

# Ферменты

# Ферменты

– это белковые молекулы, синтезируемые живыми клетками.

С их помощью в клетке протекают многочисленные реакции с высокой скоростью

Сами ферменты в ходе реакции не расходуются

# Ферменты

- Ферменты (энзимы) – биокатализаторы белковой природы.
- Биороль – каталитическая и регуляторная

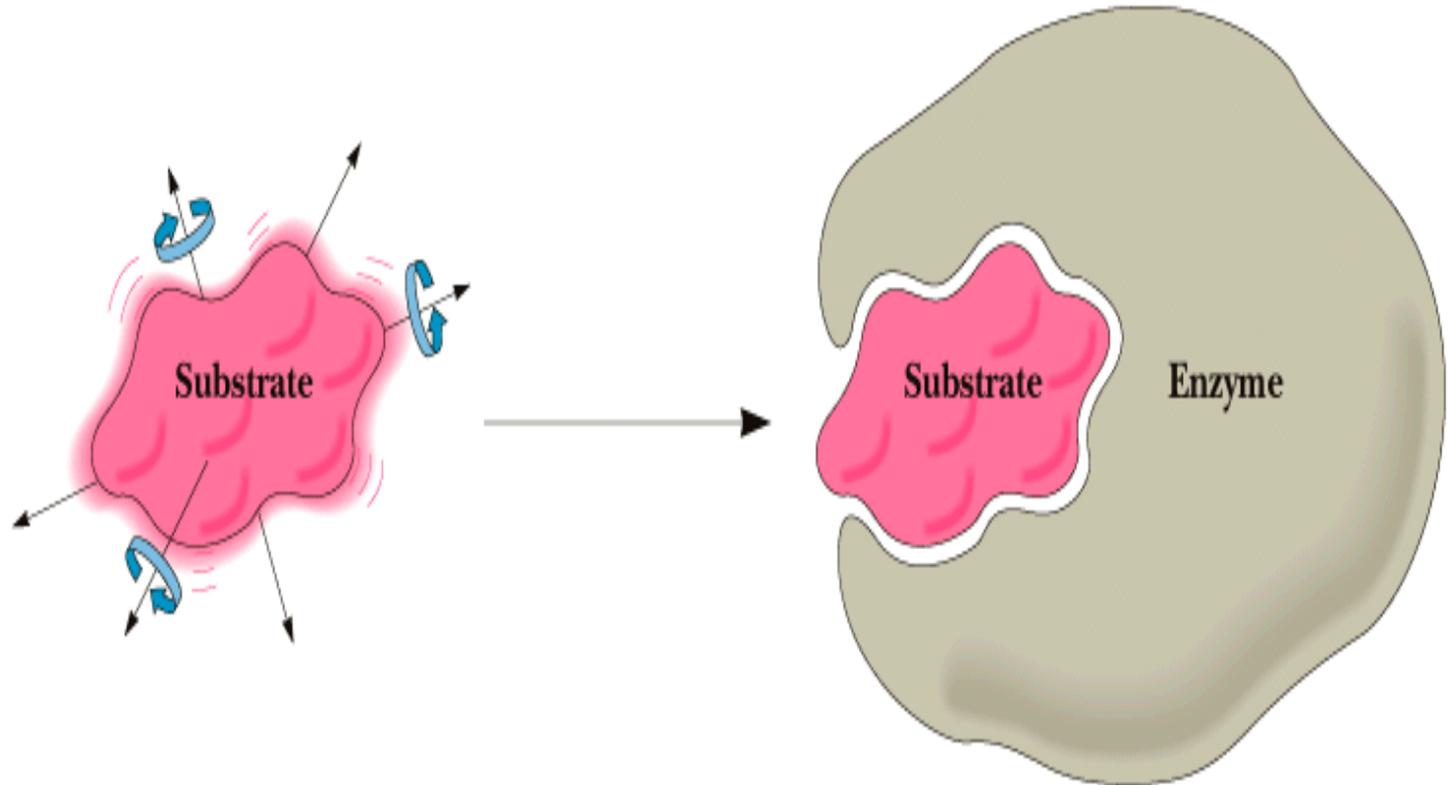
# Особенности ферментативного катализа:

- **высокая эффективность действия** (каждая молекула фермента способна превратить в продукт реакции от 100 до 1000 молекул за 1 секунду);
- **Специфичность** (фермент обычно катализирует превращение только одной или нескольких похожих молекул в продукт);

# Особенности ферментативного катализа:

- **способность к регуляции**  
(активность ферментов может повышаться или понижаться под влиянием различных факторов);
- **мягкие условия протекания ферментативных реакций** ( $t = 37^{\circ}\text{C}$ , нормальное атмосферное давление, рН близкое к 7,0).

# Строение ферментов

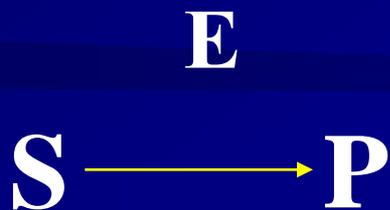


Substrate (and enzyme) are free to undergo translational motion. A disordered, high-entropy situation

The highly ordered, low-entropy complex

# Строение ферментов

- Субстрат (S) – лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента.
- Продукт реакции (P).
- Ферментативная реакция в общем виде:

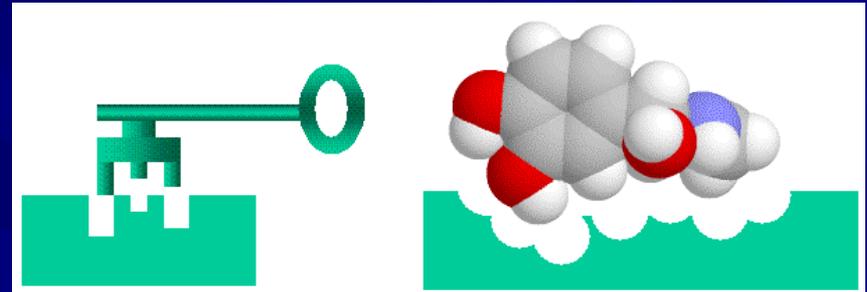


# Функциональные участки молекулы фермента

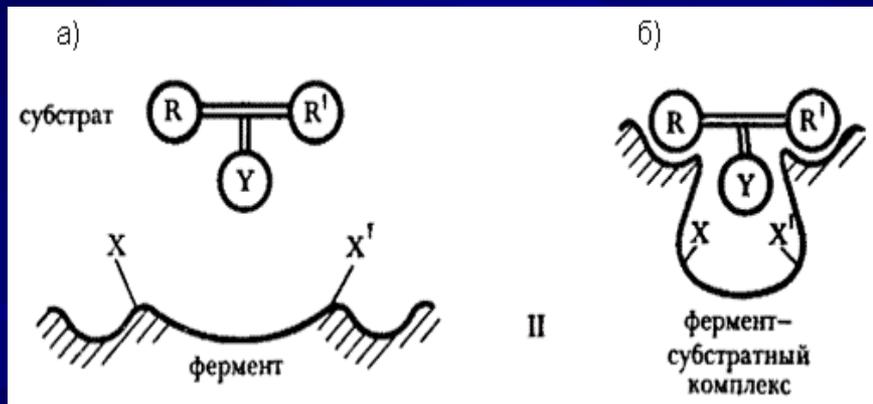
- **связывающий участок по форме соответствует субстрату (геометрическое соответствие)**
- **между аминокислотными остатками активного центра и субстратом образуются связи (водородные, гидрофобные, ионные), т.е. устанавливается химическое соответствие.**

# взаимодействие активного центра и субстрата

- Теория Фишера «ключ – замок»  
Фермент и субстрат подходят друг другу по форме как ключ и замок, не изменяются



# взаимодействие активного центра и субстрата



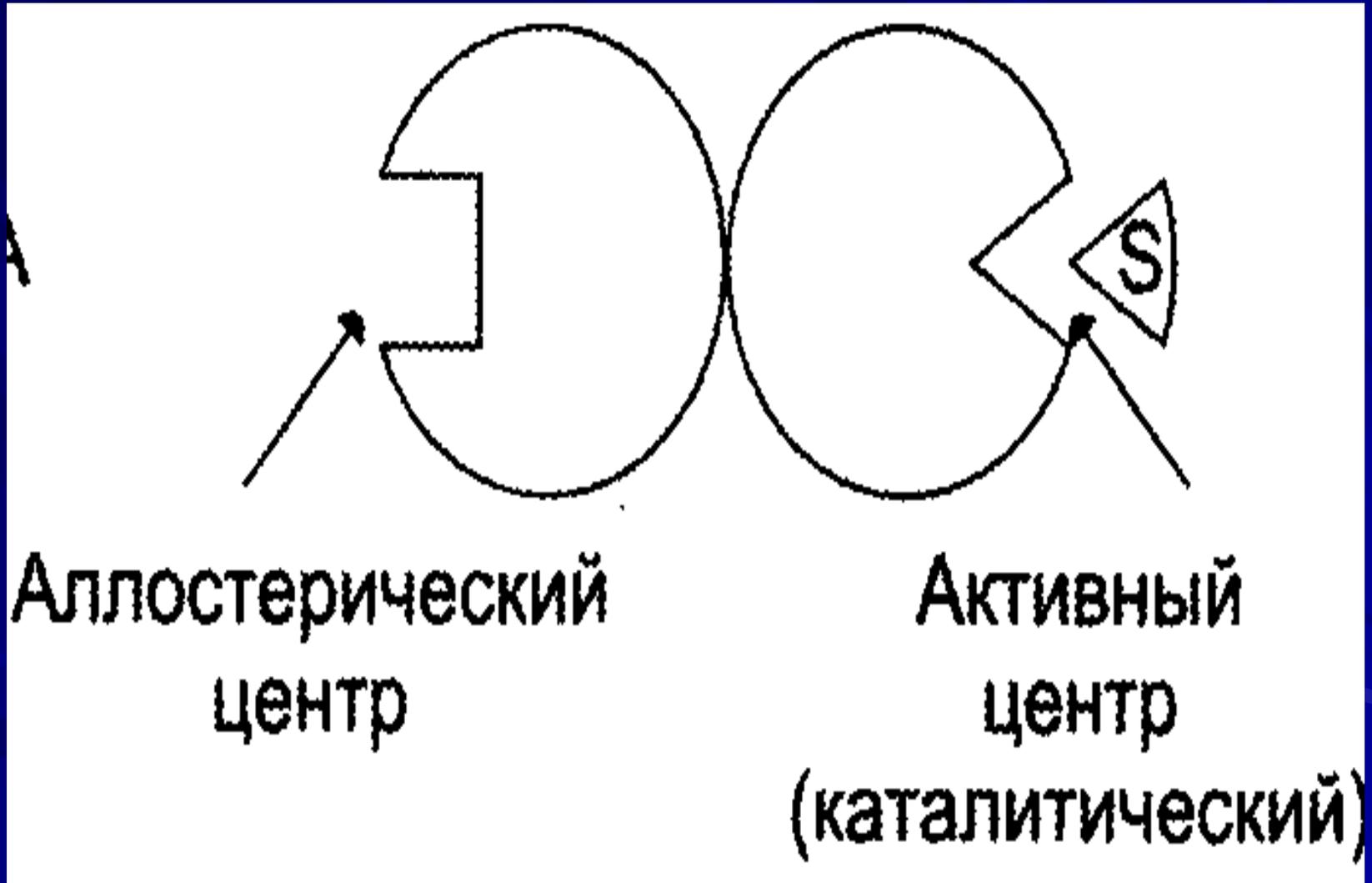
■ Теория Кошланда «рука – перчатка»

При взаимодействии фермент и субстрат изменяют форму, подстраиваются друг под друга

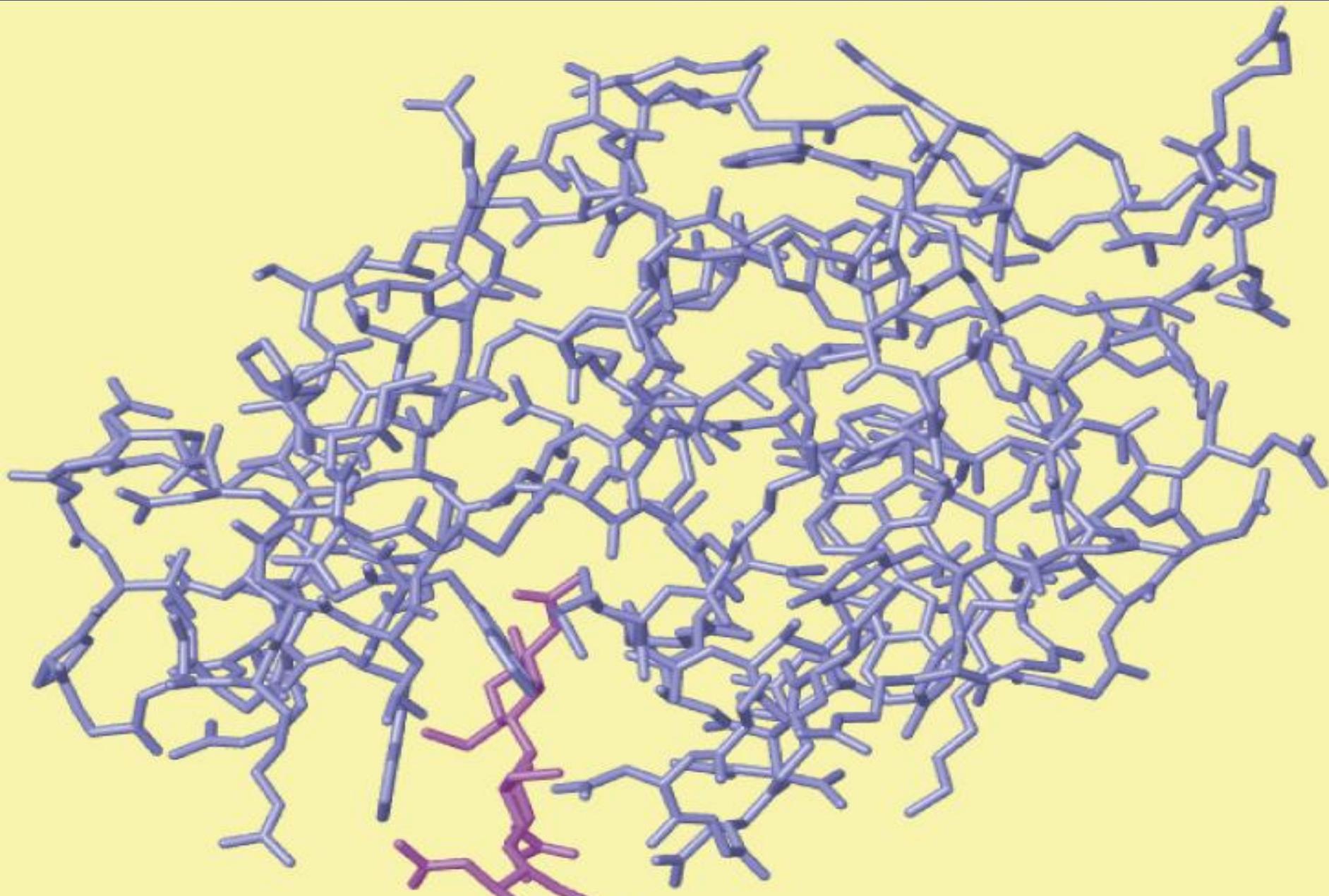
## Функциональные участки молекулы фермента

- аллостерический (регуляторный) центр – участок молекулы фермента, с которым связываются низкомолекулярные вещества (эффекторы, или модификаторы), изменяющие активность E.
- активаторы – повышают скорость реакции
- Ингибиторы – замедляют скорость реакции

# Аллостерический (регуляторный) центр

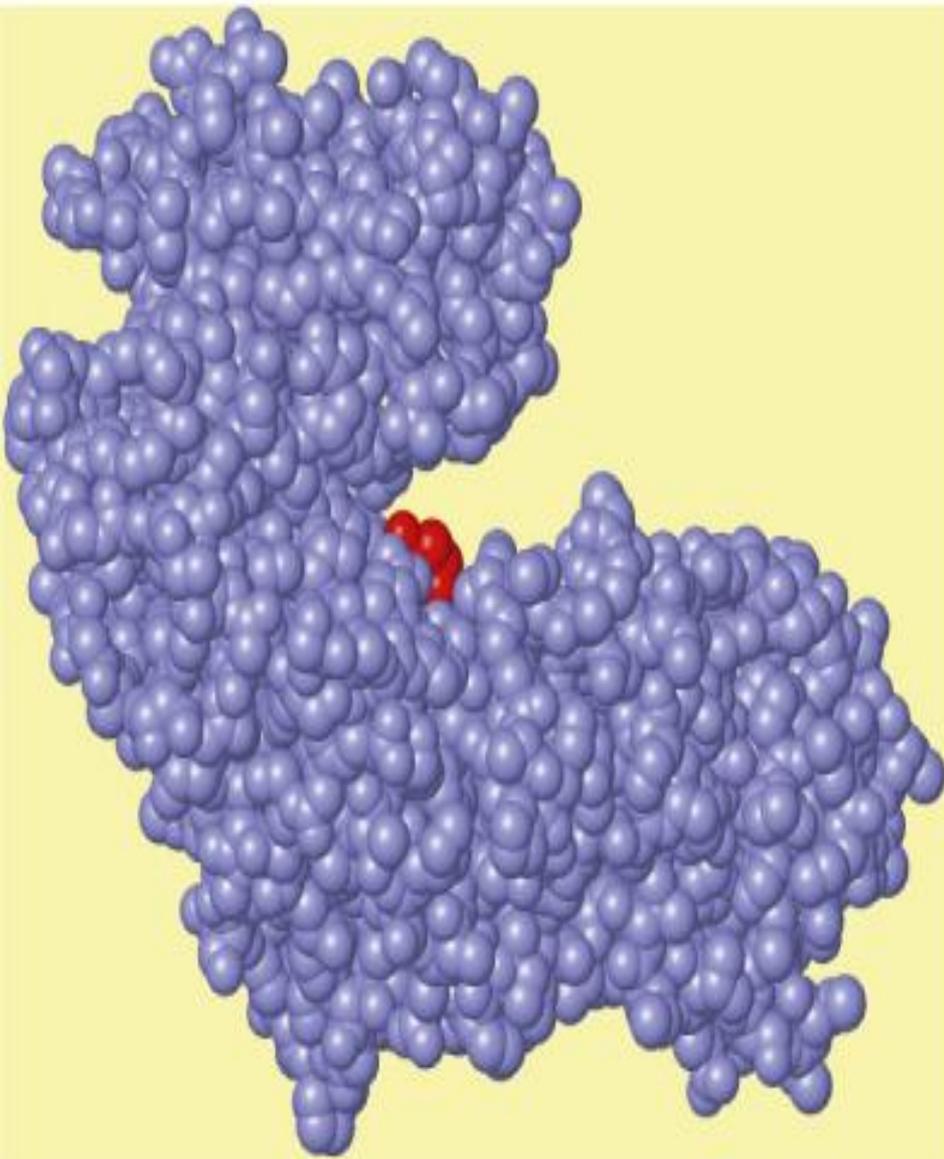


# Лизоцим

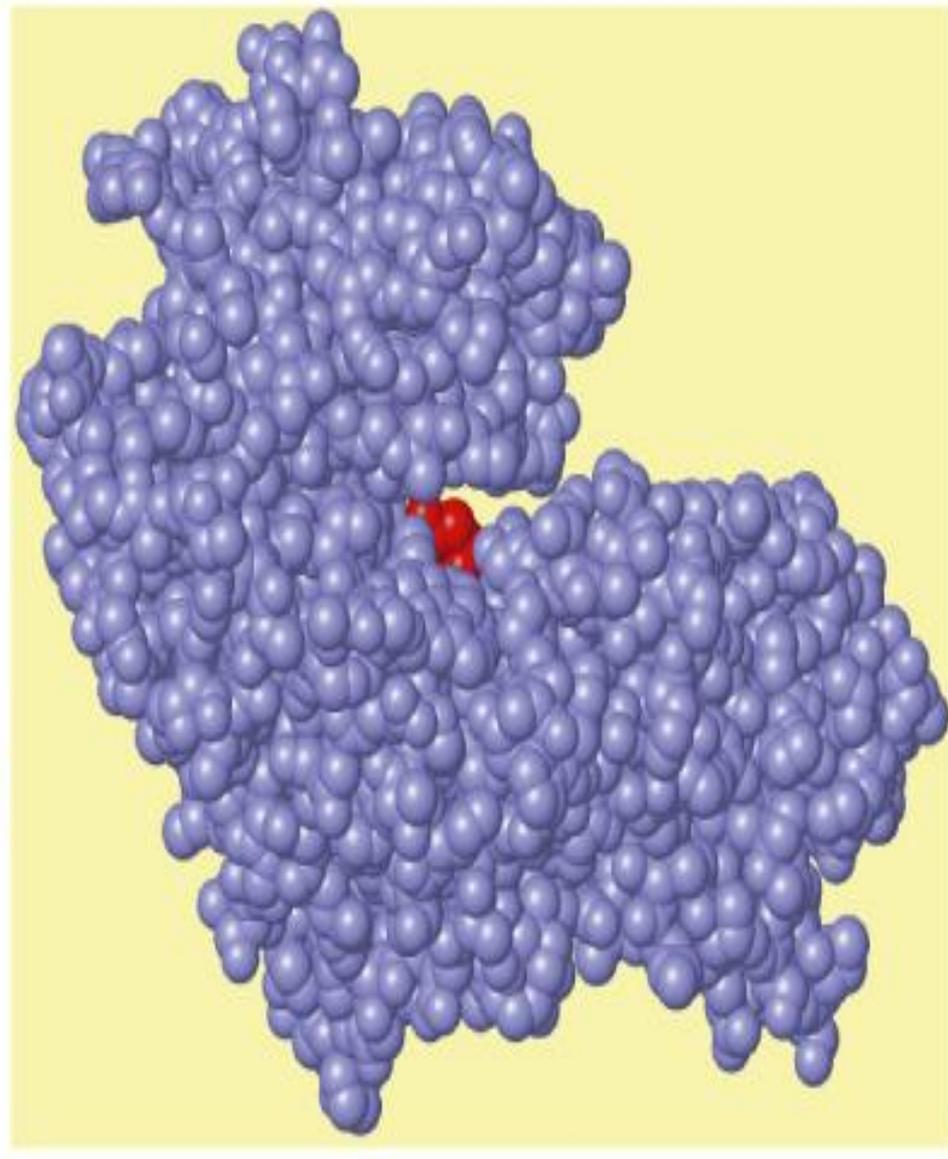


# Дрожжевая гексокиназа

(a)



(b)



# Классификация ферментов

- В соответствии с типами катализируемых реакций все ферменты разделены на 6 классов.
- 1. Оксидоредуктазы.
- 2. Трансферазы.
- 3. Гидролазы.
- 4. Лиазы.
- 5. Изомеразы.
- 6. Лигаза (синтетаза).
- Каждый класс разделен на подклассы и далее на подподклассы.

