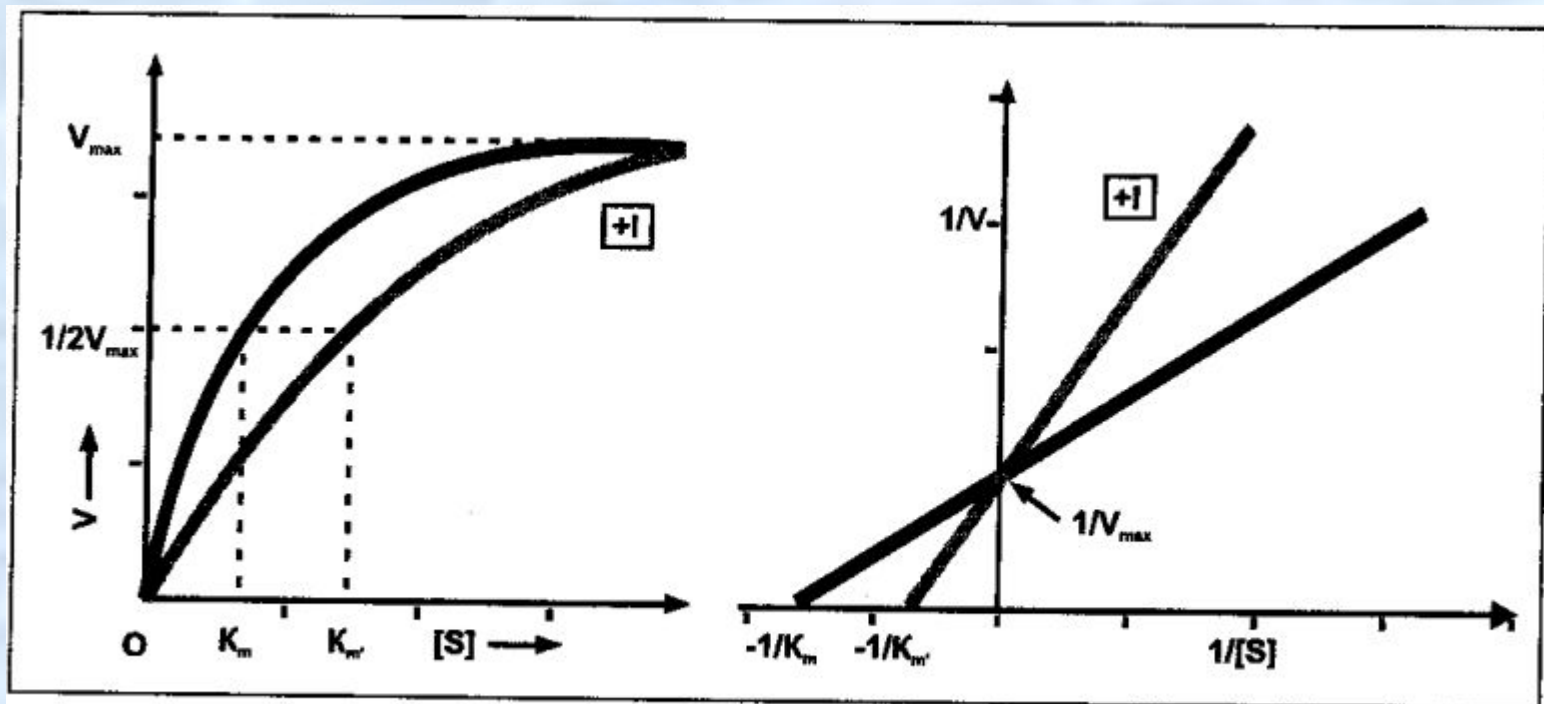


Рис. 6.2. Влияние конкурентных ингибиторов на скорость ферментативной реакции.

Неконкурентные ингибиторы — вещества, не имеющие структурного сходства с субстратами. Неконкурентные ингибиторы связываются не с активным центром, а в другом месте молекулы фермента, в том числе и в области аллостерического центра. Обратимые неконкурентные ингибиторы понижают  $V_{max}$  за счет уменьшения количества действующих молекул фермента. Ингибиторы этого типа не мешают связыванию субстрата с активным центром сохранившихся молекул фермента, в результате величина  $K_m$  не меняется. Механизм ингибирования состоит в снижении скорости реакции за счет уменьшения количества нормальных фермент-субстратных комплексов. Таким образом, при неконкурентном ингибировании:  $V_{max}$  уменьшается, а  $K_m$  не изменяется.