# Классификация ферментов

№ Класс	Реакции	Основные подклассы, группы
1. Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции $A_{\text{восст}} + B_{\text{окис}} \rightarrow A_{\text{окис}} + B_{\text{восст}}$	Дегидрогеназы, оксидазы, редуктазы, гидроксилазы
2. Трансферазы	Перенос групп $A-B + C \rightarrow A + B-C$	Киназы (фосфатные группы), трансминазы (аминогруппы)
3. Гидролазы	Гидролиз связей (эфирных, пептидных, гликозидных) $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Эстеразы, фосфатазы, протеазы, липазы, нуклеазы, тиолазы

# Классификация ферментов

<b>4. Лиазы</b>	Разрыв связей C-C, C-O, C-N, C-S путем элиминирования молекулы с образованием двойных связей В обратной реакции ускоряют присоединение воды, аммиака и т.д. по двойной связи $A(XH)-B \rightarrow A-X+B-H$	Альдегидлиазы (альдолаза), углерод-кислородлиазы (фумараза), дегидратазы (енолаза), декарбоксилазы
<b>5.Изомеразы</b>	Взаимопревращение изомеров $A \leftrightarrow \text{Изо-}A$	Изомеразы, мутазы
<b>6. Лигазаы</b>	Соединение 2 молекул, сопряженное с гидролизом АТФ $A+B+ATP \rightarrow A-B+ADP+P_i$	Карбоксилазы, синтетазы

# Классификация ферментов

Класс	Примеры
<p><b>1. Оксидоредуктазы</b> — , катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос <math>e^-</math> и атомов H с одного S на другой).</p>	<p>ЛДГ, глутаматдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, оксидазы АК, каталаза, СОД, цитохромы и т. д.</p>
<p><b>2. Трансферазы</b> — перенос функциональных групп с одного соединения к другому. В подклассе фосфотрансфераз входит группа Е, называемых киназами, они используют АТФ в качестве донора фосфатного остатка.</p>	<p>Аминотрансферазы (АлАТ, АсАТ, ТАТ); ацилтрансферазы (холинацетилтрансфераза, ЛХАТ); фосфотрансферазы (гексокиназа, глицерокиназа), фосфофруктокиназа, протеинкиназы); гликозилтрансферазы (фосфорилаза); метилтрансферазы (сериноксиметилтрансфераза) и др.</p>
<p><b>3. Гидролазы</b> — катализируют реакции расщепления ковалентных связей с присоединением воды по месту расщепления</p>	<p>пептидазы (пепсин, трипсин, химотрипсин); эстеразы (липаза, ацетилхолинэстераза); гликозидазы (амилаза, мальтаза, лактаза, сахараза); фосфатазы (кислая и щелочная фосфатазы); амидогидролазы (глутаминаза, аспарагиназа) и др;</p>
<p><b>4. Лиазы</b> — отщепляют от S негидролитическим путем определенную группу (<math>CO_2</math>, <math>H_2O</math> или присоединяющие чаще всего <math>H_2O</math> по месту двойной связи</p>	<p>- C — C – лиазы ( альдолаза, ж декарбоксилазы АК);          - C — O – лиазы (фумаратгидратаза, аконитатгидратаза);          -C—N – лиазы (гистидаза, аргининосукцинатлиаза, сериндегидратаза);          -C — S – лиазы (гомосериндегидратаза)</p>
<p><b>5. Изомеразы</b> — осуществляют взаимопревращения изомеров</p>	<p>триозофосфатизомераза, фосфоглицеромутаза, метилмалонил-КоА--мутаза, глюкозо-6-фосфатизомераза и др;</p>
<p><b>6. Лигаза (синтетазы)</b> осуществляют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи, в качестве источника АТФ используется АТФ.</p>	<p>-C — C- лигазы (ацетил-КоА–карбоксилаза, пируваткарбоксилаза),          - C — O – лигазы (аминоацил –тРНК- синтетаза),          -C – -C – N - лигазы (глутаминсинтетаза, аргининосукцинатсинтетаза),          - C — S- лигазы (ацил-КоА-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза) и др.</p>

# Класс

# Примеры

<p><b>1. Оксидоредуктазы</b> — катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос <math>e^-</math> и атомов H с одного S на другой).</p>	<p>ЛДГ, глутаматдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, оксидазы АК, каталаза, СОД, цитохромы и т. д.</p>
<p><b>2. Трансферазы</b> — перенос функциональных групп с одного соединения к другому. В подкласс фосфотрансфераз входит группа E, называемых киназами, они используют АТФ в качестве донора фосфатного остатка.</p>	<p>Аминотрансферазы (АлАТ, АсАТ, ТАТ); ацилтрансферазы (холинацетилтрансфераза, ЛХАТ); фосфотрансферазы (гексокиназа, глицерокиназа, фосфофруктокиназа, протеинкиназы); гликозилтрансферазы (фосфорилаза); метилтрансферазы (сериноксиметилтрансфераза) и др.</p>
<p><b>3. Гидролазы</b> — катализируют реакции расщепления ковалентных связей с присоединением воды по месту расщепления</p>	<p>пептидазы (пепсин, трипсин, химотрипсин); эстеразы (липаза, ацетилхолинэстераза); гликозидазы (амилаза, мальтаза, лактаза, сахараза); фосфатазы (кислая и щелочная фосфатазы); амидогидролазы (глутаминаза, аспарагиназа) и др;</p>

# Классификация ферментов

<p><b>4. Лиазы</b> — отщепляют от <b>S</b> негидролитическим путем определенную группу (<math>\text{CO}_2</math> <math>\text{H}_2\text{O}</math>) или присоединяющие чаще всего <math>\text{H}_2\text{O}</math> по месту двойной связи</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>C—C—</b> лиазы (альдолаза, декарбоксилазы АК);</li><li>-<b>C—O—</b>лиазы (фумаратгидратаза, аконитатгидратаза);</li><li>-<b>C—N—</b>лиазы (гистидаза, аргининосукцинатлиаза, сериндегидратаза);</li><li>-<b>C — S —</b> лиазы (гомосериндегидратаза)</li></ul>
<p><b>5.Изомеразы</b> - осуществляют взаимопревращения изомеров</p>	<p>триозофосфатизомераза, фосфоглицеромутаза, метилмалонил-КоА--мутаза, глюкозо-6-фосфатизомераза и др;</p>
<p><b>6. Лигаза (синтетаза)</b> - осуществляют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи, в качестве источника энергии используется АТФ.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>-<b>C — C-</b> лигазы (ацетил-КоА–карбоксилаза, пируваткарбоксилаза),</li><li>- <b>C— O –</b> лигазы (аминоацил –тРНК- синтетаза),</li><li>-<b>C – N -</b> лигазы (глутаминсинтетаза, аргининосукцинатсинтетаза),</li><li>- <b>C — S-</b> лигазы (ацил-КоА-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза) и др.</li></ul>

# Номенклатура ферментов

- Рабочее название ферментов – название S и окончание «аза» (амилаза, липаза и др.)
- Тривиальные названия – пепсин, трипсин и др.
- Систематическая (рациональная) номенклатура – название S или субстратов, тип катализируемой реакции и окончание «аза».

Пример:

- АСТ- L-аспартат: 2-оксоглутарат - аминотрансфераза;
- Глутаминсинтетаза - L-глутамат: аммиак — лигаза;
- Орнитиндекарбоксилаза - ОДК - L-орнитин-карбоксилиаза;
- Малатдегидрогеназа (МДГ) —L-малат-НАД-оксидоредуктаза.

Если необходима дополнительная информация, то она заключается в скобки.

# Шифр ферментов

Каждый фермент имеет кодовый номер (шифр) по классификации ферментов (КФ).

Код каждого Е имеет 4 цифры, разделенные точками.

- 1 - номер класса,
- 2 – подкласс,
- 3 – подподкласс,
- 4 цифра - порядковый номер фермента в его подподклассе.

Примеры:

- шифр гексокиназы или АТФ:D-гексозо — 6-фосфотрансферазы – КФ 2.7.1.1;
- шифр малатдегидрогеназы (МДГ) — 1.1.1.38

Шифр		Рекомендуемое (рабочее) название	Реакция	Систематическое название
------	--	--	---------	-----------------------------

КФ 1.1.1.  
27

**Лактат-  
дегидрогеназа**

**L-лактат + НАД<sup>+</sup> =  
пируват + НАДН<sub>2</sub>**

**L-лактат НАД  
ОКСИДО  
редуктаза**

КФ 2.6.1.5

**Тирозин-  
амино-  
трансфераза**

**L-тирозин + 2-оксоглутарат  
= 4-оксифенилпируват  
+ L-глутамат**

**L-тирозин 2-  
оксоглута  
рат  
аминотран  
сфераза**

# Механизм действия ферментов

Механизм действия E может быть рассмотрен с 2<sup>x</sup> позиций:

- с точки зрения событий в активном центре,
- с точки зрения энергетики химических реакций.

# Механизм действия ферментов

■ В механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные ES комплексы. E взаимодействует с S с образованием нестойкого промежуточного ES комплекса, который распадается на E и P по схеме:



(ES\* - комплекс

в переходном состоянии).

## Механизм действия ферментов

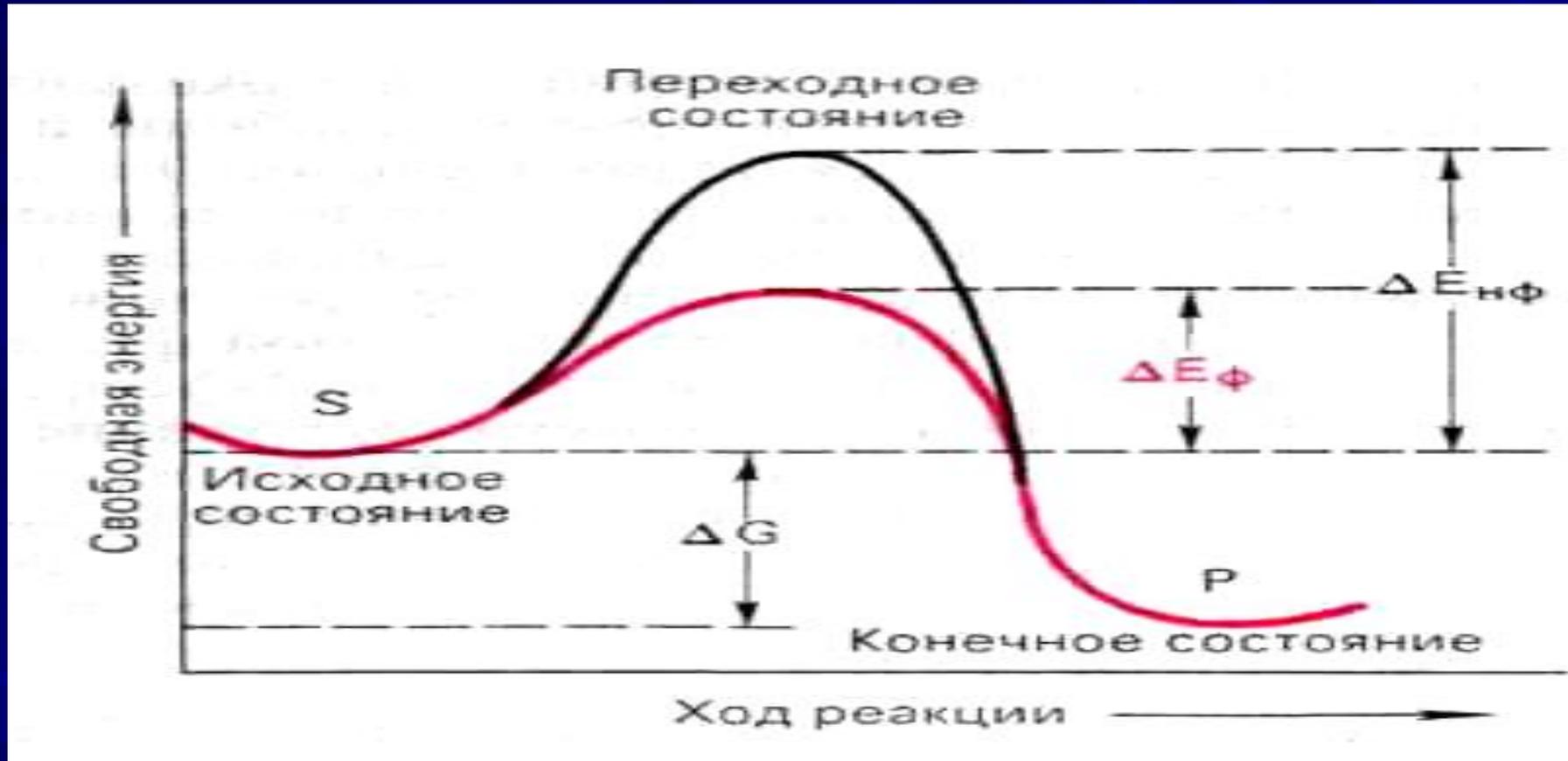
- Согласно теории «ключ-замок» Э. Фишера или теории «жесткой матрицы» АкЦ Е — стабильная, жестко детерминированная структура. Жесткая структура АкЦ комплементарна структуре S, обеспечивая высокую специфичность Е.
- Теория «индуцированного соответствия» (Д. Кошланд) допускает высокую конформационную лабильность молекулы Е и гибкость и подвижность АкЦ. S т.о. индуцирует конформационные изменения молекулы Е так, что АкЦ принимает необходимую для связывания S пространственную ориентацию. Присоединение S к Е создается также геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы S.

# Механизм действия ферментов

- E ↓ энергию активации, т.е. ↓ высоту энергетического барьера, в результате ↑ доля реакционноспособных молекул, следовательно ↑ V реакции. Реакция, катализируемая E, имеет более низкую энергию активации.
- Катализируемая E и некатализируемая им реакции имеют одинаковую величину изменения свободной энергии ( $\Delta G$ ).

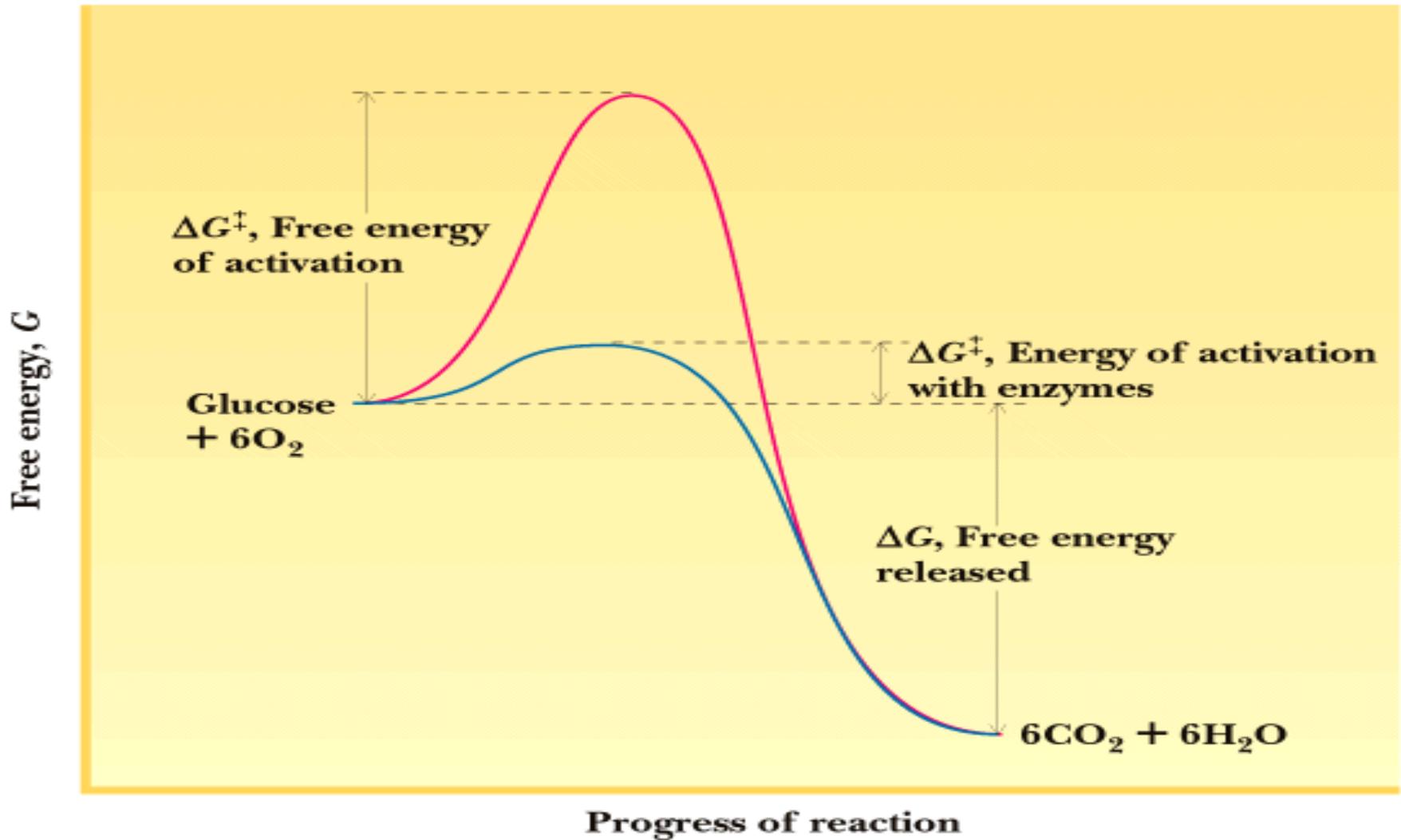
# Механизм действия ферментов

С термодинамической точки зрения, Е, как и любые катализаторы, ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации



S- субстрат; P- продукт;  $\Delta E_{нф}$ - энергия активации неферментативной реакции;  $\Delta E_{ф}$ - энергия активации ферментативной реакции;  $\Delta G$ - стандартное изменение свободной энергии.

# Механизм действия ферментов



# Роль кофактора и кофермента

- Изменение третичной структуры белка и создание комплементарности между E и S.
- Непосредственное участие в реакции в качестве еще одного S. Обычно это органические коферменты, они доноры или акцепторы химических групп.

# Роль кофактора

- Многие ферменты являются металлоферментами. 1/4 всех известных E нуждаются в присутствии металла.
- Для активации ферментов свёртывания крови требуется  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- у оксидоредуктаз - кофакторы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;
- у киназ –  $\text{Mg}^{2+}$  ;
- у глутатионпероксидазы – Se.
- Карбоангидраза активна только в присутствии  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Карбоксипептидаза A (E поджелудочной железы), построенная из одной полипептидной цепи (307 АК), содержит атом Zn в АкЦ.

# Роль иона Me

Участие:

- в присоединении субстрата;
- собственно в катализе;
- в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента;
- в стабилизации четвертичной структуры.

# Роль иона Me:

- функции простетических групп;
- служат акцепторами и донаторами электронов;
- Роль Me в присоединении S в АкЦ E:
  - стабилизаторы молекулы S;
  - стабилизаторы АкЦ E;
  - стабилизаторы третичной и четвертичной структуры.
- Роль Me в регуляции активности E.

# Некоторые металловзависимые ферменты

Фермент	Ион металла	Функция иона металла
Гексокиназа	$Mg^{2+}$	Связывание субстрата
Пируваткиназа	$Mg^{2+}$ , $K^{+}$	Связывание субстрата и катализ
<b>Аргиназа</b>	<b><math>4Mn^{2+}</math></b>	«
$\alpha$ -амилаза	$Ca^{2+}$ (и анион $Cl$ )	Стабилизация третичной структуры
Карбоксипептидаза А	$Zn^{2+}$	Катализ
<b>Транскетолаза</b>	<b><math>Ca^{2+}</math></b>	<b>Стабилизация четвертичной структуры</b>
Супероксиддисмутаза	$2Zn^{2+}$ , $2Cu^{2+}$	Катализ
<b>Церулоплазмин</b>	<b><math>8Cu^{2+}</math></b>	«
Ксантиноксидаза	$2Mo^{6+}$	«

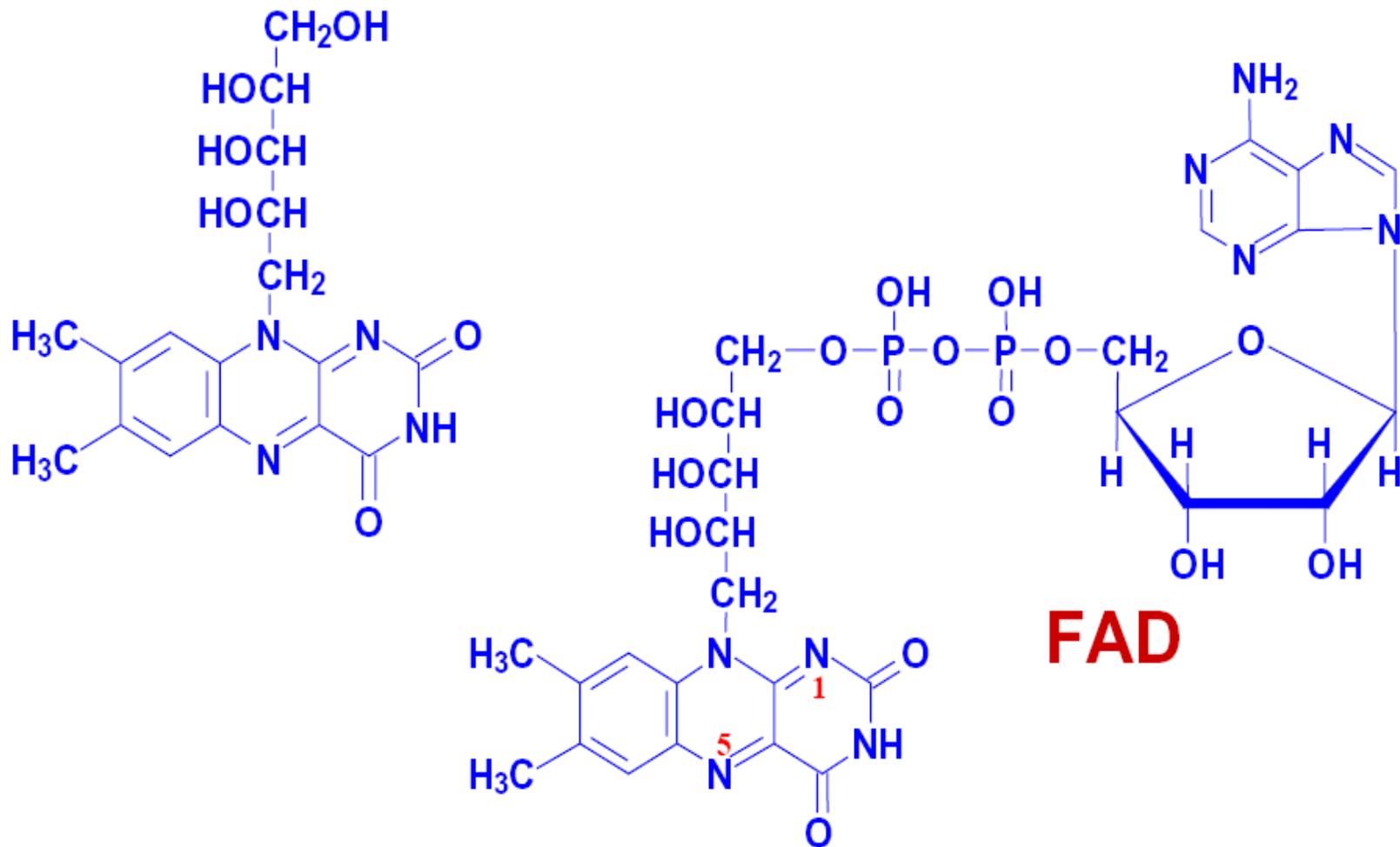
## Коферменты – производные витаминов

Кофермент	Роль в катализе	Витамин-предшественник
НАД и НАДФ	Перенос водорода (электронов)	Витамин РР (амид никотиновой кислоты)
ФАД и ФМН	Перенос водорода (электронов)	Витамин В <sub>2</sub> (рибофлавин)
Кофермент А (коэнзим А, КоА)	Активация и перенос ацильных групп	Пантотеновая кислота (вит. В <sub>5</sub> )
Биотин	Связывание СО <sub>2</sub>	Биотин (вит. Н)

# Коферменты – производные витаминов

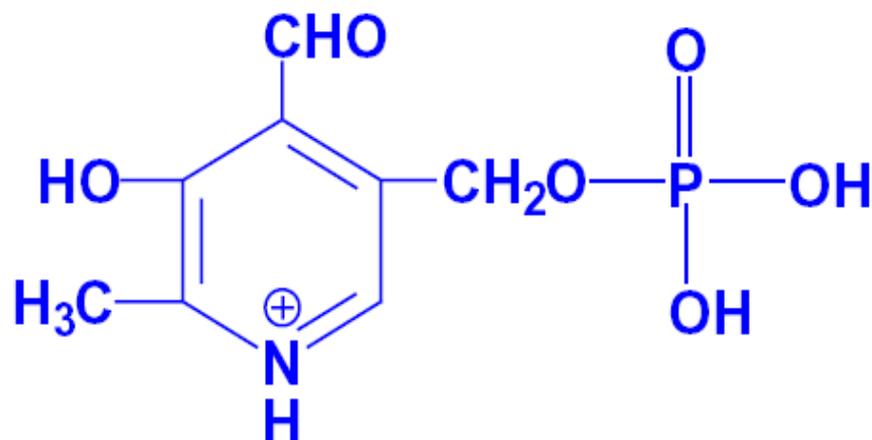
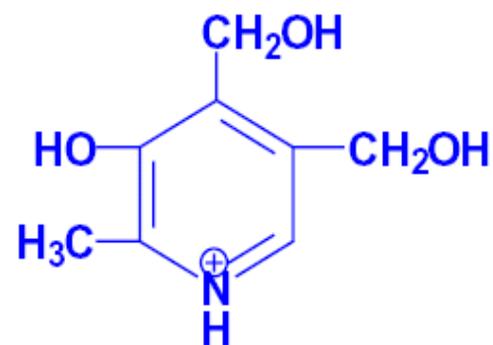
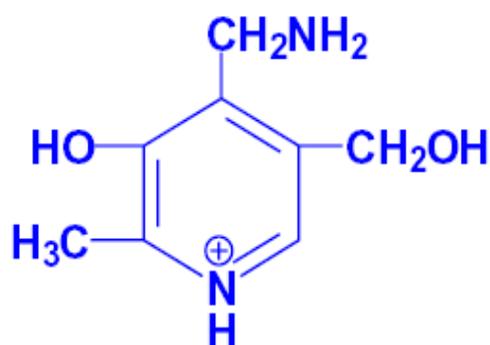
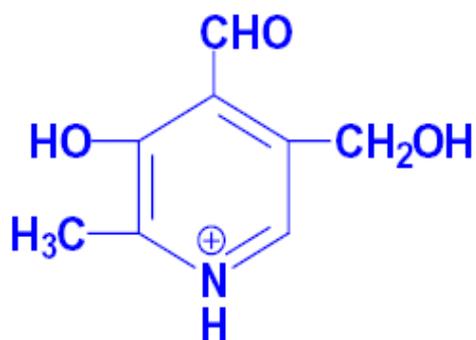
Кофермент	Роль в катализе	Витамин-предшественник
Пиридоксаль-фосфат (ПФ)	Перенос аминогрупп, декарбоксилирование аминокислот	Витамин В <sub>6</sub> (пиридоксин)
Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК, Н <sub>4</sub> -фолат)	Транспорт одноуглеродных фрагментов	Фолиевая кислота (вит. В <sub>9</sub> )
Тиамин-пирофосфат (ТПФ, ТДФ)	Декарбоксилирование $\alpha$ - кетокислот	Витамин В <sub>1</sub> (тиамин)
Дезоксиаденозил- (или метил) кобаламин	Перенос алкильных групп; метилирование гомоцистеина	Витамин В <sub>12</sub> (кобаламин)

# ФАД. Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин)

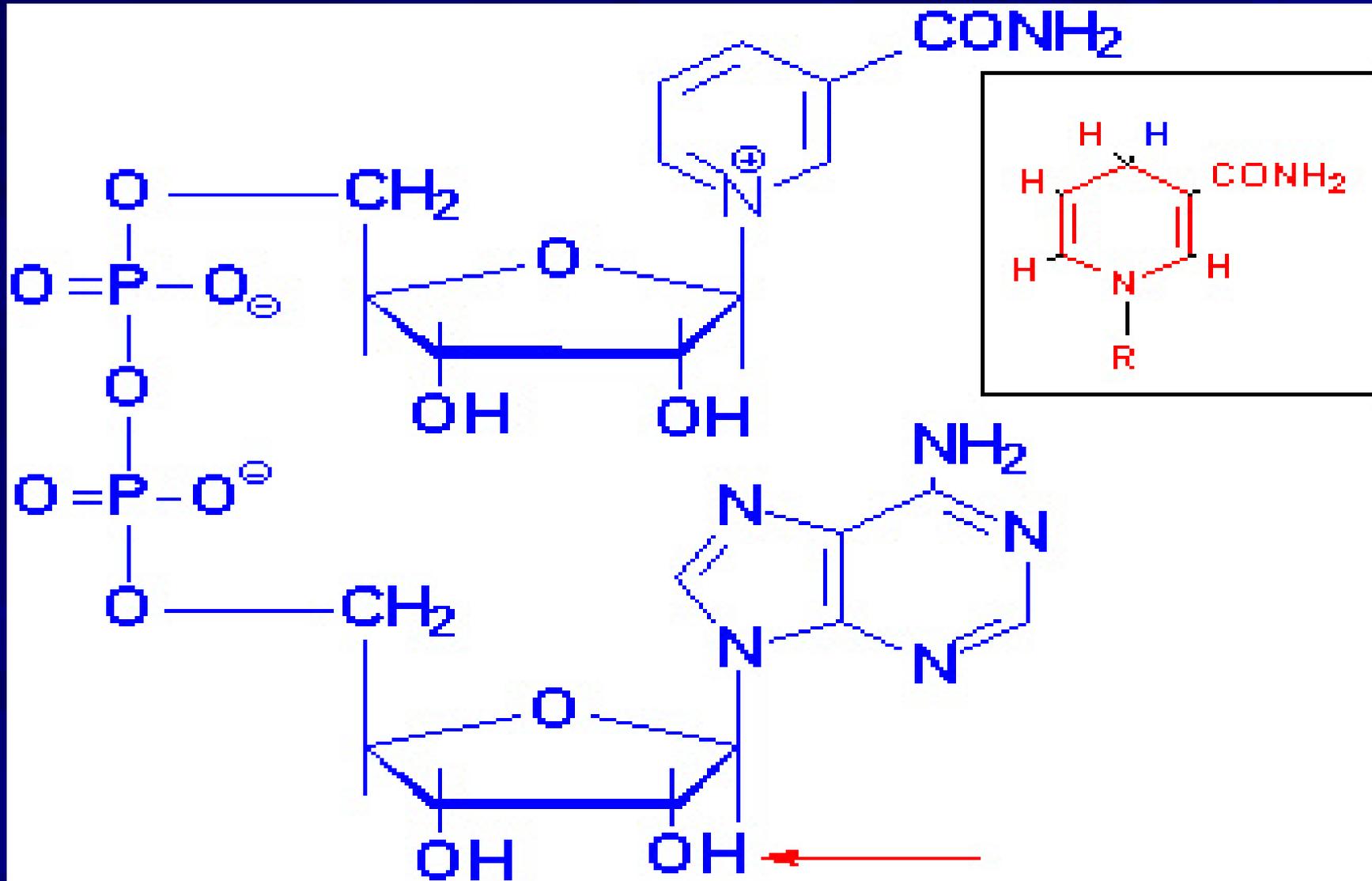


# Витамин В<sub>6</sub>. Пиридоксальфосфат

## Pyridoxal, Pyridoxamine, Pyridoxine (the B<sub>6</sub>s)



# НАД, ВИТ. РР



# Коферменты

К коферментам относят:

- производные витаминов;
- нуклеотиды АТФ, УТФ, ЦТФ;
- Фосфоаденозинфосфосульфат (ФАФС);
- HS-глутатион;
- S-аденозилметионин (SAM);
- гем;
- липоевая кислота и т.д.

## Специфичность ферментов

Специфичность ферментов обусловлена комплементарностью между S и E и уникальной структурной организацией АкЦ.

- Виды специфичности: субстратная и каталитическая

Субстратная:

- абсолютная специфичность – E действует только на один S (уреаза, каталаза, аргиназа, фумараза, сахараза и др.);
- относительная (групповая) специфичность – E катализирует однотипные превращения сходных по строению веществ (липаза → сложноэфирные связи, пептидазы → пептидные связи, гексокиназа фосфорилирует все гексозы и др.);

# Специфичность ферментов

- **Стереохимическая специфичность –**
  - Е катализирует превращение только одного из стереоизомеров (стереоспецифичность к цис-транс-изомерам - для фумаразы S – фумаровая к-та, а не малеиновая;
  - Е, осуществляющие метаболизм моносахаридов специфичны к D-сахарам, а большинство Е, участвующих в обмене АК, стереоспецифично к L-АК;
  - стереоспецифичность к  $\alpha$  и  $\beta$  гликозидным СВЯЗЯМ – амилаза расщепляет  $\alpha$ -гликозидные связи в крахмале и гликогене, но не действует на целлюлозу.

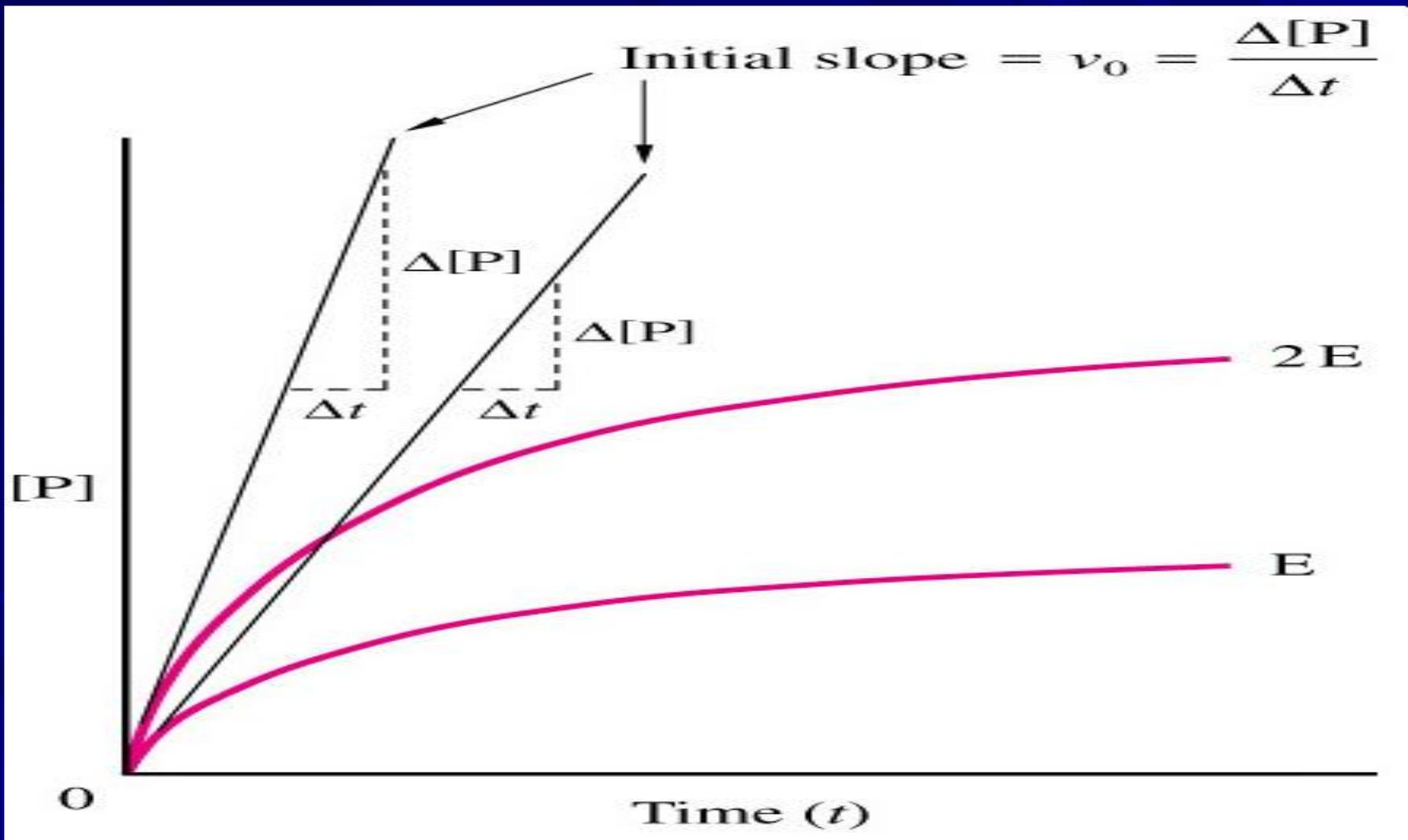
# Специфичность ферментов

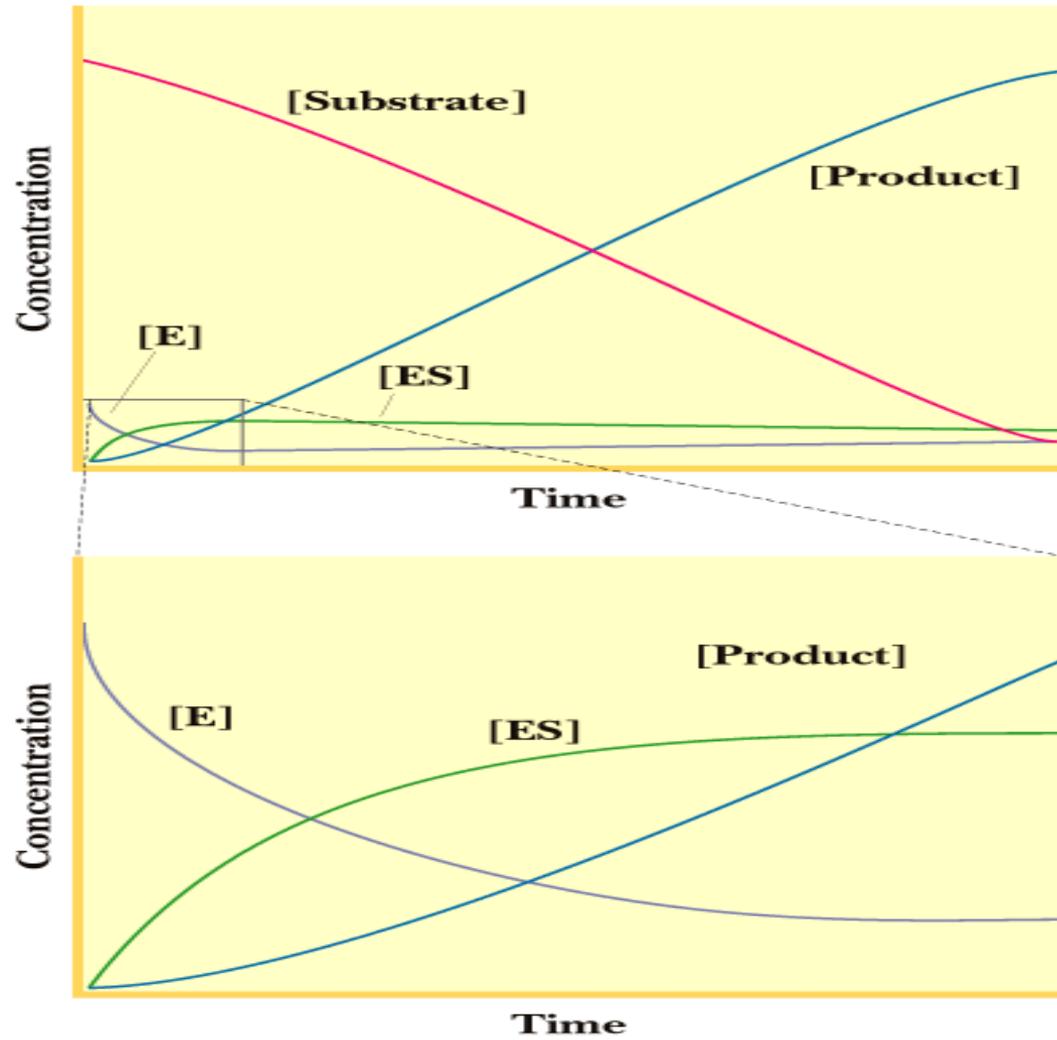
- Каталитическая специфичность – специфичность пути превращения S. E катализирует превращение присоединенного S по одному из возможных путей превращения, обусловлено строением каталитического участка АкЦ E. Так, глюкозо-6-фосфат в клетках печени —S 4 различных E. Из-за особенностей строения каталитических участков этих E происходит различное превращение глю-6-фосфата с образованием 4 различных P.

# Кинетика ферментативных реакций -

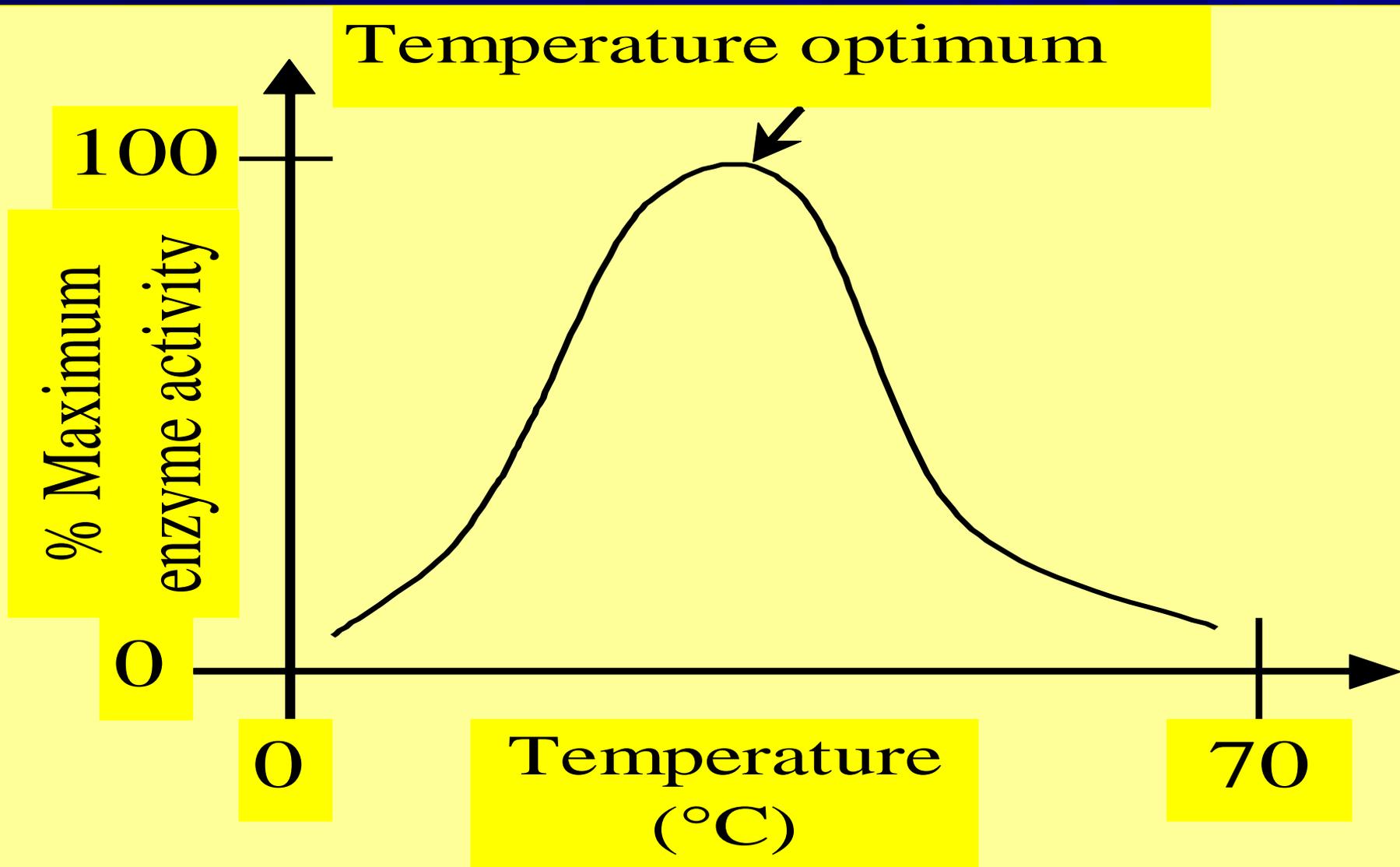
- - раздел химической кинетики, изучающий зависимость  $V$  ферментативной реакции от:
  - $t^{\circ}$ ;
  - pH среды;
  - $[E]$ ;
  - $[S]$ ;
  - действия активаторов и ингибиторов и др. факторов.
- $V$  ферментативной реакции определяют по убыли  $S$  или нарастанию  $P$  за единицу времени.