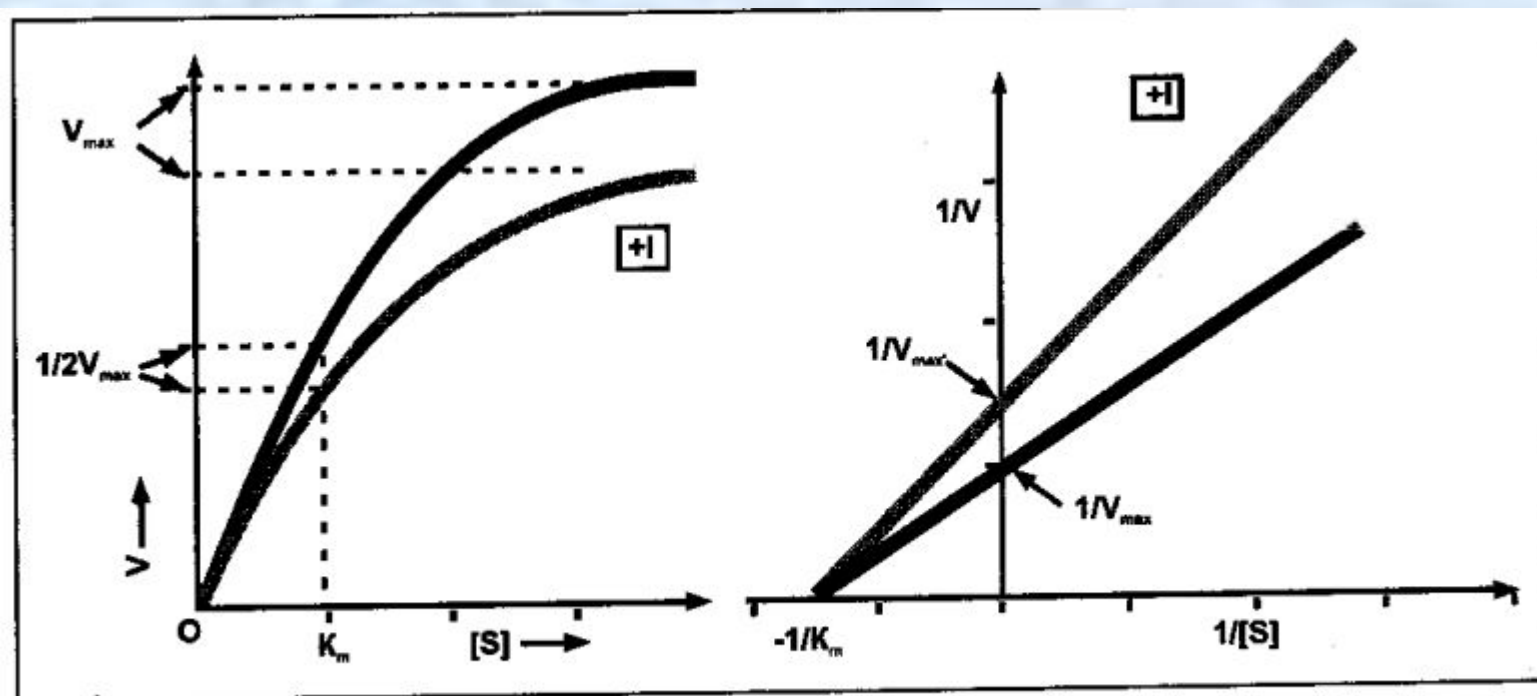


Рис. 6.4. Влияние неконкурентных ингибиторов на скорость реакции.

# Аллостерическая регуляция

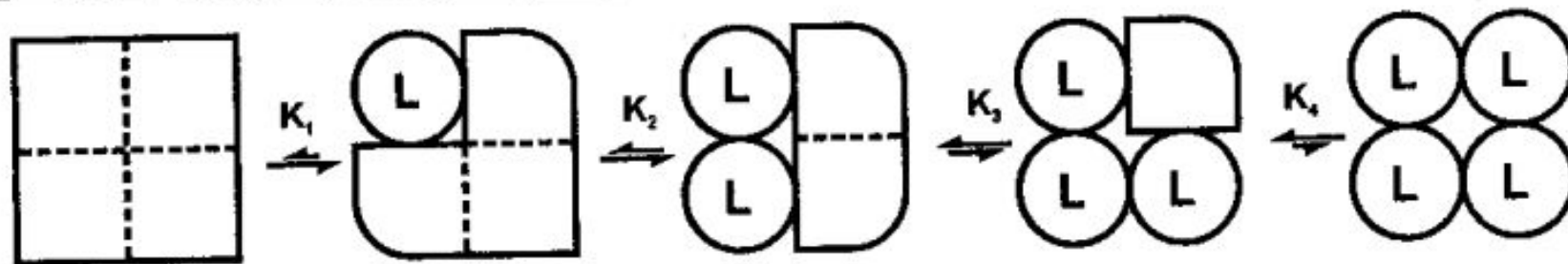
Происходит путем присоединения к аллостерическому центру фермента эфффекторов — активаторов и ингибиторов. Если в роли активатора выступают молекулы субстрата — гомотропная активация, если какой-то другой метаболит — гетеротропная. Для аллостерических ферментов кривая насыщения субстратом представляет собой сигмоидную кривую, а не гиперболу как для нерегуляторных ферментов.