# Зависимость скорости ферментативной реакции от времени

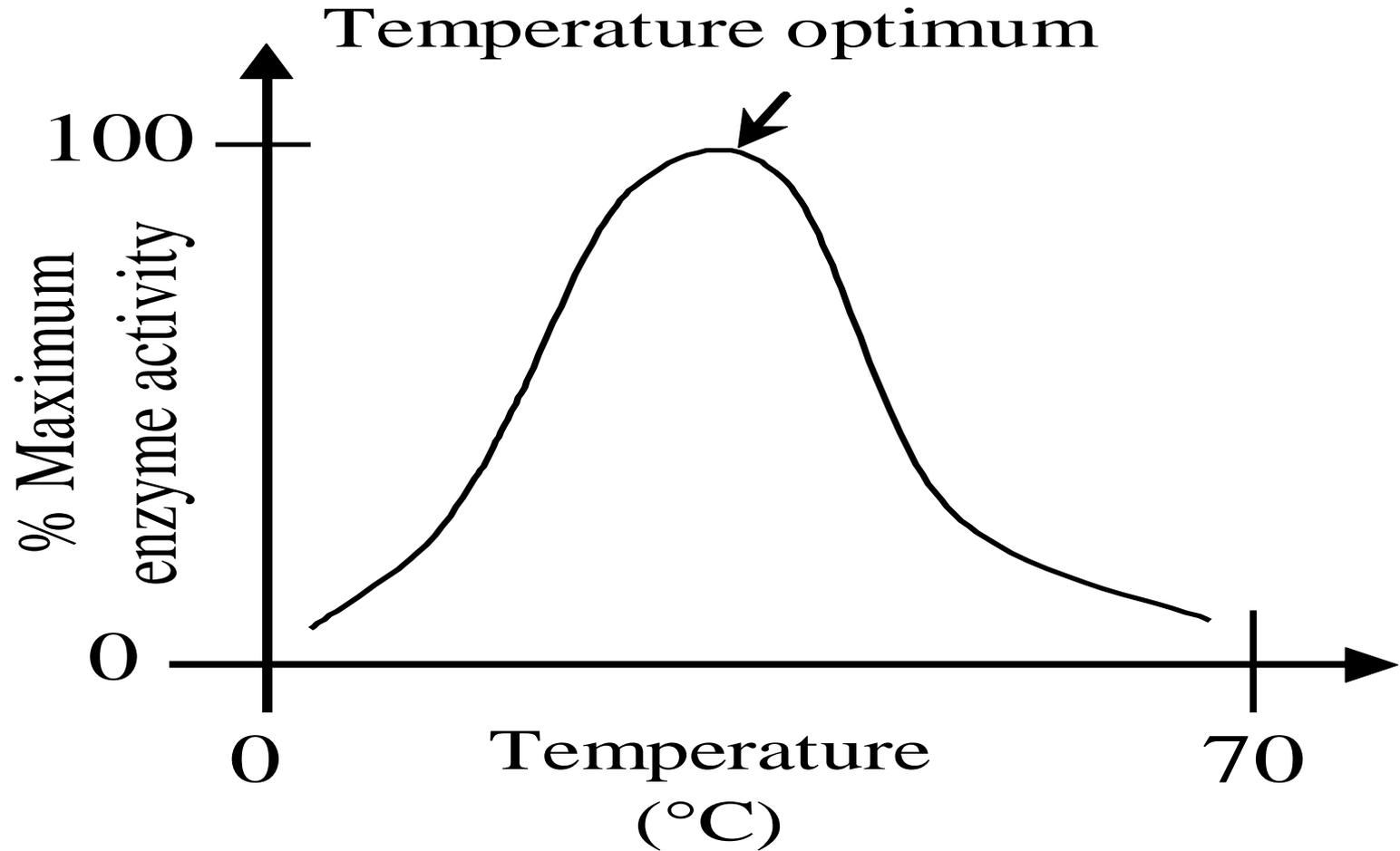




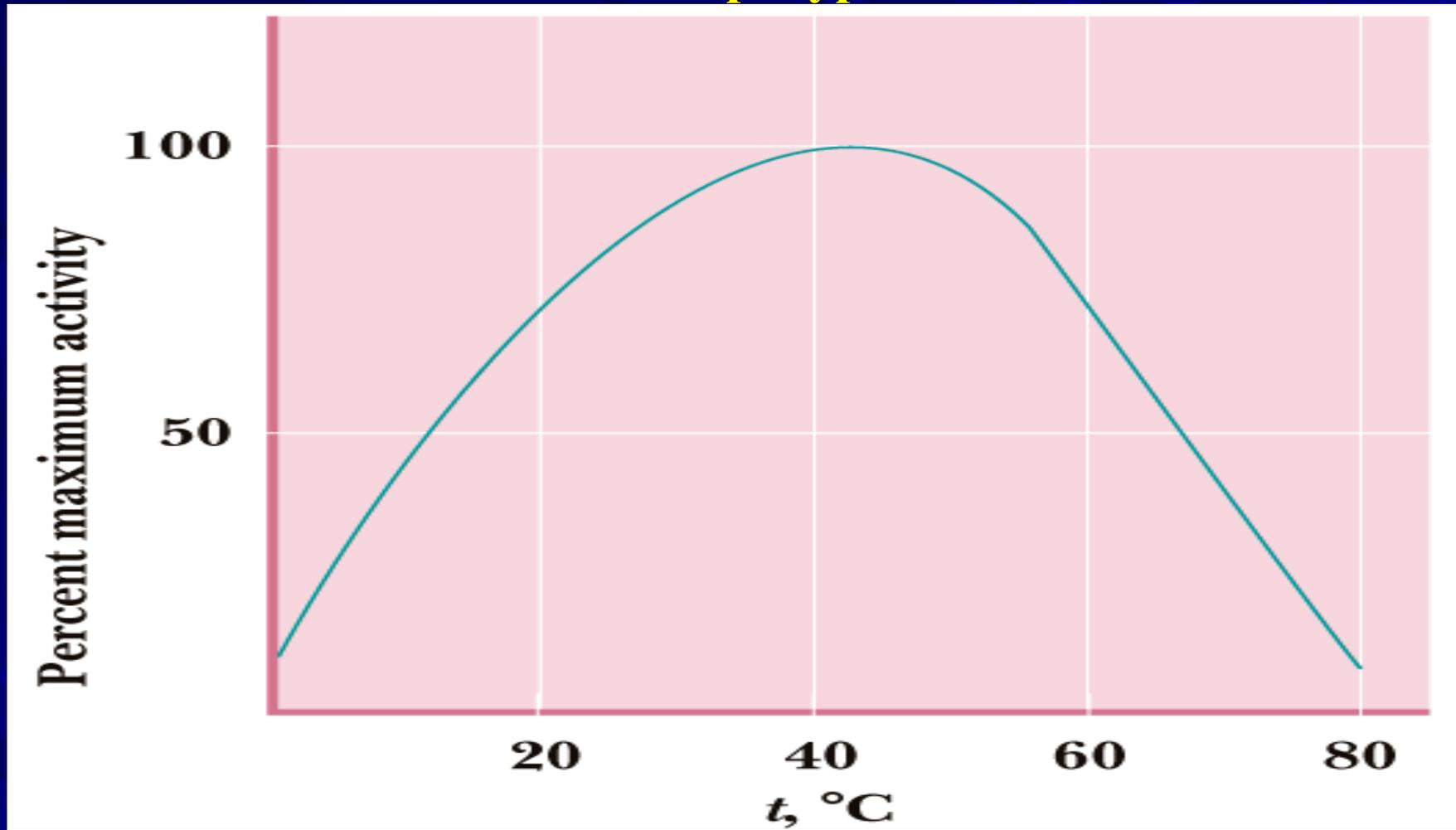
# Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



# Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



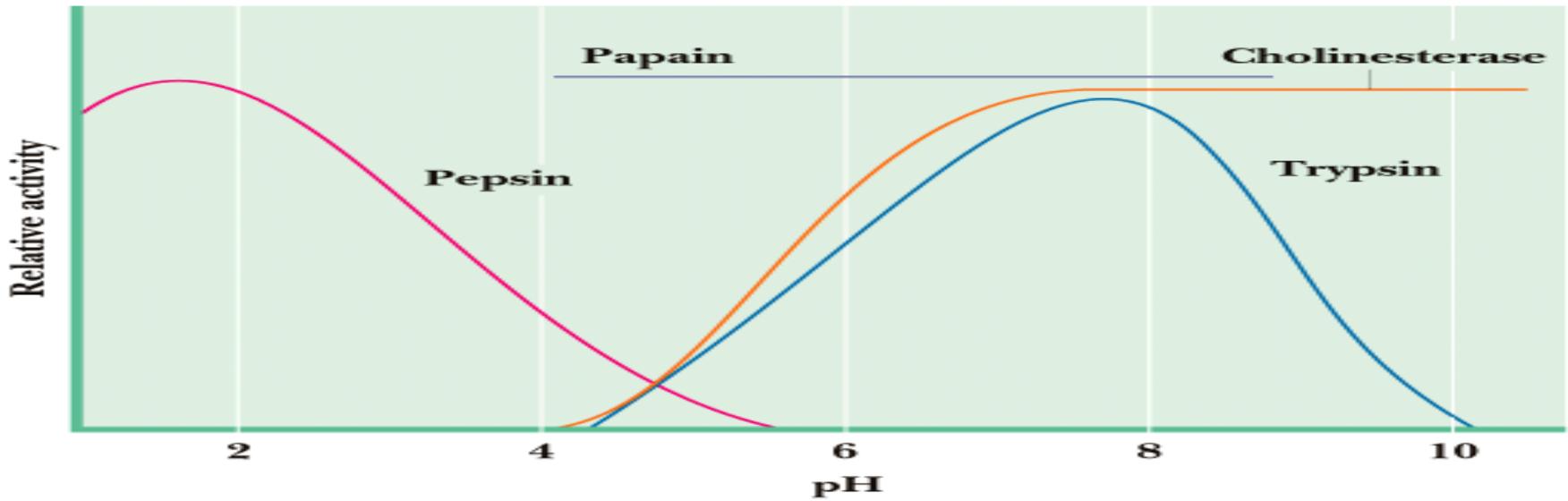
## Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



# Tag -полимераза

- Выделена из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется до 95°, используется для молекулярной диагностики заболеваний с использованием ПЦР.

# Зависимость V реакции от pH среды

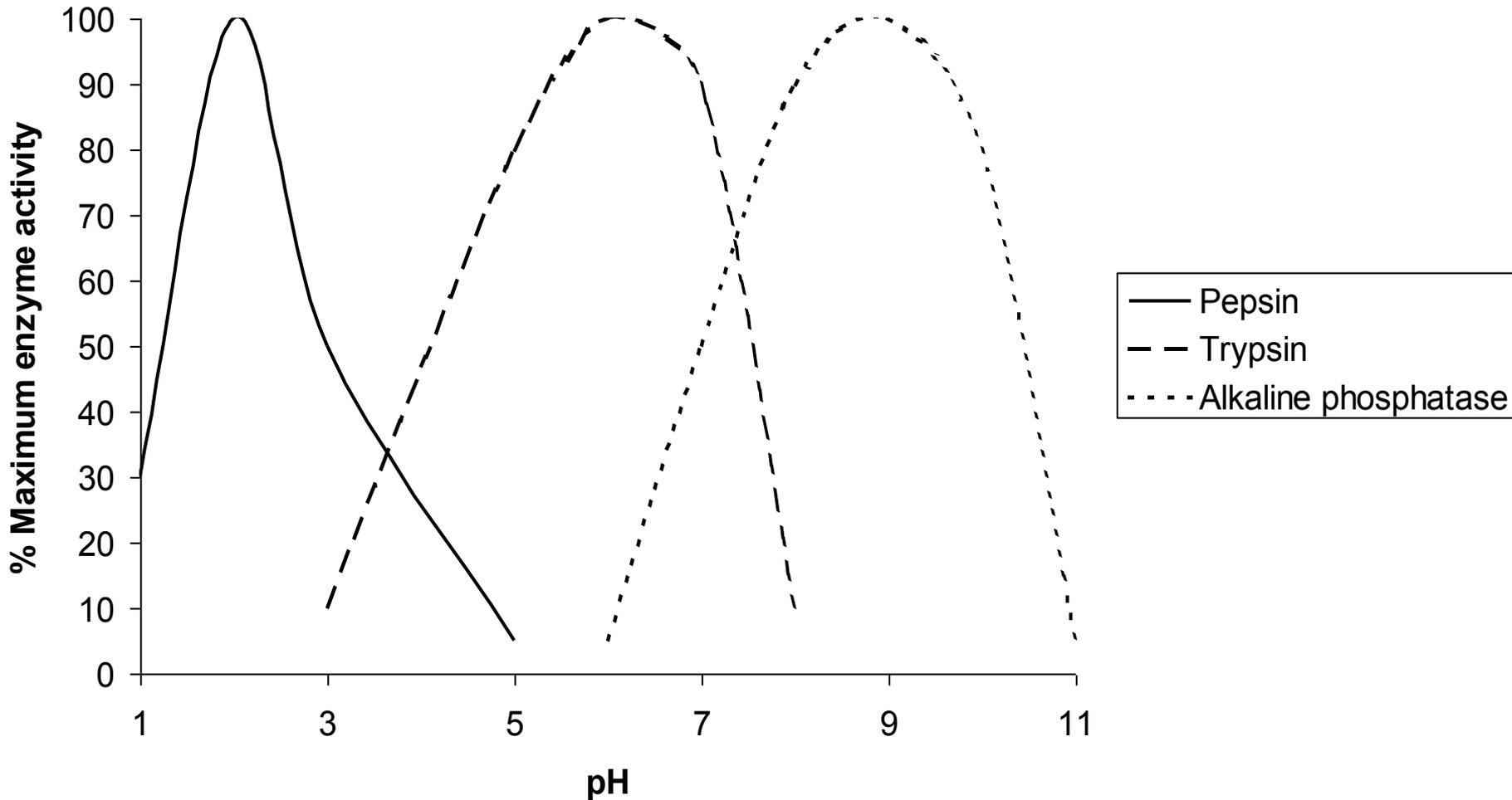


**Optimum pH of Some Enzymes**

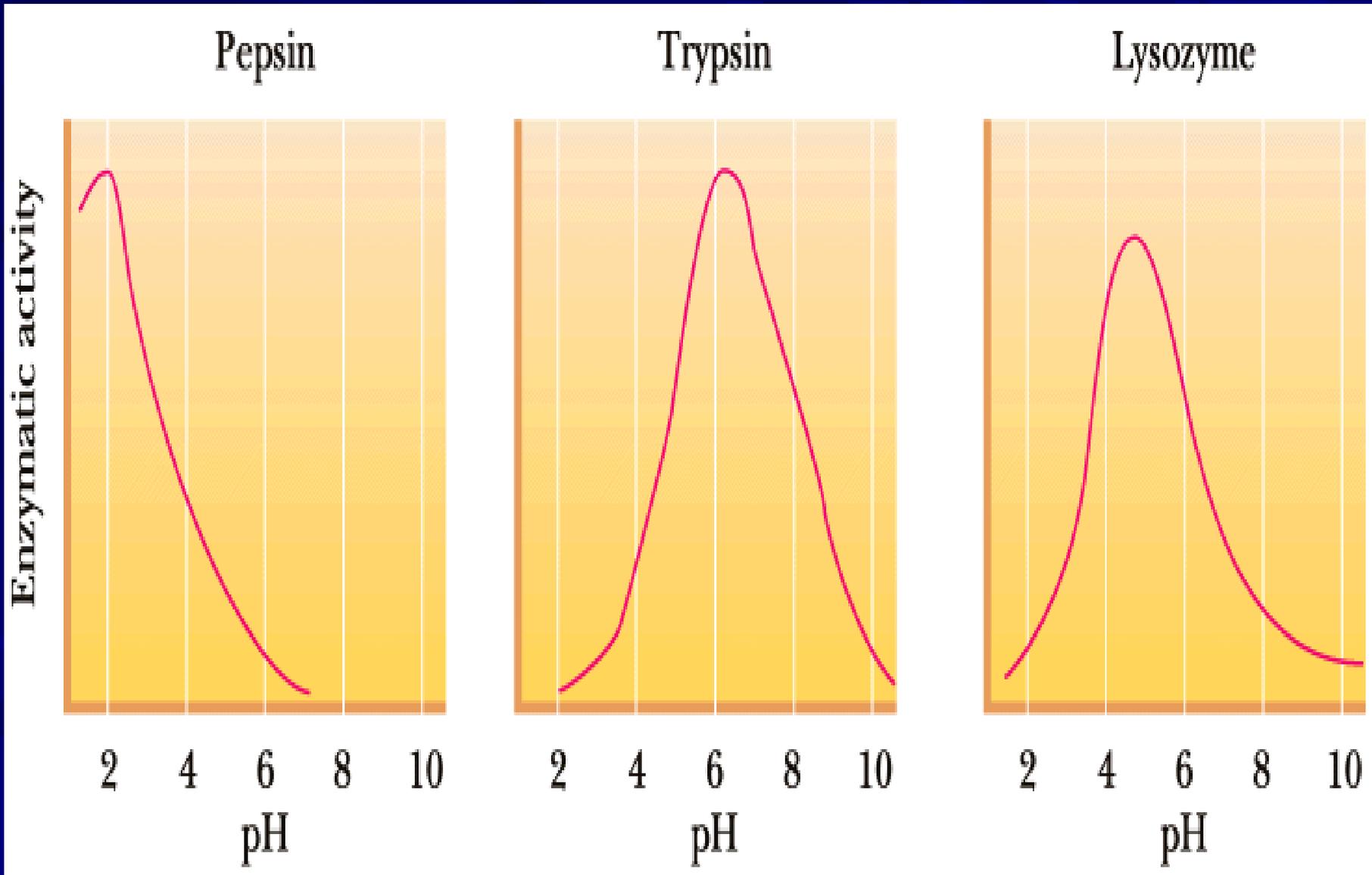
Enzyme	Optimum pH
Pepsin	1.5
Catalase	7.6
Trypsin	7.7
Fumarase	7.8
Ribonuclease	7.8
Arginase	9.7

# Зависимость $V$ реакции от pH среды

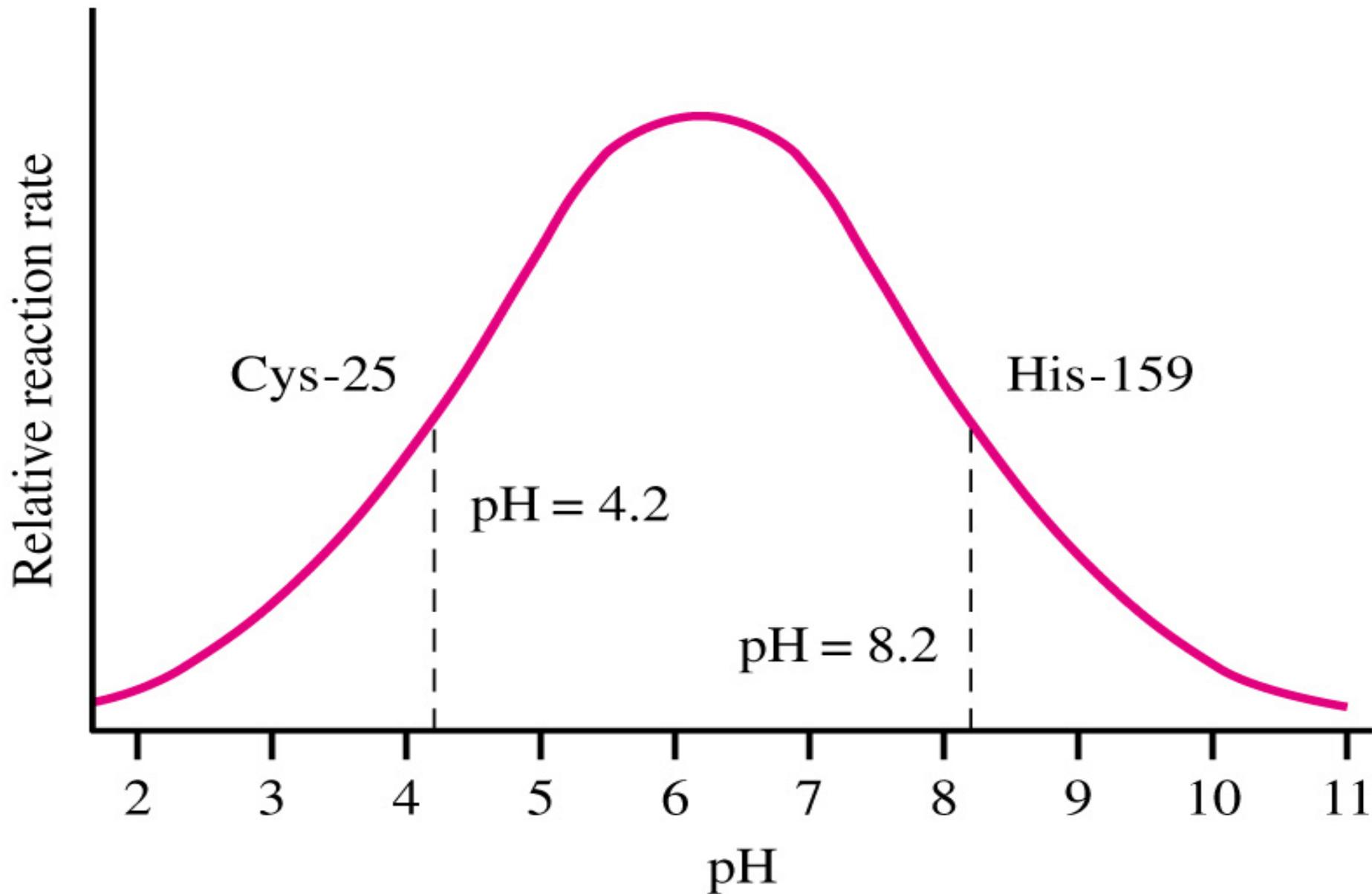
Effect of pH on enzyme-catalysed reactions



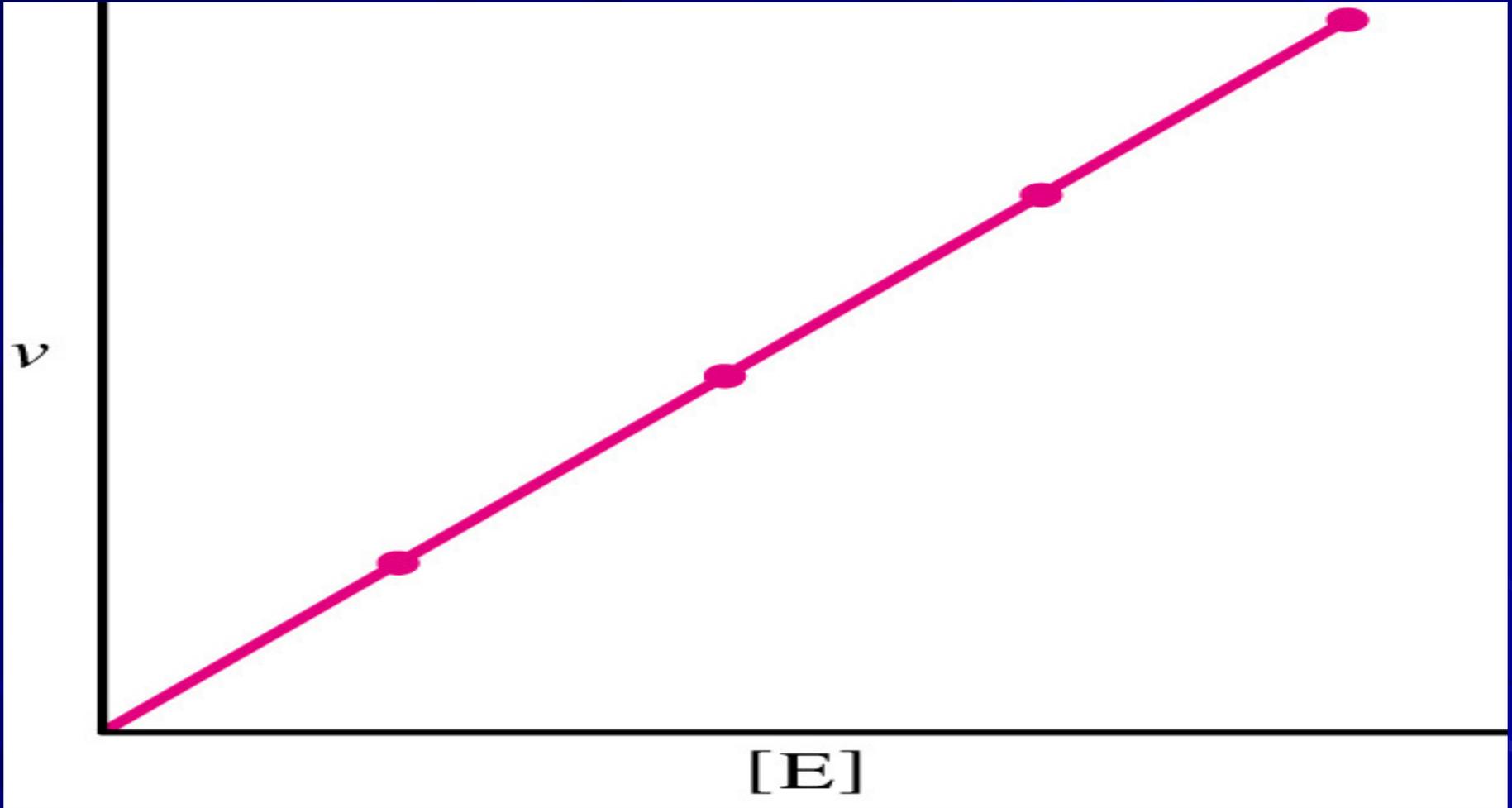
# Влияние pH на активность E



# Оптимум рН папаина 6,2

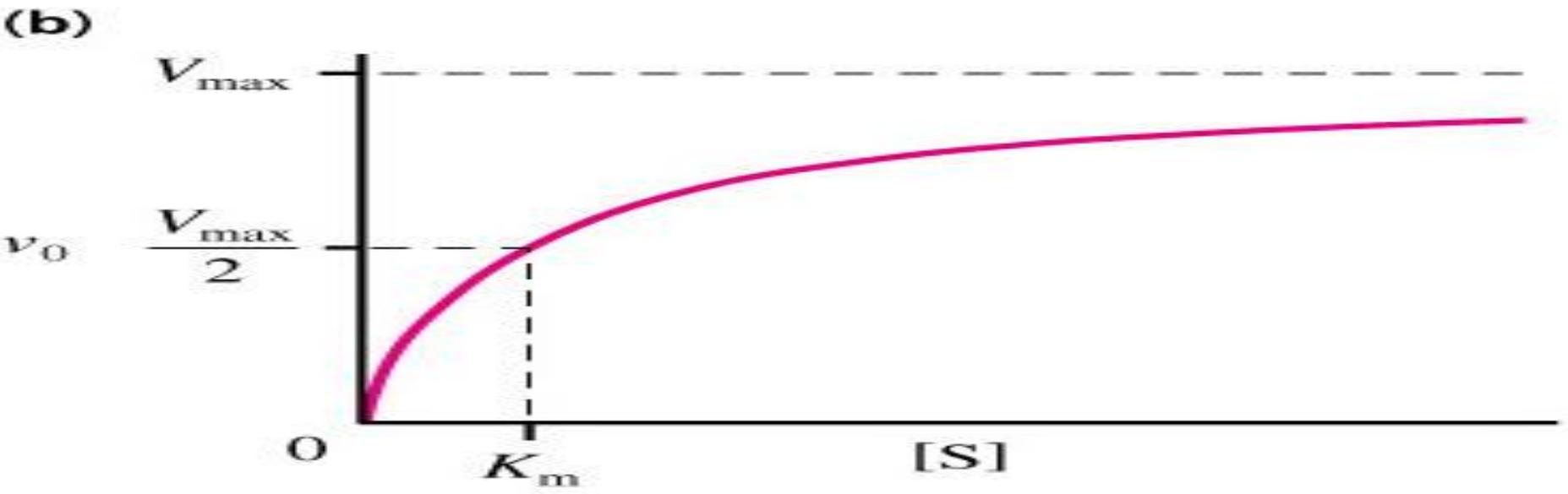


# Зависимость $V$ реакции от $[E]$

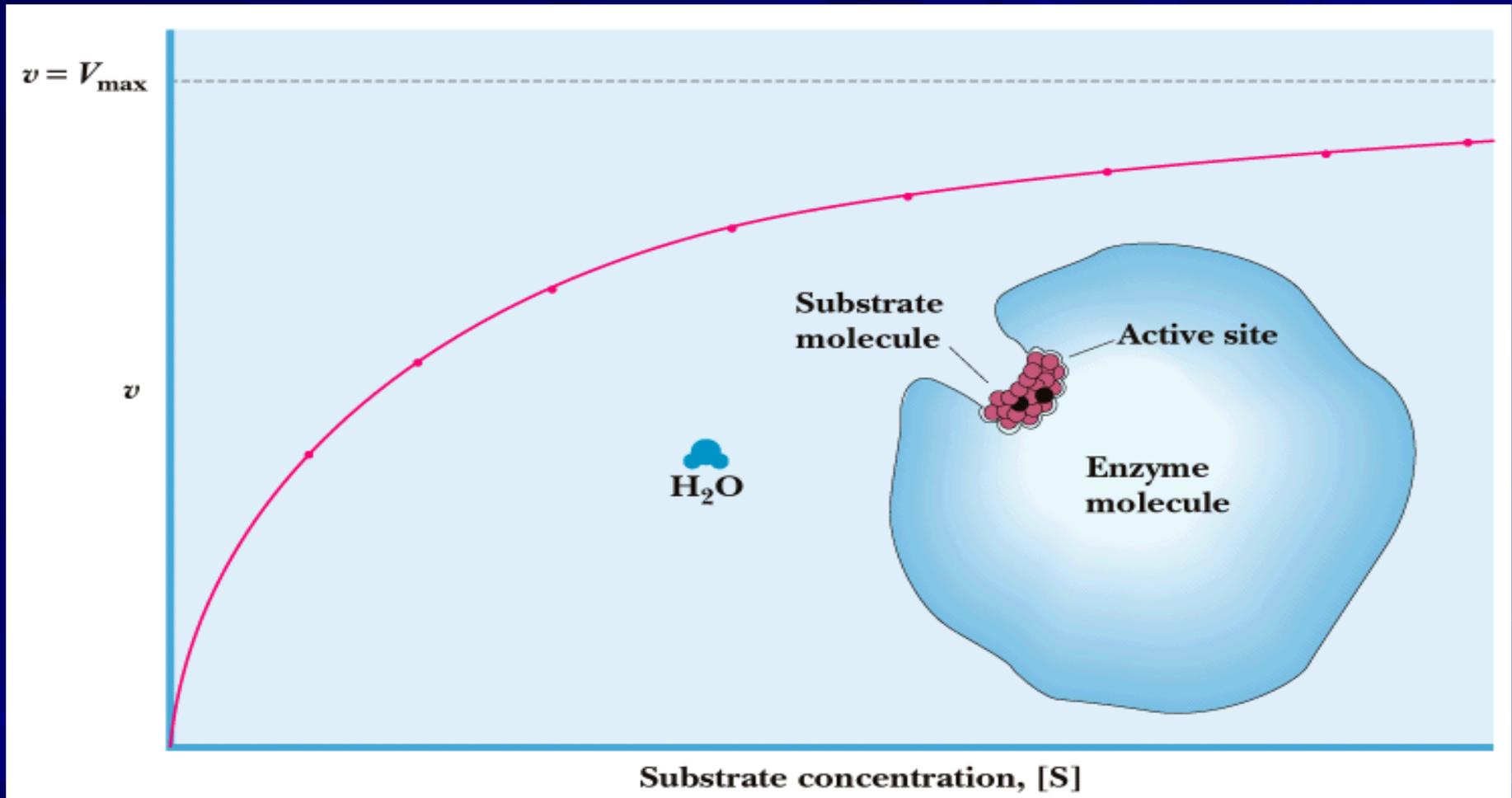


$$V = K [E]$$

# Влияние концентрации S на V



# Влияние концентрации S на V



Кривая зависимости  $V$  ферментативной реакции от  $[S]$  - гипербола.

# Константа Михаэлиса ( $K_m$ )

- $K_m$  - численно равна концентрации субстрата  $[S]$ , при которой скорость равна половине максимальной ( $1/2 V_{max}$ ).

$V_{max}$  и  $K_m$  — кинетические характеристики эффективности  $E$ .

$V_{max}$  позволяет оценить эффективность действия  $E$ , определяет максимальную возможность образования  $P$  при данной  $[E]$  и в условиях избытка  $S$ .

# $V_{max}$ и $K_m$

- Физический смысл  $K_m$ , — сродство E к S. Чем  $\downarrow K_m$ , тем  $\uparrow$  сродство E к данному S, тем  $>$  начальная скорость реакции и наоборот.
- Пример: в печени 2 E, фосфорилирующие глюкозу — глюкокиназа ( $K_m = 10$  ммоль/л) и гексокиназа ( $K_m < 0,1$  ммоль/л). Глюкокиназа, имеющая  $\uparrow K_m$  и  $\downarrow$  сродство к S (глюкозе) активна при  $\uparrow$  [глю] в крови, т.е. в абсорбтивный период (период пищеварения), а гексокиназа, имеющая  $\downarrow K_m$  и  $\uparrow$  сродство к S активна при низкой [глю] в крови, т.е. в постабсорбтивный период (промежуток между приемами пищи).

# Уравнение Михаэлиса-Ментен

- уравнение Михаэлиса – Ментен:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{([S] + K_m)}$$

- Уравнение Лайнуивера-Бэрка:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]}$$

Леонор Михаэлис (1875-1949) и Мауд Ментен (1879-1960) пионеры в кинетике ферментов.

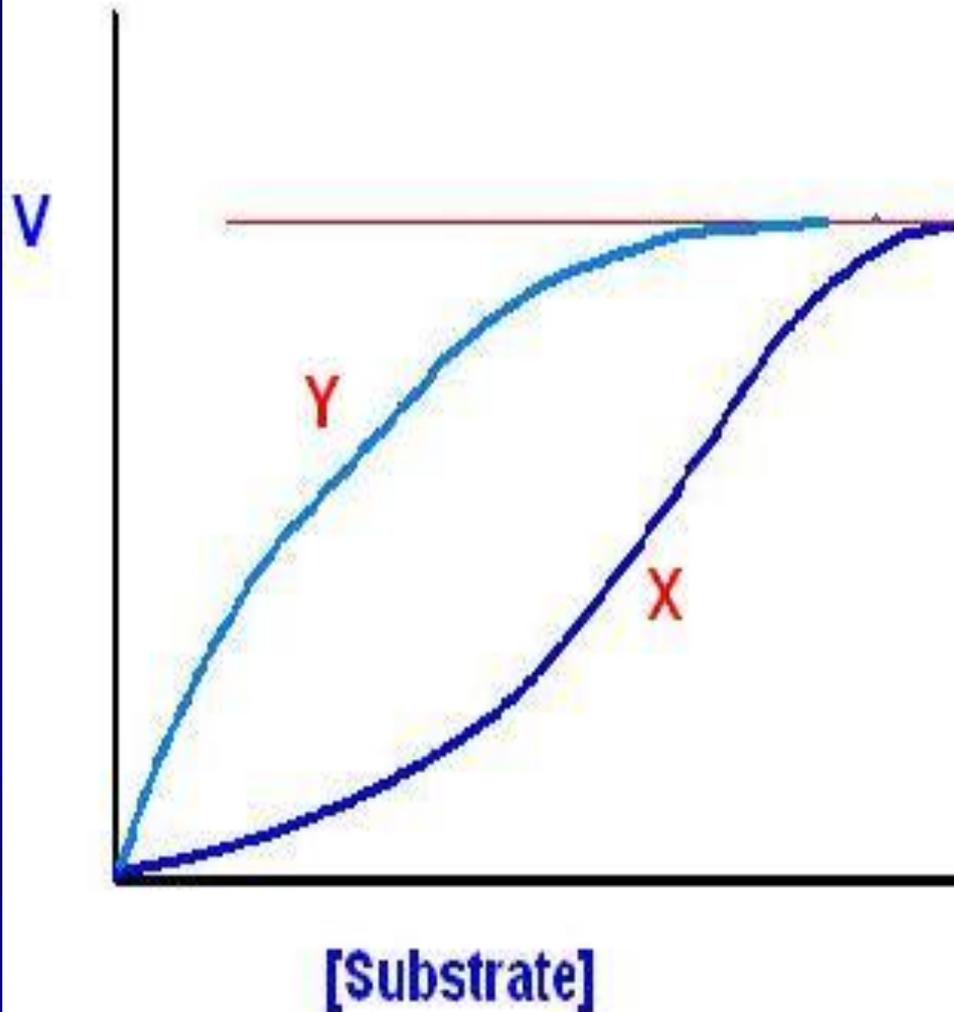
(a)



(b)

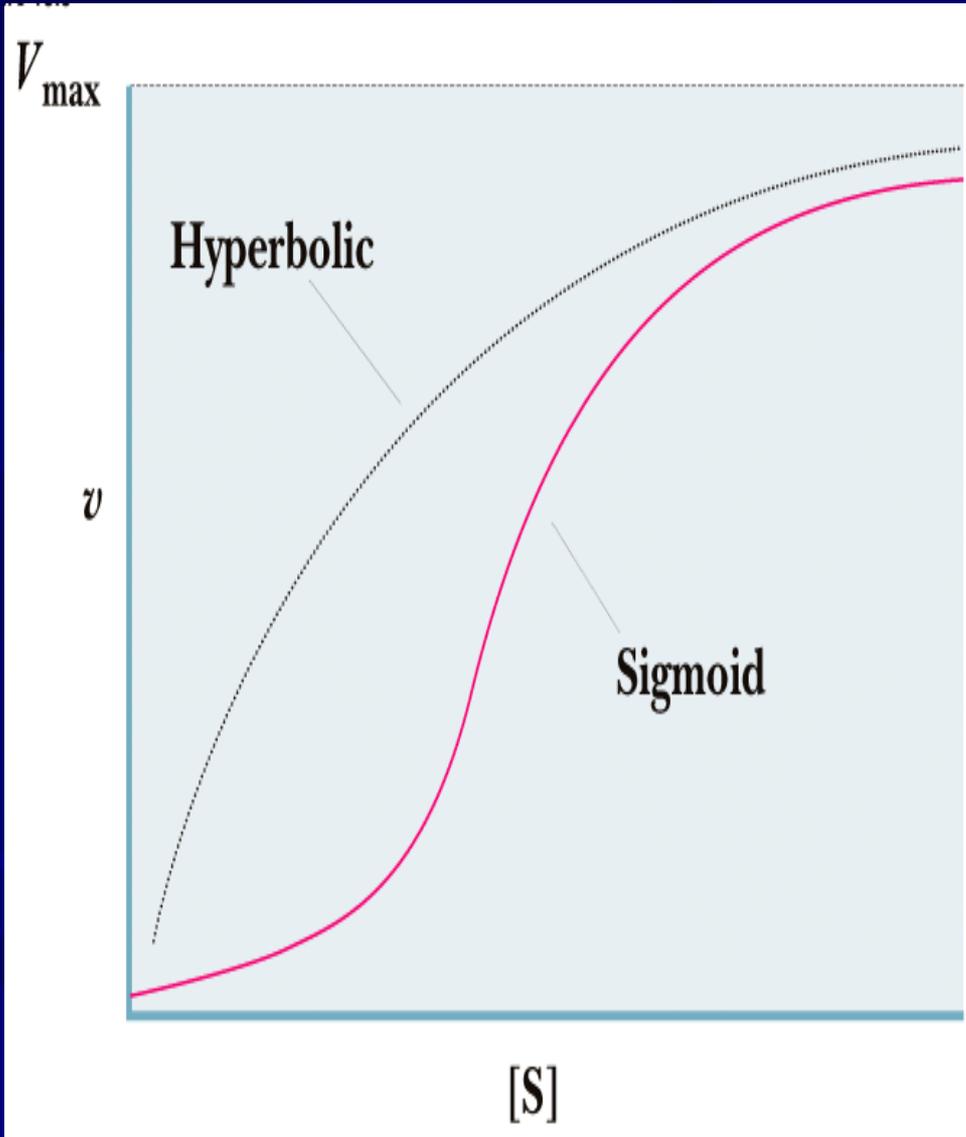


## Влияние $[S]$ на $V$ у аллостерических ферментов



The relationship between substrate concentration and velocity for a single enzyme in the absence (curve X) and presence (curve Y) of a compound that binds allosterically to enzyme

## Влияние $[S]$ на $V$ у аллостерических ферментов

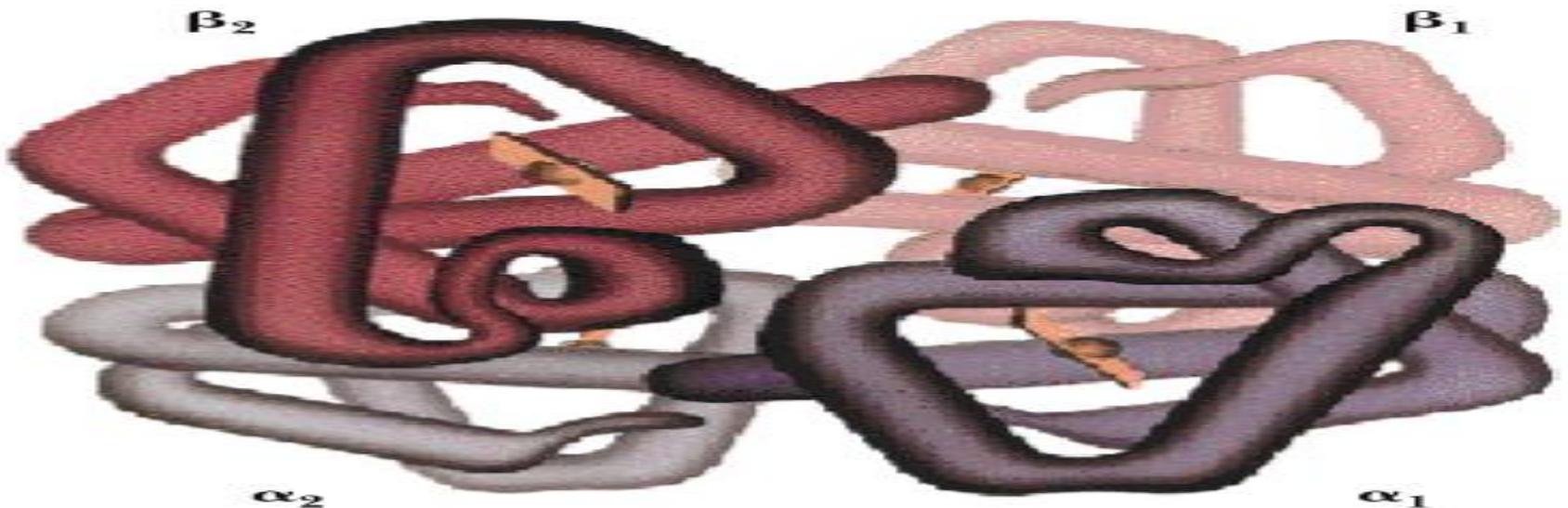


У аллостерических Е график зависимости  $V$  от  $[S]$  — не гипербола, а S-образная кривая (связывание одной молекулы  $S$  в одном каталитическом центре  $\uparrow$  связывание  $S$  с другим центром — положительный кооперативный эффект).