1. Аллостерические ферменты состоят из 2-х или более, часто симметричных, субъединиц, т. е. имеют четвертичную структуру.
2. Субъединицы фермента могут находиться в 2-х конформациях: R и T. Конформации R (relax расслабление) обладает высоким сродством к субстрату, конформация T (tense — напряжение) — низким сродством. Формы R и T могут переходить друг в друга.
3. Эффекторы связываются с T и R-конформациями фермента. Аллостерический ингибитор связывается преимущественно с T-конформацией и ее стабилизирует. В присутствии ингибитора большая часть молекул находится в T-конформации, что снижает сродство фермента к субстрату. Аллостерический активатор связывается преимущественно с R-конформацией.
4. Субъединицы аллостерических ферментов связаны между собой нековалентными связями. Изменение конформации одной субъединицы приводит к изменению конформации соседних субъединиц (кооперативный эффект).

Предложено 2 модели кооперативного эффекта.

**Симметричная модель:** субъединицы должны находиться в одном и том же конформационном состоянии, т. е. возможны состояния RR и TT и невозможно состояние RT. В отсутствие субстрата почти все молекулы фермента находятся в T-конформации. Добавление субстрата приводит к переходу T-конформации в R-конформации одновременно всех субъединиц.

**Последовательная модель.** Согласно этой модели каждая субъединица может существовать в одном из возможных конформационных состояний (R или T). Связывание субстрата с одной субъединицей может вызвать последовательное изменение конформации соседней субъединицы или соседних субъединиц и в результате увеличивать (положительная кооперативность) или уменьшать (отрицательная кооперативность) их сродство к субстрату.

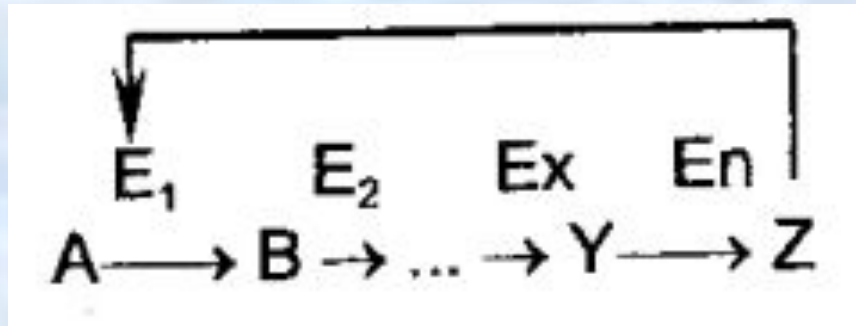


**Рис. 6.10.** Простая модель для тетрамерного аллостерического белка. Связывание лиганда (L) с одной субъединицей изменяет ее конформацию из T (напряженная, квадрат) в R (расслабленная, способная связывать лиганд, окружность). Это повышает эффективность связывания лиганда другими субъединицами белка.



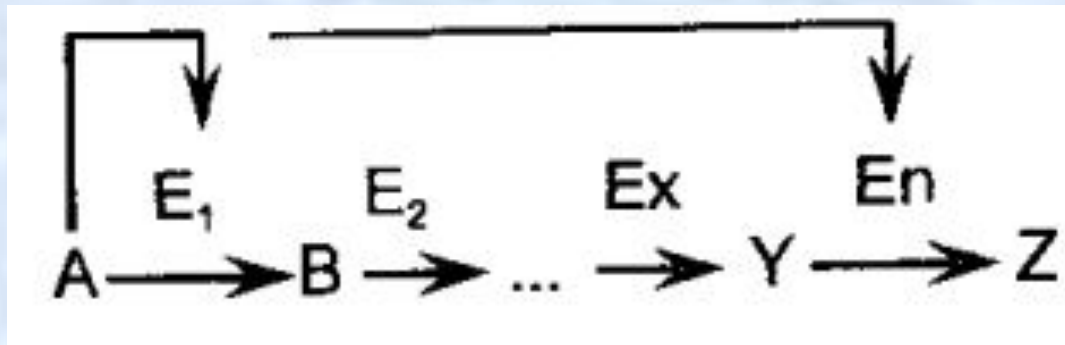
## Регуляция активности по принципу обратной связи (ретроингибирование)

Во многих биосинтетических процессах основным типом регуляции скорости многоступенчатого процесса является ингибирование по принципу обратной связи, когда конечный продукт связывается с активным центром фермента и ингибирует его. Такие ферменты называются ключевыми, находятся на первых этапах метаболического пути и определяют скорость всего процесса.