# МВ и НВ



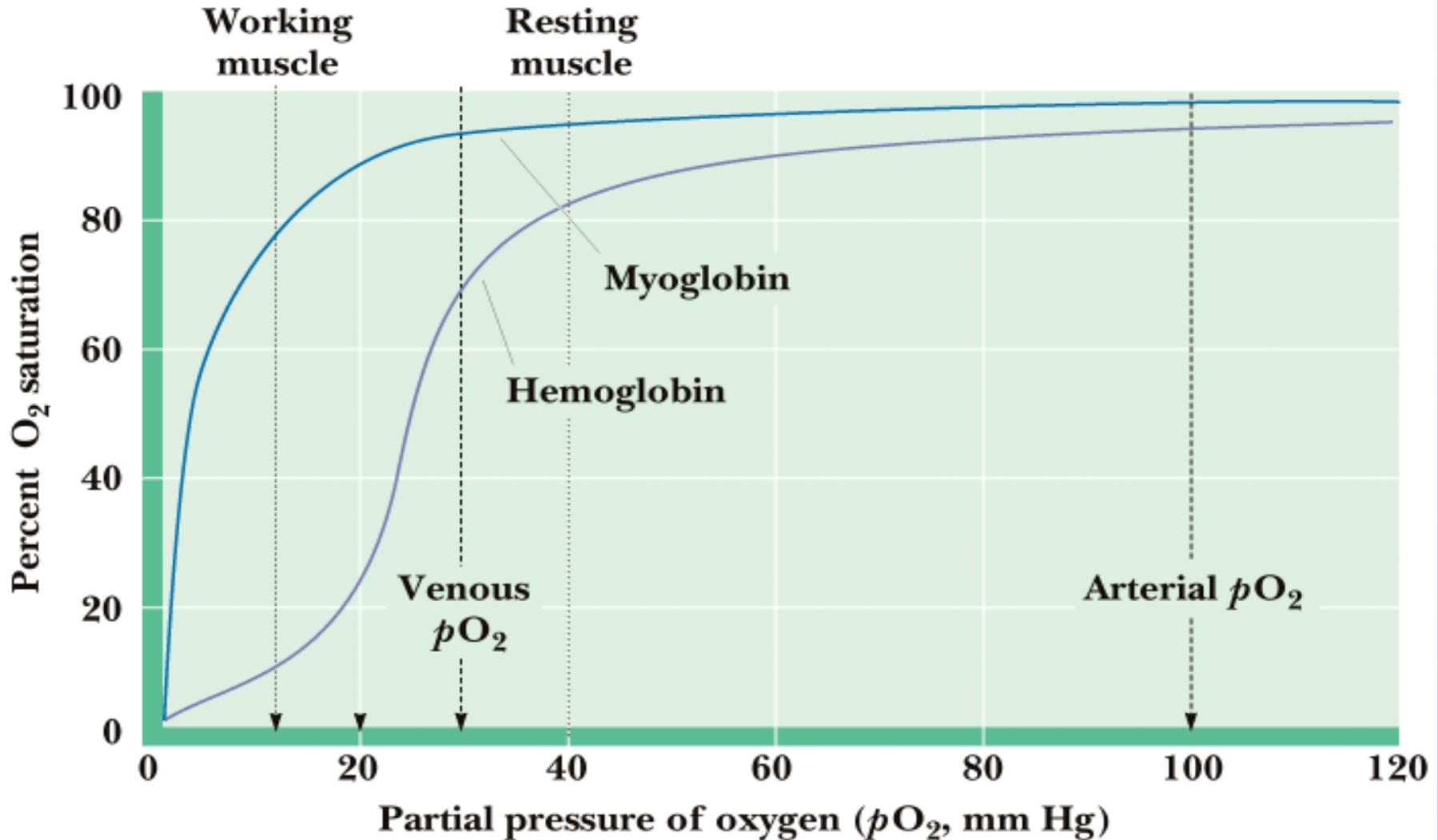
Myoglobin (Mb)



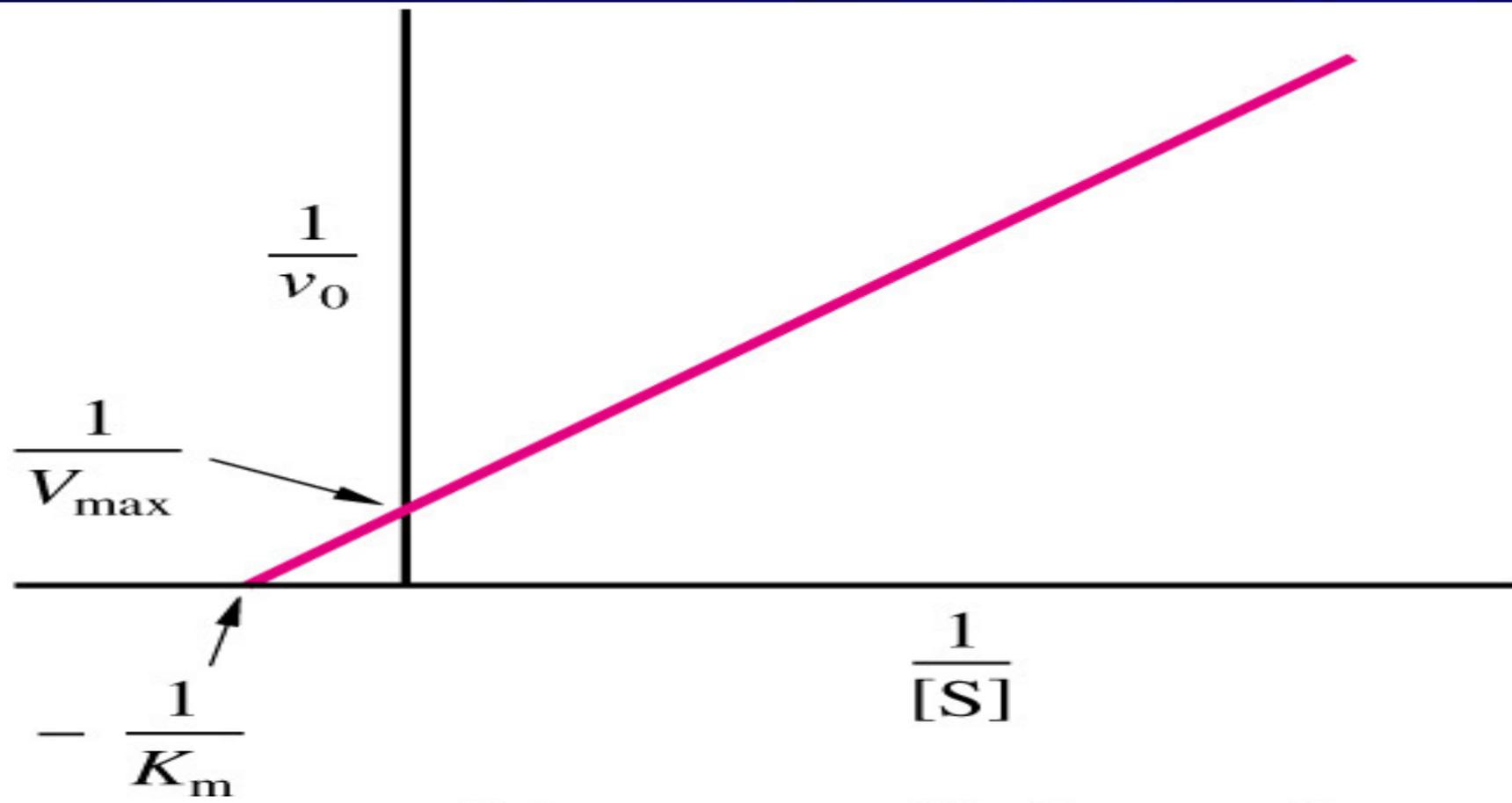
Hemoglobin (Hb)

# Кривые насыщения Нв и Мв O<sub>2</sub>

Figure 15.22



# Уравнение и график Лайнуивера-Бэрка



Lineweaver-Burk equation:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

## $\frac{[E][I]}{[EI]}$ Ингибиторы (I) – вещества, снижающие активность ферментов

- Ингибирование - обратимое и необратимое.
- Обратимые I нековалентно связываются с E и могут отделяться от E.
- Реакция в общем виде:  $E + I \leftrightarrow EI$
- Константа ингибирования:  $\frac{[E][I]}{[EI]}$

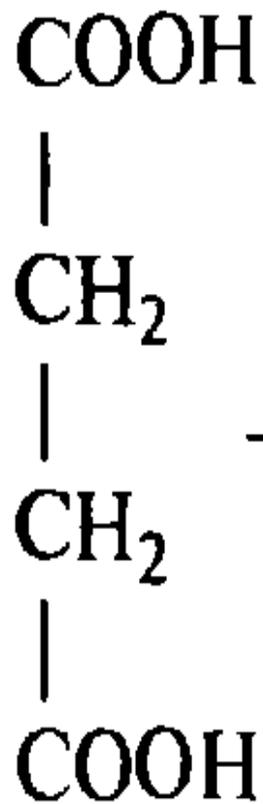
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

- Необратимые (специфически связывают определенные функционально важные группы АкЦ, образуя прочные ковалентные связи с ферментом, необратимо изменяя нативную конформацию E).  
Необратимые I - ионы тяжелых металлов ( $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $As^{3+}$  и др) в малых концентрациях блокируют SH группы АкЦ, а в больших – денатурация белка, инактивация E.
- Обратимое ингибирование - конкурентное и неконкурентное

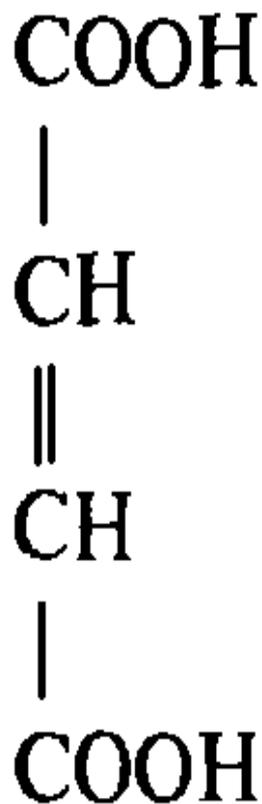
## Особенности конкурентного ингибирования:

- I конкурирует с S за связывание в S-связывающем участке АкЦ;
- I является структурным аналогом S и комплементарен ему;
- При  $\uparrow [S]$  действие I может быть снято;
- Конкурентный I  $\uparrow K_m$  ( $\downarrow$  сродство к E), т.к. вследствие конкуренции I и S за один и тот же центр для  $1/2$  насыщения требуется большее количество S, однако, когда система достигает насыщения,  $V_{\text{макс}}$  не изменяется.
- Пример: малонат – конкурентный I СДГ.

# Пример конкурентного ингибирования

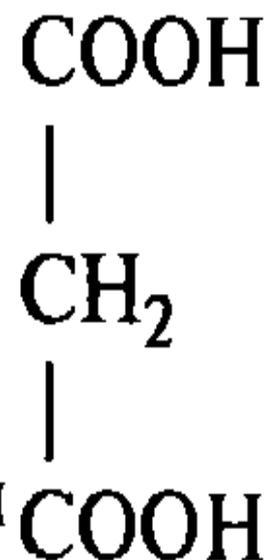


Сукцинат



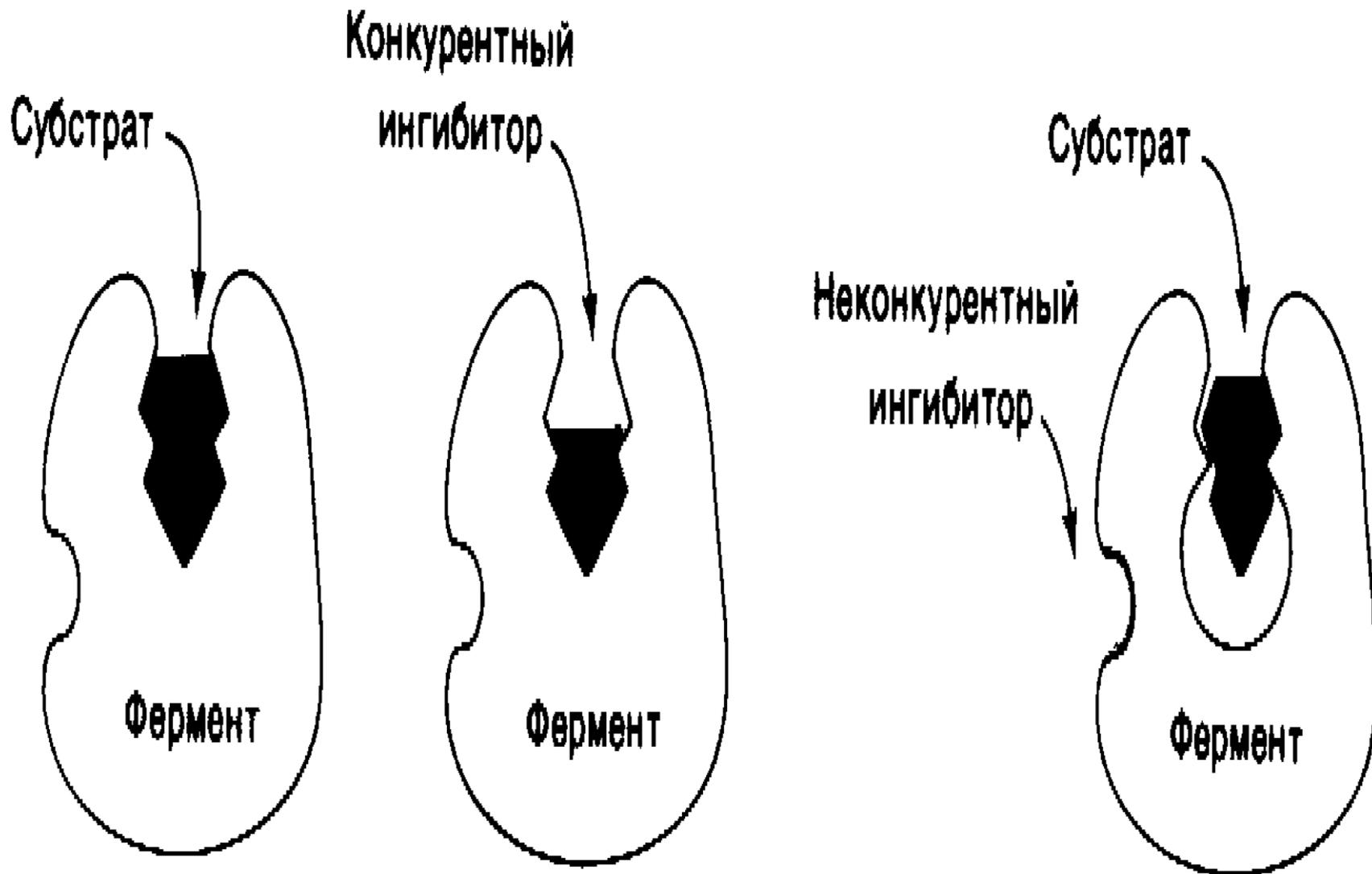
Фумарат

Ингибитор  
этой реакции



Малонат

# Ингибиторы



# Неконкурентное ингибирование

- I не имеет структурного сходства с S;
- I связывается не с АкЦ E;
- $\uparrow [S]$  не уменьшает действие I;
- $I \downarrow V_{\text{макс}}$  (I изменяет конформацию E так, что нарушается взаимодействие E с S) и не влияет на  $K_m$  (не влияет на сродство E к S).
- Важные неконкурентные I — метаболиты, связывающиеся в АлЦ E и участвующие в аллостерической регуляции метаболизма.

# Бесконкурентное и смешанное ингибирование

Бесконкурентное ингибирование — по схеме:



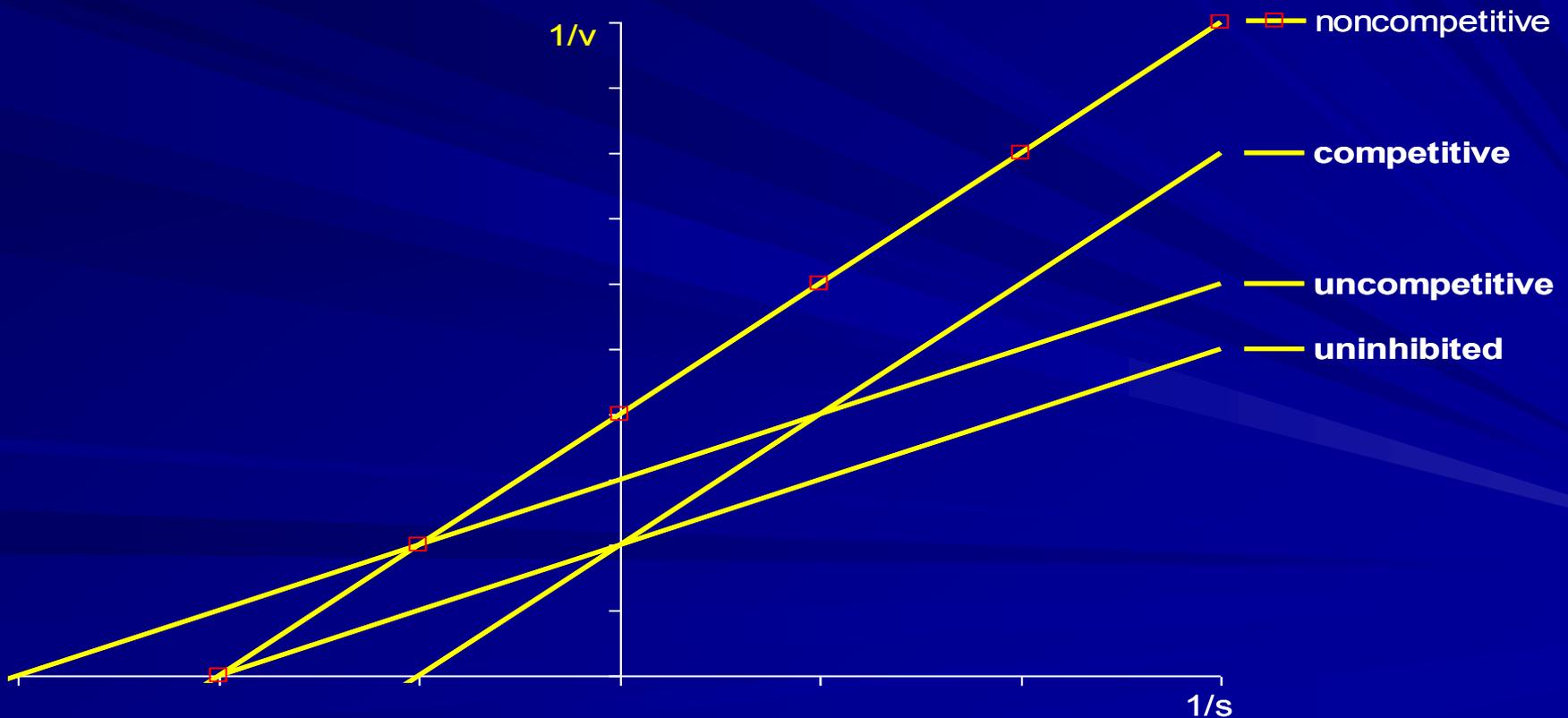
↓

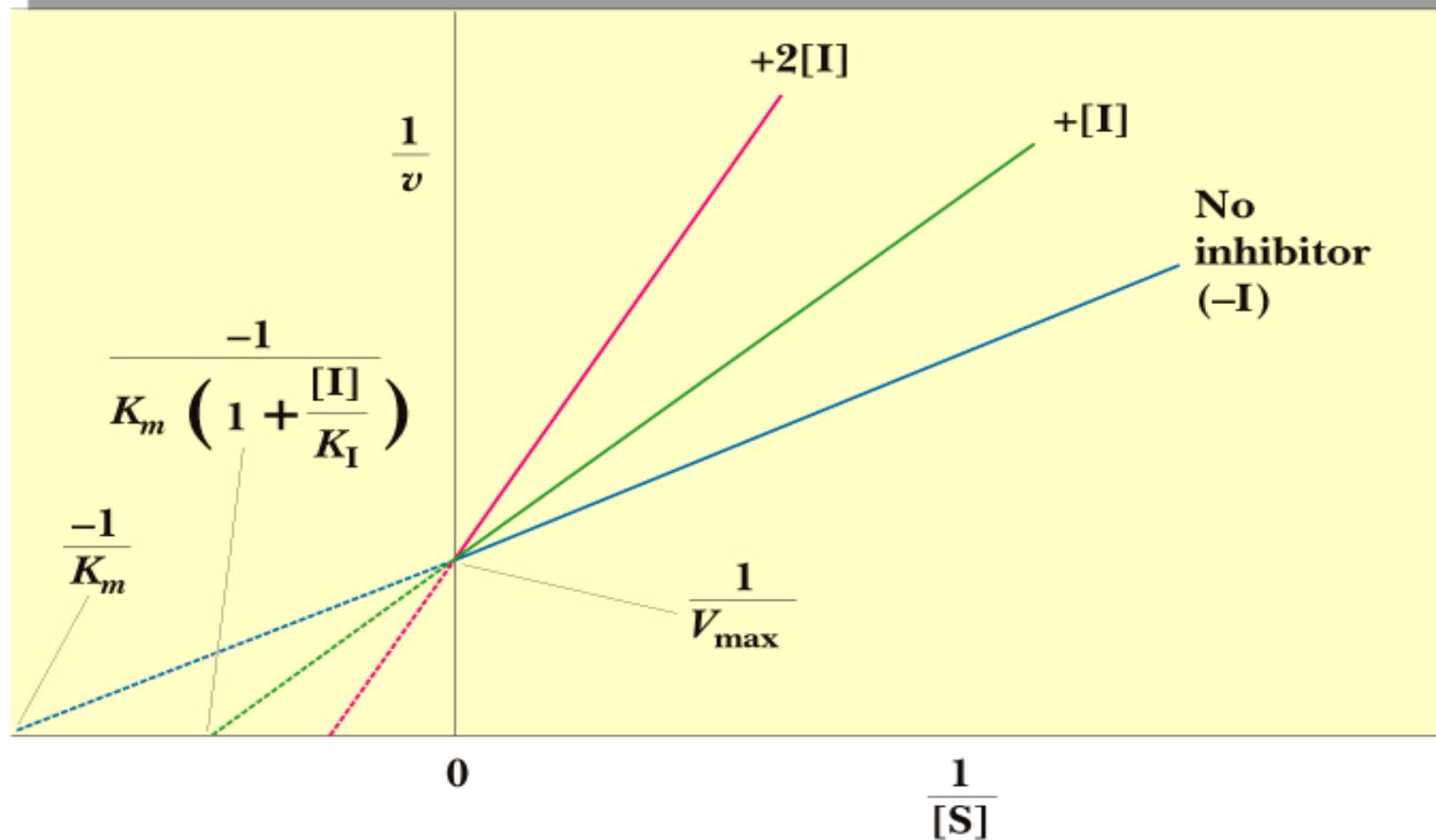


- I связывается с E также не в каталитическом центре, однако не со свободным E, а с комплексом ES, т.е. центр, связывающий I, становится доступным для I только после того, как свяжется S. Значения  $V$  и  $K_m$  при этом уменьшаются в одинаковой степени.
- Смешанное (частично неконкурентное) ингибирование, ↓  $V_{max}$  сочетается с изменением  $K_m$  (I модифицирует как связывание S, так и уменьшает  $V_{max}$ ).

# Влияние конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного ингибиторов на кинетику ферментативной реакции

Lineweaver-Burk plots showing the effects of uncompetitive, competitive, and noncompetitive inhibitors on the kinetics of enzyme-catalyzed reactions.





## **Значение изучения и использования в медицине ингибиторов**

- **I** дают информацию о строении АкЦ Е, о составе его функциональных групп и природе химических связей;
- применяются при изучении изоферментов, отличающихся различной чувствительностью к **I**;
- в основе действия некоторых токсинов и ядов – ингибирование Е (НСN – цитохромы, ФОС – холинэстеразу);
- многие лекарства – конкурентные **I** Е (аллопуринол – **I** ксантиноксидазы, дикумарол – **I**  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазы, аспирин – ЦОГ, сульфаниламиды – структурные аналоги ПАБК – конкурентные **I** Е, необходимого у микроорганизмов для синтеза фолиевой кислоты (ФК), прозерин – **I** холинэстеразы и др);
- **I** могут быть аналоги коферментов (аналог витамина ФК аминоптерин - антивитами́н –лечебный препарат).
- Активаторы Е (НСI - пепсин желудочного сока, желчные кислоты – панкреатическую липазу).

# Мультимолекулярные (мультиэнзимные) ферментные системы

- ассоциация E и коферментов в единый комплекс, имеет в составе разные E, катализирующие последовательные превращения какого-либо S. Особенности:
- прочность ассоциации E;
- промежуточные продукты передаются от одного АкЦ к другому, что делает работу мультиэнзимного комплекса эффективным.
- Примеры: ПДГ и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплексы (окислительное.декарбоксилирование ПВК и  $\alpha$ -кетоглутарата), а также синтетаза ВЖК.

# Субклеточная локализация ферментов

Е расположены в различных органеллах соответственно их функции. Различные отсеки (компартменты) клетки различаются по набору Е и метаболизму – компартиментализация метаболизма.

- в цитозоле (растворимая фракция) – Е гликолиза, пентозофосфатного пути распада глюкозы, активации АК, синтеза и распада гликогена, синтаза ВЖК и др;
- в митохондриях (МТХ) – обменные процессы, обеспечивающие клетку энергией, т.е. ферменты ЦТК, окислительного фосфорилирования, окисления ЖК, ГДГ, синтетаза  $\delta$ -АЛК и др;

# Субклеточная локализация ферментов

- Лизосомы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания, содержат 30 Е – в основном гидролазы: РНК-азу, эстеразы, протеазы. Лизосомальные Е участвуют в воспалительных процессах, повреждениях клеток и некоторых наследственных заболеваниях метаболизма;
- микросомальная фракция включает рибосомы и эндоплазматический ретикулум, содержит Е синтеза белков, холинэстеразу, церулоплазмин, глюкозо-6-фосфатазу,  $\gamma$ -глутамилтрансферазу и др;
- ядро – 40 ферментов, в том числе репликативный комплекс, РНК – полимеразу и др;
- клеточная (плазматическая) мембрана – ферменты транспорта веществ – транслоказы, аденилатциклаза (АЦ),  $\gamma$  - глутамилтрансфераза и др.

# Органоспецифические ферменты

Е, которые - только в одном-двух органах:

- **фруктозо 1-фосфаталядолаза, орнитинкарбамоилтрансфераза и уроганиназа – в печени;**
- **гистидаза – в печени и эпидермисе;**
- **трансамидиназа – в почках и поджелудочной железе;**
- **креатинкиназа – в сердечной и скелетной мышцах;**
- **кислая фосфатаза – в предстательной железе, малоактивна в др. органах и т.д.**

# Изоферменты

- **изоферменты - белки, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по первичной структуре, физико-химическим свойствам (молекулярной массой, сродству к S,  $V_{\text{макс}}$ ,  $K_m$ , ЭФ подвижностью, оптимуму рН и t, регуляторными свойствами), локализацией в клетке и органах.**
- **изоферменты – продукты экспрессии разных генов, т.е. различия между Е обусловлены генетически, а не вызваны посттрансляционными модификациями.**

# ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

- ПИРУВАТ + НАДН<sub>2</sub> ↔ ЛАКТАТ + НАД<sup>+</sup>
- ЛДГ - тетрамер из Н и М субъединиц, имеет 5 изоферментов.
- ЛДГ-1 НННН при ЭФ - с наибольшей скоростью к +  
(↑ при остром инфаркте миокарда)
- ЛДГ-2 НННМ
- ЛДГ-3 ННММ
- ЛДГ-4 НМММ
- ЛДГ-5 ММММ (↑ при заболеваниях печени)

# Лактатдегидрогеназа

Lactate  
Dehydrogenase  
Isozyme

Subunits

I<sub>1</sub> (↑ under myocardial infarction) HHHH

I<sub>2</sub> HHHM

I<sub>3</sub> HHMM

I<sub>4</sub> HMMM

I<sub>5</sub> MMMM

# Креатинкиназа

- Креатинкиназа (КК) катализирует реакцию:



имеет В и М протомеры.

3 изофермента:

- $\text{КК}_1$  ВВ – мозг
- $\text{КК}_2$  МВ – сердце (↑ при инфаркте миокарда)
- $\text{КК}_3$  ММ – скелетная мускулатура (↑ при травмах мышц и мышечных дистрофиях)

# Определение активности ферментов

- при оптимальных условиях:

- pH
- $t^{\circ}$
- полном насыщении E субстратом.

$V$  ферментативной реакции пропорциональна  $[E]$ .

О скорости E реакции судят или по скорости убыли S или по скорости образования P реакции.

# Единицы активности ферментов

■ Международная единица активности (МЕ или Е или U (unit) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин (мкмоль/мин):

$$1 \text{ ME} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}}$$

$$\text{Активность в МЕ} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

# Единицы активности ферментов

■ В системе единиц СИ – **катал (кат)** - количество Е, которое превращает 1 моль S за 1 секунду (1 моль/с).

$$n \text{ катал} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата}}{\text{Время (с)}}$$

■ **Удельная активность Е** — число единиц ферментативной активности на 1 мг белка (мкмоль/мин/мг)

$$\text{Уд. ак} = \frac{\text{Количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)} \times \text{масса белка (мг)}}$$

# Проблемы медицинской энзимологии

3 направления:

Энзимопатология,  
Энзимодиагностика,  
Энзимотерапия.

- **Энзимопатология** (развитие некоторых болезней — энзимопатий, напр. галактоземии, фенилкетонурии, связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза даже одного Е; в основе патогенеза многих соматических заболеваний — нарушение регуляции и синтеза Е).

# Энзимодиагностика

- **Энзимодиагностика — 2 пути :**
- **диагностика заболеваний по активности Е в биологических жидкостях,**
- **использование Е как аналитических реагентов в клинико-диагностических лабораториях для измерения концентрации глюкозы, ТАГ, ХС, мочевины в крови.**

# Диагностика заболеваний по активности Е в биологических жидкостях

В её основе –

1. наличие органоспецифических Е;
2. активность органоспецифических Е в крови или моче в норме отсутствует или очень низка;
3. при повреждении клеток соответствующего органа активность Е в крови или моче резко повышается. Причины:

- ❑ нарушение проницаемости мембран клеток (воспалительный процесс)
- ❑ нарушение целостности клетки (при некрозе).

Появление в плазме Е, имеющих ЦП локализацию – при воспалительном процессе, при глубоких повреждениях (некрозе) — МТХ или ядерные белки.

# Ферменты крови Энзимодиагностика

- ферменты **секреторные** (ферменты свёртывающей системы крови; ХЭ),
- **экскреторные** (ЛАП, ЩФ и др.)
- **индикаторные = органоспецифические** (ЛДГ, АсАТ, АлАТ и др.)

Изоферменты-олигомеры, генетически детерминированные различия п/п цепей

Изоформы ферментов или изоферментов результат посттрансляционной модификации

Катод	КК-ММ/КК-3/			КК-МВ /КК-2/		КК-ВВ/КК-1/	Анод
	3,3	3,2	3,1	2,2	2,1	1,1	
	С	В	А				

# Диагностическое значение ферментов

Ферменты	Примеры использования
Лактатдегидрогеназа (изофермент ЛДГ-1)	Инфаркт миокарда
Аспартат- аминотрансфераза (АСТ)	Инфаркт миокарда
Аланин- аминотрансфераза (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
$\alpha$ -Амилаза	Заболевания поджелудочной железы

**Использование ферментов как аналитических реагентов в  
клинико-диагностических лабораториях для измерения  
концентрации глюкозы, ТАГ, ХС, мочевины в крови.**

<b>Глюкозооксидаза</b>	<b>Определение концентрации глюкозы в крови</b>
<b>Холестеролоксидаза</b>	<b>Определение холестерина в крови</b>
<b>Липаза</b>	<b>Определение триацилглицеринов в крови</b>
<b>Уреаза</b>	<b>Определение мочевины в крови</b>

# Энзимотерапия

- **Энзимотерапия - использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов Е) в качестве лекарственных средств.**

## **Ферменты как лекарственные препараты**

<b>Пепсин</b>	<b>Нарушение переваривания белков в желудке, нарушение синтеза или секреции пепсина</b>
<b>Трипсин, химотрипсин</b>	<b>Лечение гнойных ран</b>
<b>Стрептокиназа, урокиназа</b>	<b>Предотвращение тромбообразования при пересадке органов и других операциях</b>
<b>Гиалуронидаза</b>	<b>Рассасывание рубцов</b>
<b>Аспарагиназа</b>	<b>Лечение некоторых злокачественных образований</b>
<b>Нуклеазы (ДНКаза)</b>	<b>Вирусный конъюнктивит, ринит, гнойный бронхит</b>
<b>Уреаза</b>	<b>Удаление мочевины из организма в аппаратах «искусственная почка»</b>

## **Иммобилизованные ферменты**

- Фермент, ковалентно пришитый к любому органическому или неорганическому полимерному носителю – иммобилизованный. Иммобилизация Е обеспечивает высокую специфичность их действия, повышение стабильности. Иммобилизованные Е используются в промышленности (в том числе фармацевтической).

# Регуляция активности ферментов

- Изменение скорости ферментативных реакций в клетке – основной механизм регуляции метаболизма, а также роста, развития клетки и её ответа на изменение окружающей среды.
- В регуляции метаболизма играют роль:
  - Е одной из начальных стадий превращения (обычно необратимой) или Е, находящийся в местах разветвлений метаболических путей;
  - Е, катализирующие самые медленные (лимитирующие) стадии. Такие Е – ключевые ферменты.
- Существуют 3 основных способа контроля скорости ферментативной реакции:
  - контроль активности фермента;
  - контроль количества фермента.
  - доступностью молекул S и кофермента.

# Регуляция активности ферментов

Активность ферментов регулируется:

- путем частичного (ограниченного) протеолиза;
- аллостерической регуляцией;
- путем ковалентной модификации (фосфорилирование – дефосфорилирование);
- с помощью белок-белковых взаимодействий;
- на генетическом уровне.

# Частичный (ограниченный) протеолиз

- Профермент → Активная форма E + пептид  
(АкЦ не сформирован)
- Это необратимая активация E с помощью протеолитических E с участием активаторов.
- Решающее значение для изменения конформации имеет изменение первичной структуры.

# Частичный (ограниченный) протеолиз

**Профермент** → **Активная форма Е + пептид**  
(АкЦ не сформирован)  
**энтеропептидаза**

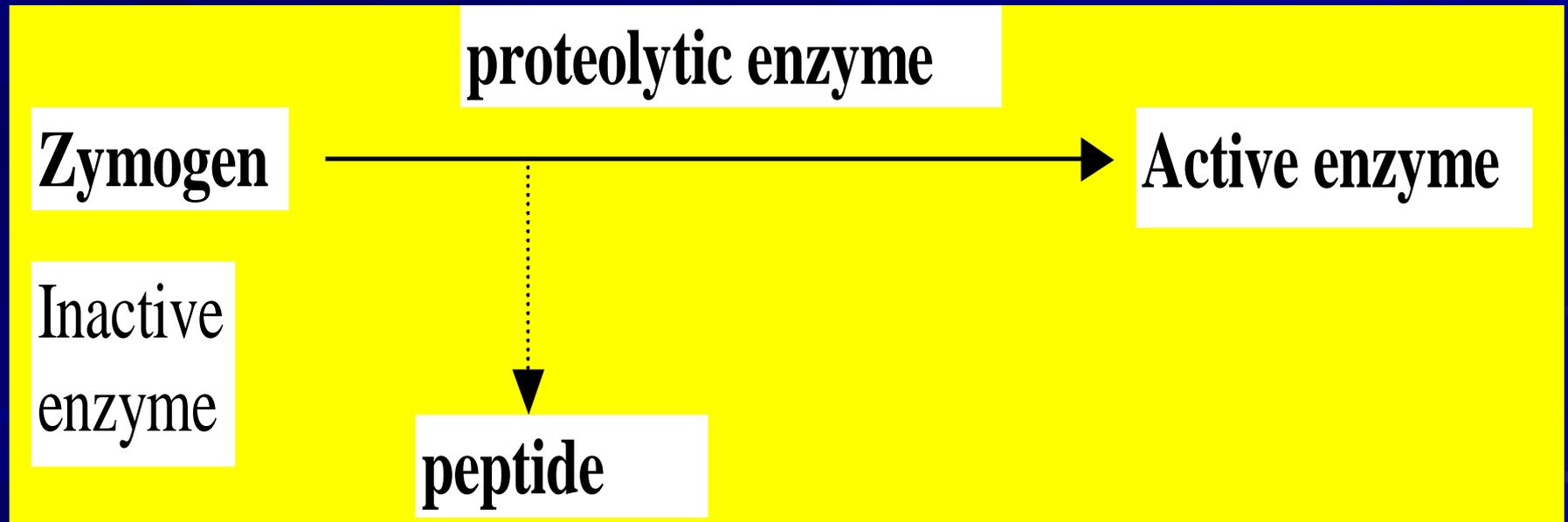
**Трипсиноген** → **трипсин + гексапептид**  
(зимоген, профермент) (активный фермент)

## Примеры:

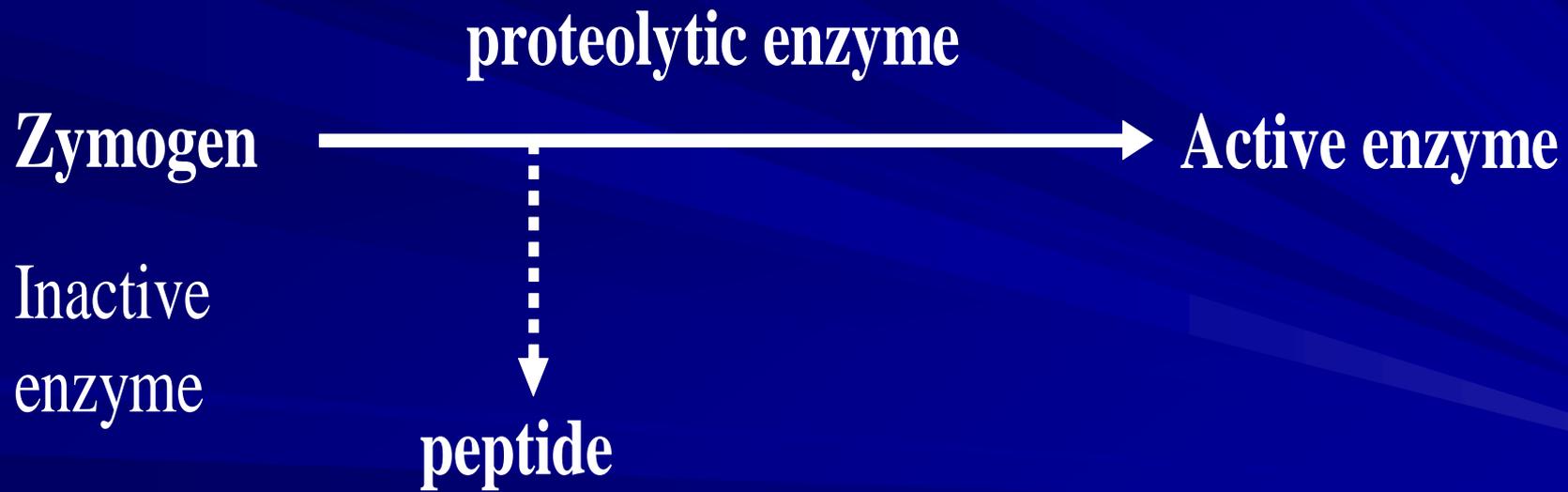
- пепсин, трипсин, химотрипсин и др. протеазы;
- белки свертывания крови: тромбин (из протромбина), фибрин (из фибриногена), плазмин (из плазминогена).

# Частичный (ограниченный) протеолиз

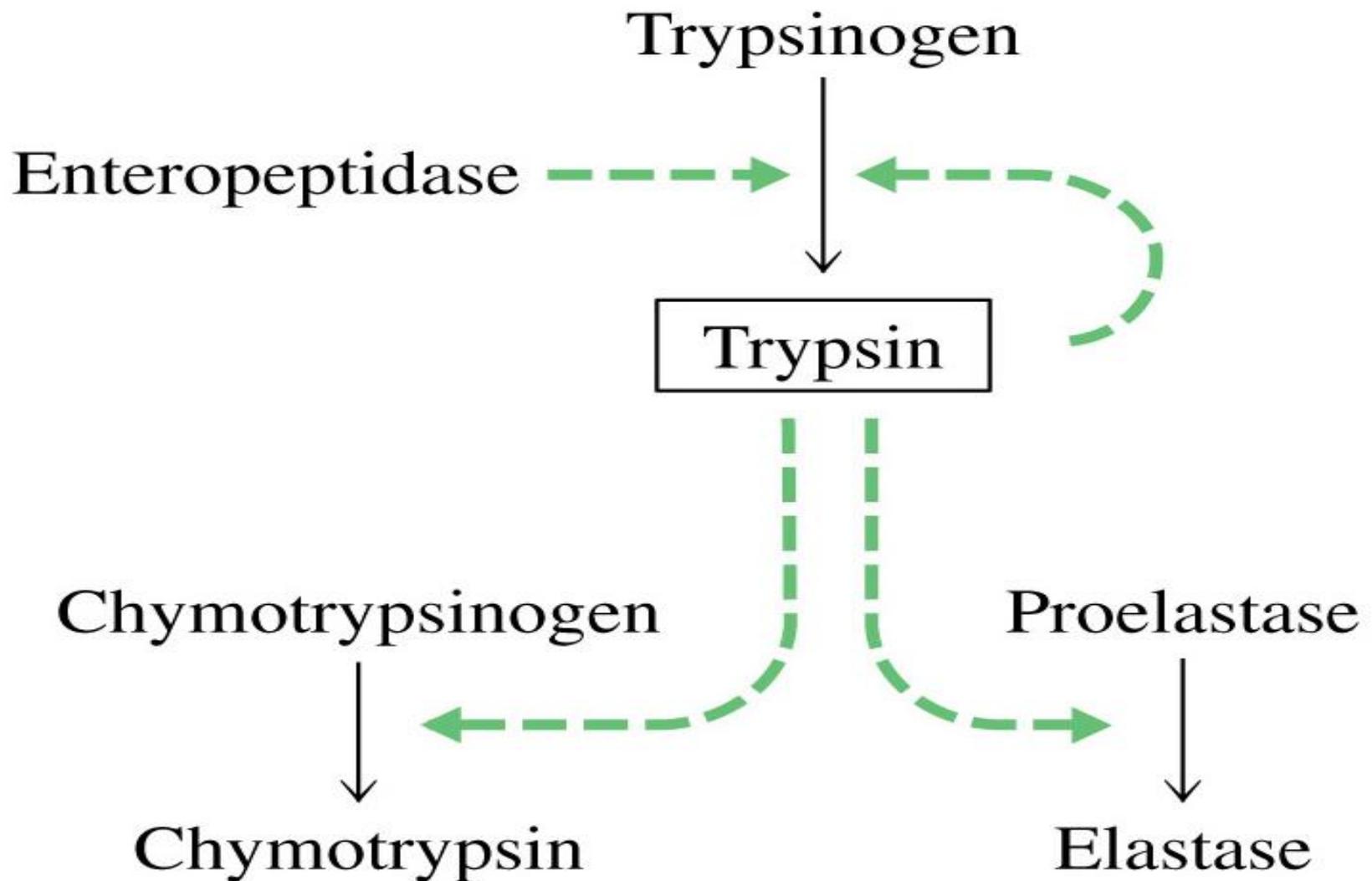
- Профермент → активная форма фермента + пептид