Например, фермент аспартат-транскарбамоилаза осуществляет первый этап синтеза пиримидиновых нуклеотидов и ингибируется продуктом этого биосинтеза цитидинтрифосфатом (ЦТФ) по принципу обратной связи.

Активация предшественником (форактивация) — первый метаболит в многоступенчатом процессе активирует фермент, катализирующий первую или последнюю стадию.



## **Химическая (ковалентная) модификация.**

Заключается в присоединении к ферменту или отщеплении от него низкомолекулярной молекулы, при котором происходит активация или ингибирование фермента.

Например, фермент, участвующий в синтезе гликогена — гликогенсинтаза — при присоединении фосфорной кислоты становится неактивным, а фермент распада гликогена — фосфорилаза — активным.

Фосфорилирование-дефосфорилирование является наиболее эффективным способом контроля активности белков по следующим причинам:

1. Фосфорильные группы приносят два отрицательных заряда в молекулу белка, что изменяет характер электростатических взаимодействий (например, изменяется связывание субстрата и каталитическая активность).

2. Фосфатная группа может участвовать в образовании трех или более водородных связей. Тетраэдрическая геометрия фосфорильной группы делает водородные связи строго направленными, что важно для межмолекулярных отношений.

3. Величина свободной энергии фосфорилирования белков достаточно высока: в макроэргической связи АТФ имеется -12 ккал/моль (-50 кДж/моль). Примерно половина тратится на фосфорилирование, а вторая половина депонируется в фосфорилированном белке. Такое фосфорилирование может изменить конформационное равновесие между двумя состояниями белка в  $10^4$  раз.

4. Фосфорилирование-дефосфорилирование занимает примерно секунду, что по скорости увязывается с физиологическими процессами.

5. Фосфорилирование носит, как правило, каскадный характер с увеличением концентрации продукта на каждом этапе в 10 или более раз (амплификационный эффект фосфорилирования).

6. АТФ является энергетической валютой клетки. Фосфор освобождается в прямой реакции  $ATP \rightleftharpoons ADP + P_n$ ; фосфор потребляется в обратной реакции. Следовательно, процесс фосфорилирования-дефосфорилирования белков связан с концентрацией  $P_n$  и регуляцией метаболизма.

Модификация	Молекула — донор модифицирующей группы	Модифицируемый белок	Функция белка
Фосфорилирование	АТФ	Гликогенфосфорилаза	Распад гликогена
Ацетилирование	Ацетил-КоА	Гистоны	Упаковка ДНК; транскрипция
Миристоилляция	Миристоил-КоА	Src (онкоген)	Передача сигнала
АДФ-рибозилирование	НАД	РНК-полимераза	Транскрипция
Фарнезиляция	Фарнезил пиродфосфат	Ras (онкоген)	Передача сигнала
Гамма-карбоксилирование	$\text{HCO}_3^-$	Тромбин	Свертывание крови
Сульфатирование	3'-Фосфоаденозил-5'-фосфосульфат	Фибриноген	Образование сгустка крови
Убиквитинация	Убиквитин	Циклин	Контроль клеточного цикла

## **Активация проферментов.**

Происходит путем отщепления части полипептидной цепи от молекулы предшественника с образованием активного центра фермента. Этот путь характерен для агрессивных протеолитических ферментов, которые синтезируются в неактивной форме (проферменты) в желудке и поджелудочной железе и участвуют в переваривании белков. Синтез в виде проферментов исключает самопереваривание органов.

Специфический частичный протеолиз является распространенным способом активации ферментов и других белков в биологических системах.

1. Свертывание крови является каскадом протеолитических реакций, обеспечивающим быстрый и усиленный ответ на повреждение тканей и кровеносных сосудов (см. «Свертывание крови»).

2. Многие гормоны пептидной природы синтезируются в виде предшественников (проинсулин, проопиомеланокортин), после частичного протеолиза которых образуются гормоны.

3. Нерастворимые в воде фибриллы коллагена возникают после частичного протеолиза водорастворимого проколлагена.

4. Запрограммированная гибель клеток — апоптоз опосредуется протеолитическими ферментами каспазами, которые синтезируются в виде прокаспаз.



# Применение ферментов

**Медицинская энзимология** развивается по трем главным направлениям:

1. Изучение **энзимопатологий** (энзимопатий), то есть таких болезней, причина которых лежит в недостаточности или полном отсутствии какого-либо фермента.
2. **Энзимодиагностика**, которая развивается по двум путям. Один путь – использование ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения нормальных или аномальных химических веществ в сыворотке крови, моче, желудочном соке и др. (например, выявление при помощи ферментов глюкозы, белка или других веществ в моче, в норме не обнаруживаемых). Другой путь – открытие и количественное определение самих ферментов в биологических жидкостях при патологиях.
3. Третье направление медицинской энзимологии – **энзимотерапия**, т. е. использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов) действия ферментов в качестве лекарственных средств.