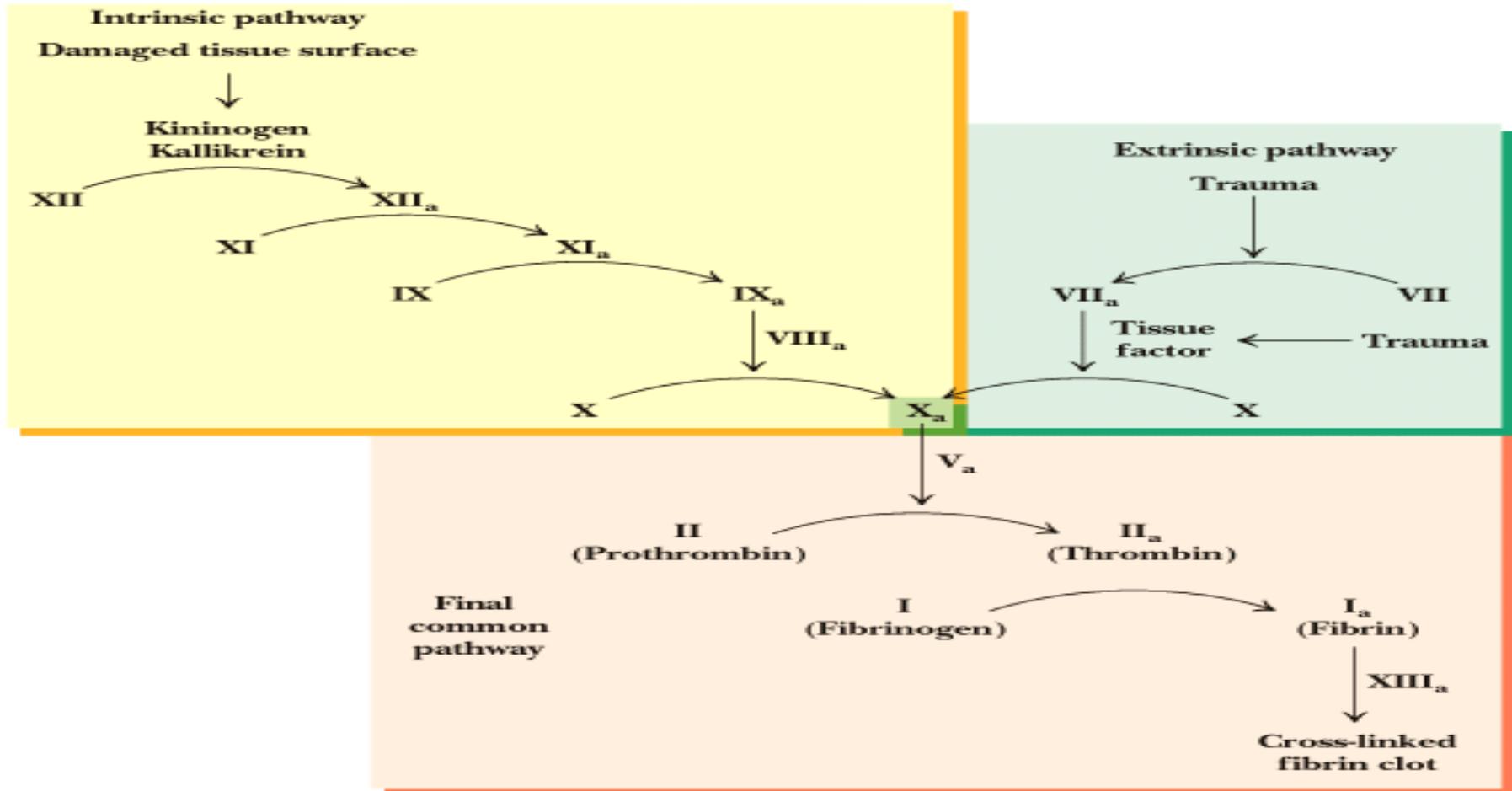
# Частичный (ограниченный) протеолиз



# Частичный протеолиз



# Частичный (ограниченный) протеолиз БЕЛКОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ



# Алlostерическая регуляция

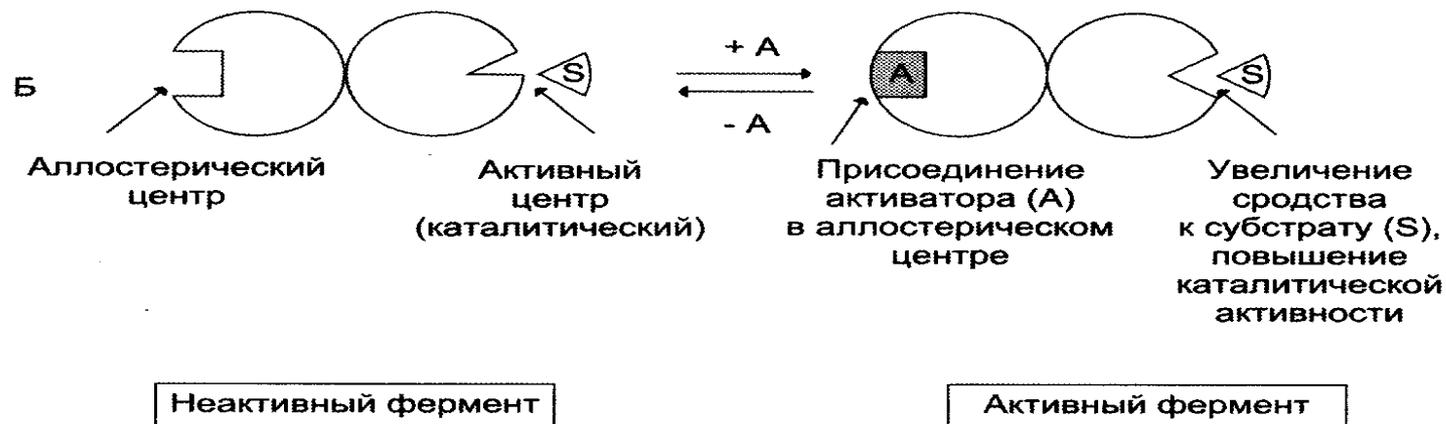
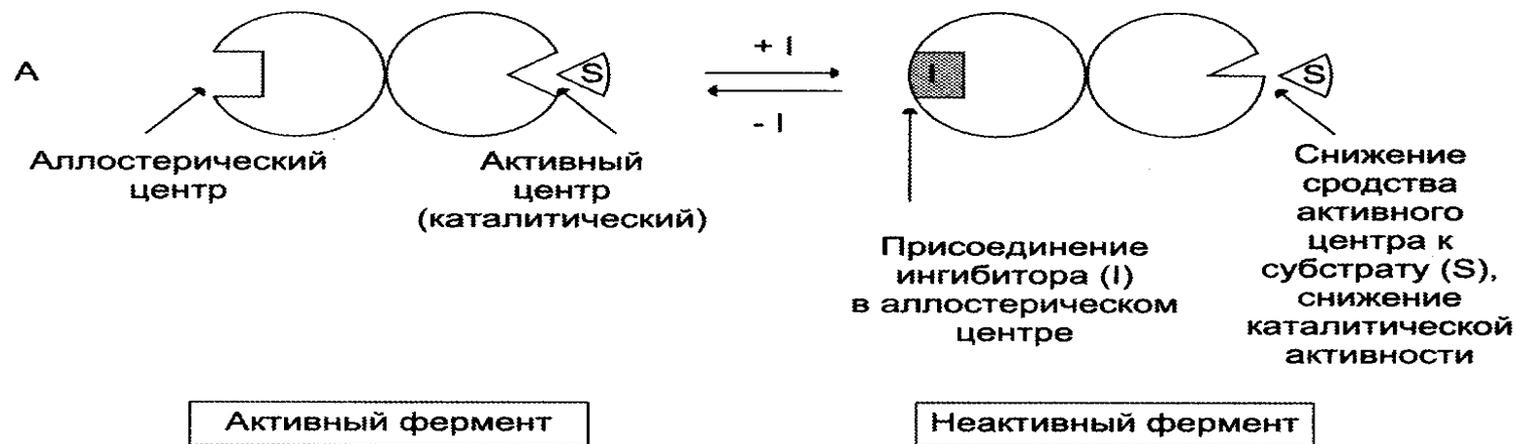
## Особенности строения и функционирования алlostерических ферментов:

- состоят из нескольких субъединиц;
- имеют алlostерический центр, пространственно удаленный от активного центра;
- протомер, на котором алlostерический центр – регуляторный, каталитический протомер содержит активный центр;
- эффектор, или модулятор (положительный эффектор – активатор или отрицательный эффектор – ингибитор) связываются в алlostерическом центре E;

## **Алlostерическая регуляция**

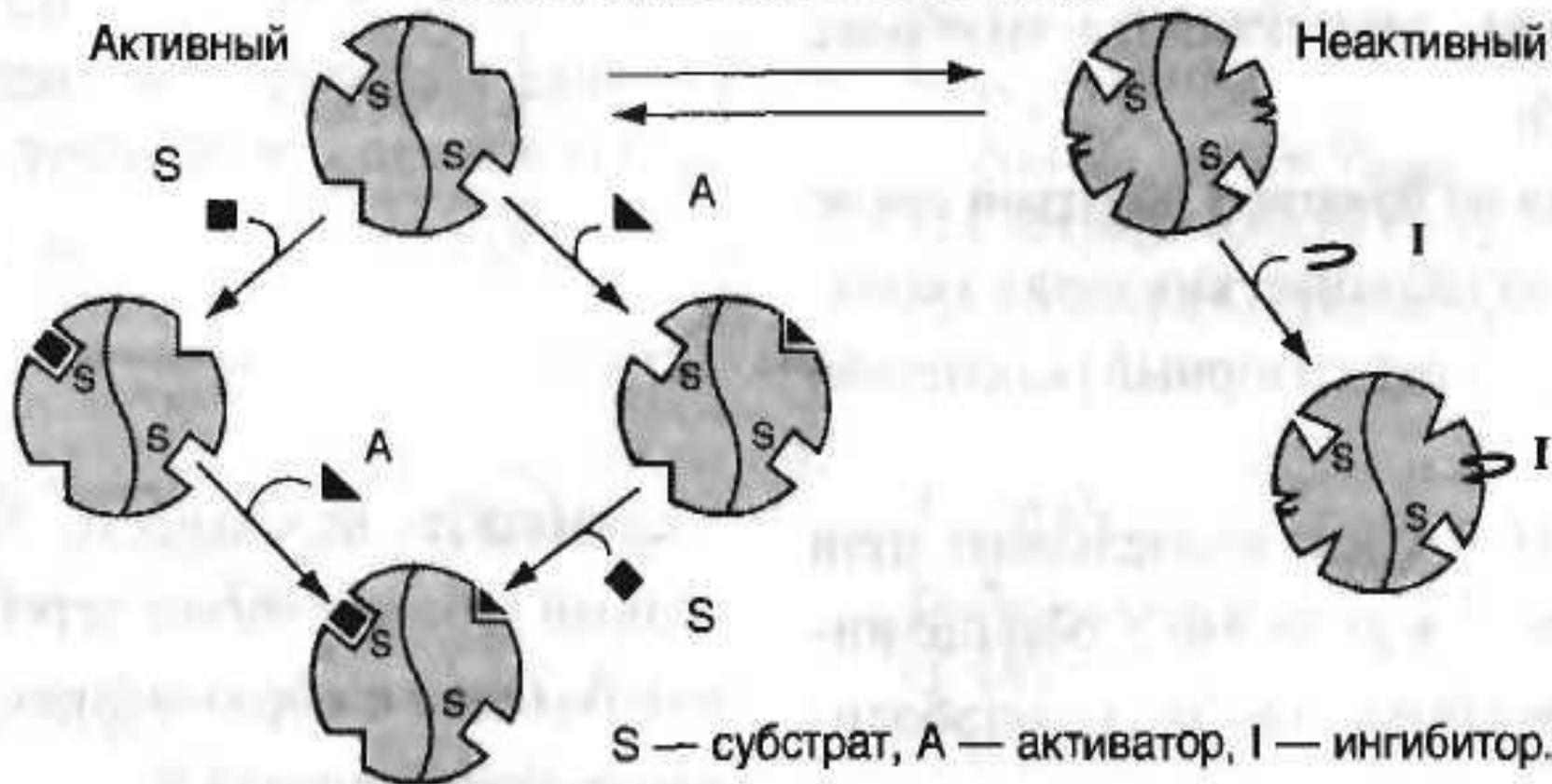
- присоединение эффекторов к алlostерическому центру вызывает конформационные изменения АкЦ и изменение активности фермента;
- регуляция алlostерических E обратима;
- алlostерические ферменты катализируют ключевые реакции данного метаболического пути.

# Аллостерическая регуляция ферментов



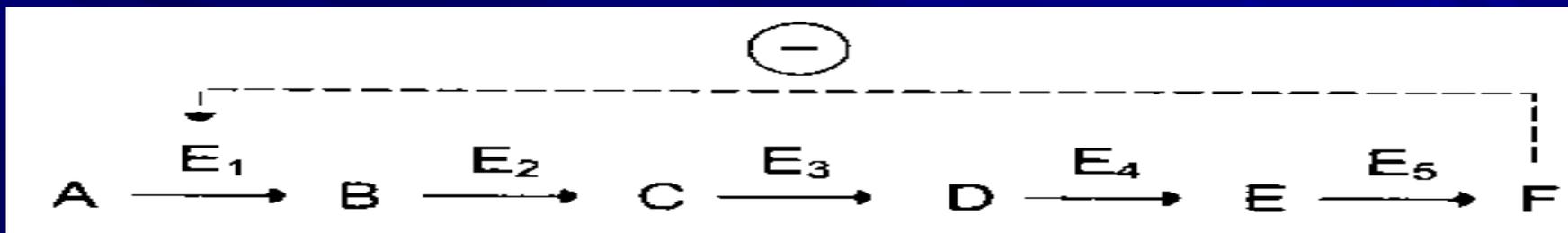
# Аллостерическая регуляция ферментов

Модель аллостерического фермента



# Ингибирование по принципу обратной связи (ретроингибирование)

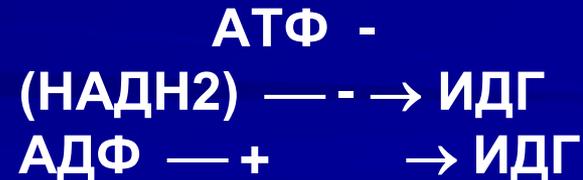
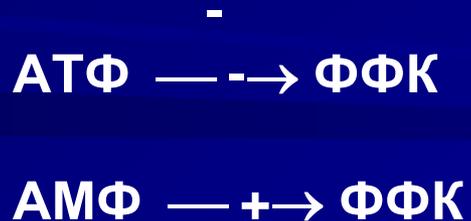
- в анаболических процессах. Конечный Р метаболической цепи, связываясь с АлЦ ключевого фермента E<sub>1</sub>, ингибирует его и всю метаболическую цепь (ингибирование по принципу обратной связи, или ретроингибирование).



- Примеры: у *E. coli* L-изолейцин подавляет активность треониндегидратазы (1 E на пути его биосинтеза);
- ЦТФ ингибирует аспартаткарбамоилтрансферазу (АКТ-азу) — 1 E на пути его биосинтеза, а АТФ - начальный участник реакции, активирует АКТ-азу;
- Δ-АЛК-синтаза – ключевой E (первый E) на пути синтеза гема, ингибируется гемом.

# Аллостерическая регуляция

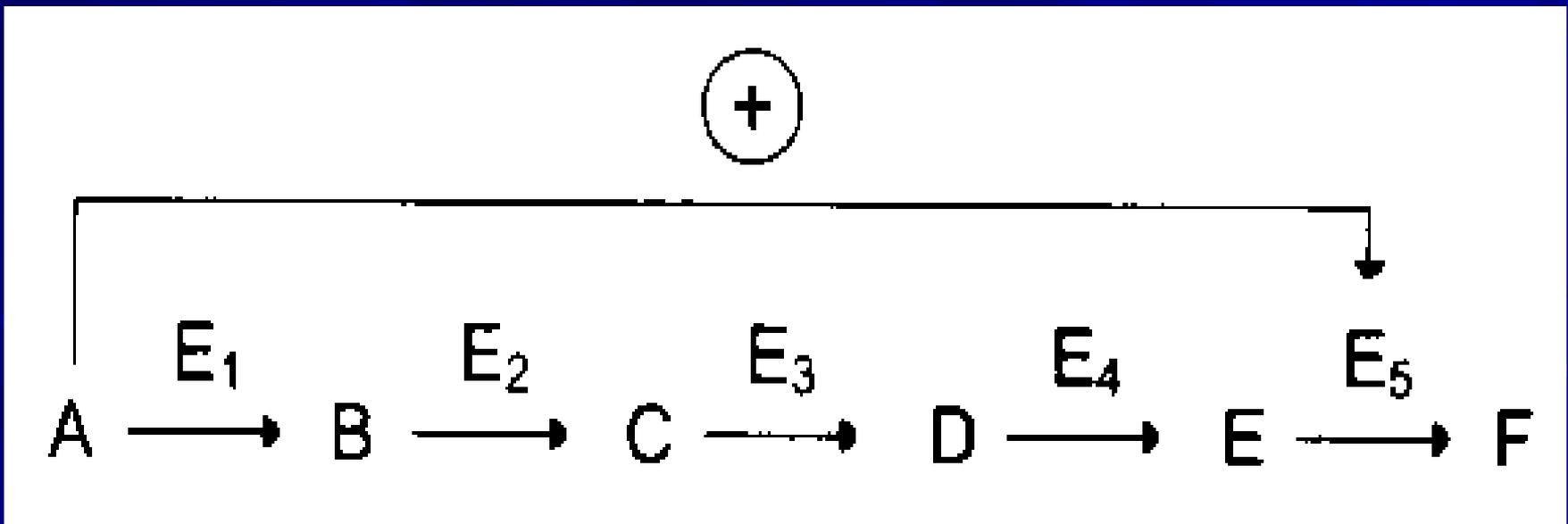
- в катаболических процессах. В случае накопления макроэргического соединения АТФ в клетке — ингибирование метаболических путей, обеспечивающих образование энергии.
- для координации амфиболических процессов (одновременно анаболических и катаболических).
- АТФ и АДФ — аллостерические эффекторы, действующие как антагонисты.
- Так, в гликолизе ФФК ингибируется АТФ и активируется АМФ.
- В ЦТК ИДГ ингибируется АТФ и НАДН<sub>2</sub>, а активируется АДФ.



## Исходные вещества как активаторы ключевых E

■ Активации подвергаются E, катализирующие ключевые реакции заключительных этапов метаболического пути.

*Пример:* глюкозо-6-фосфат (первый метаболит), являющийся предшественником гликогена, активирует гликогенсинтетазу - активация предшественником – положительная связь.



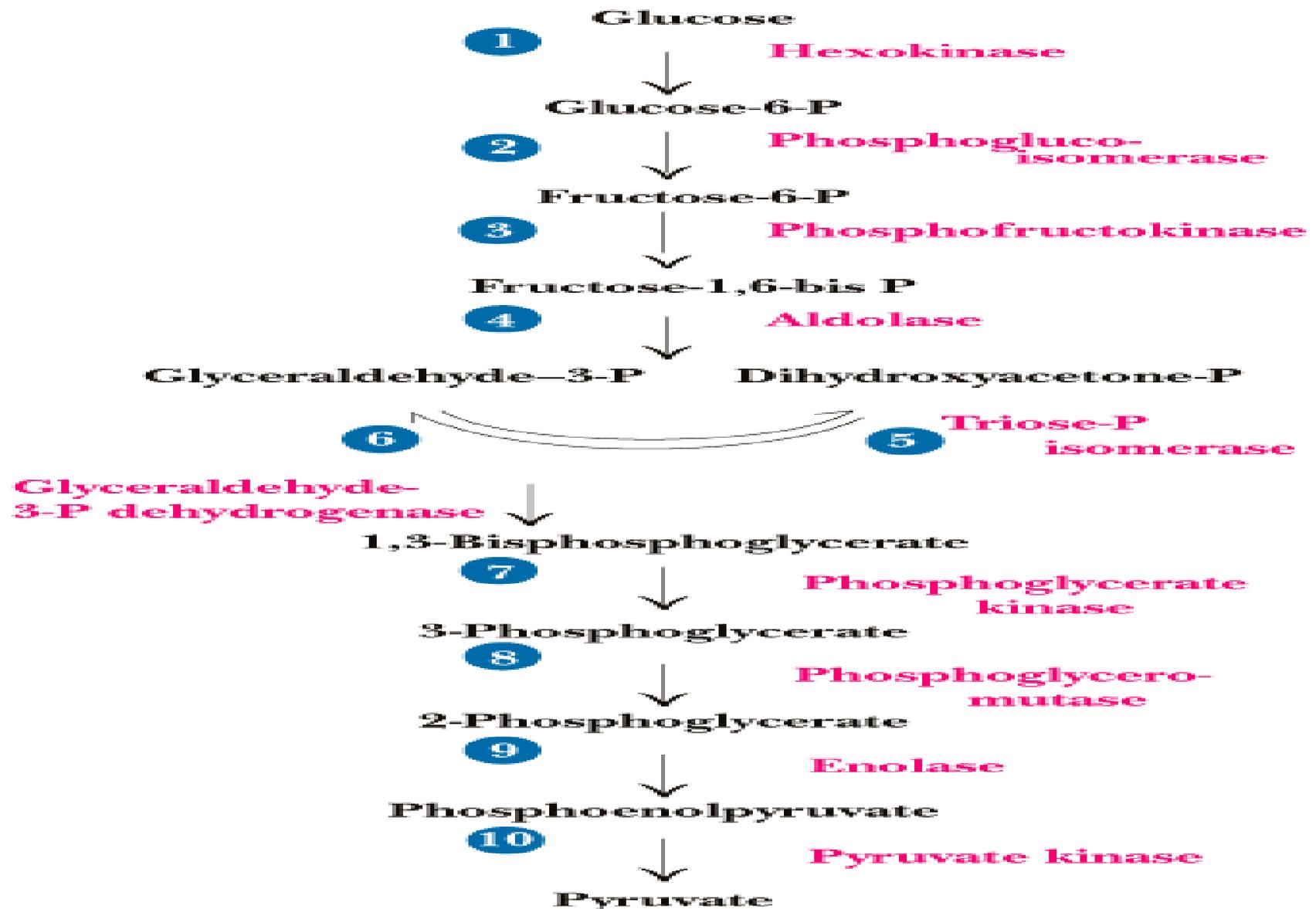
# Аллостерическая регуляция гликолиза

- При катаболических процессах – накопление АТФ приводит к ретроингибированию аллостерических ферментов фосфофруктокиназы и пируваткиназы.
- При образовании большого количества фр-1,6-бисфосфата – аллостерическая активация пируваткиназы.

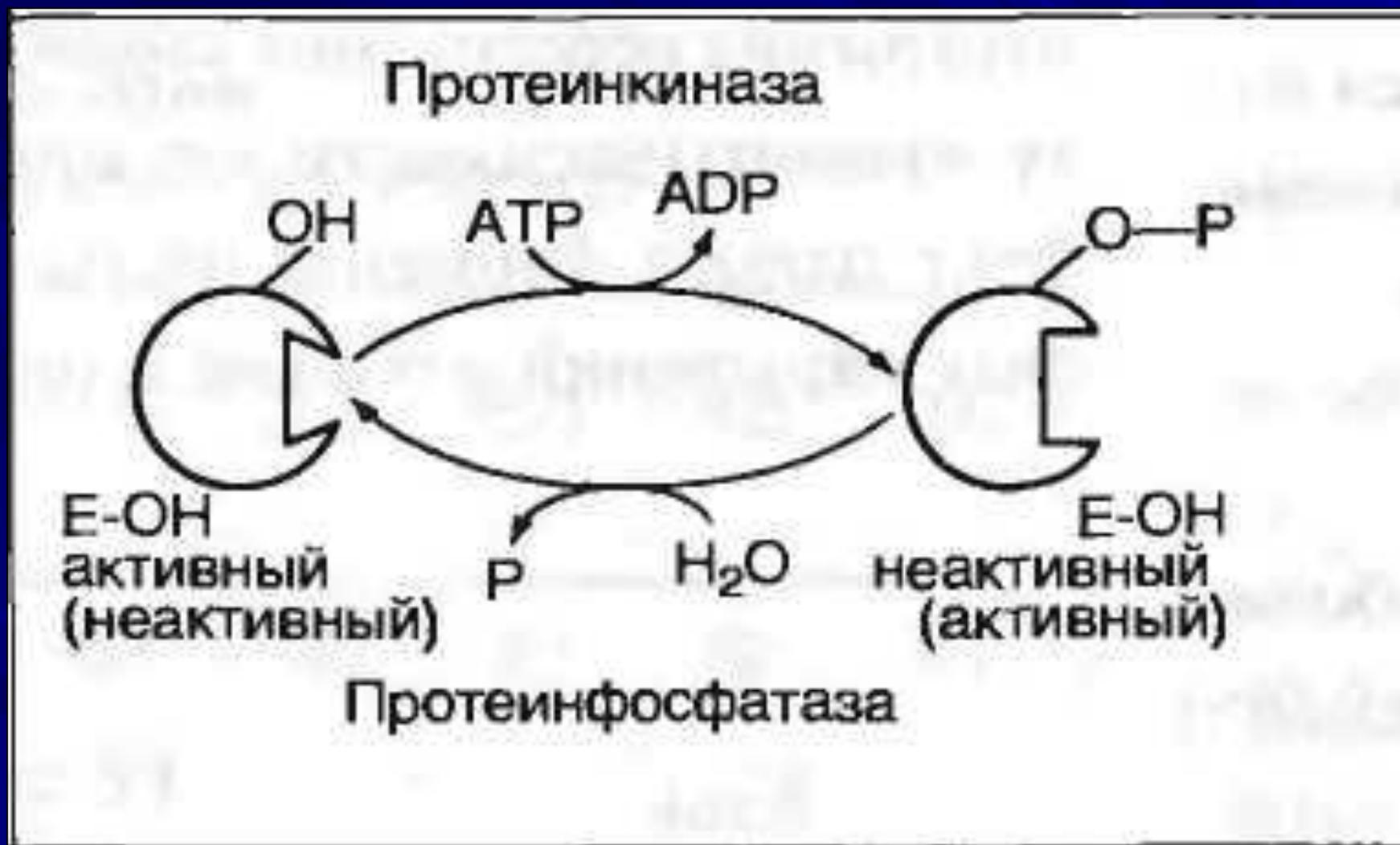
Т.о. осуществляется положительная и отрицательная регуляция катаболизма глюкозы.

- Часто в роли аллостерического активатора – S. Конечные P метаболического пути – часто ингибиторы аллостерических ферментов.

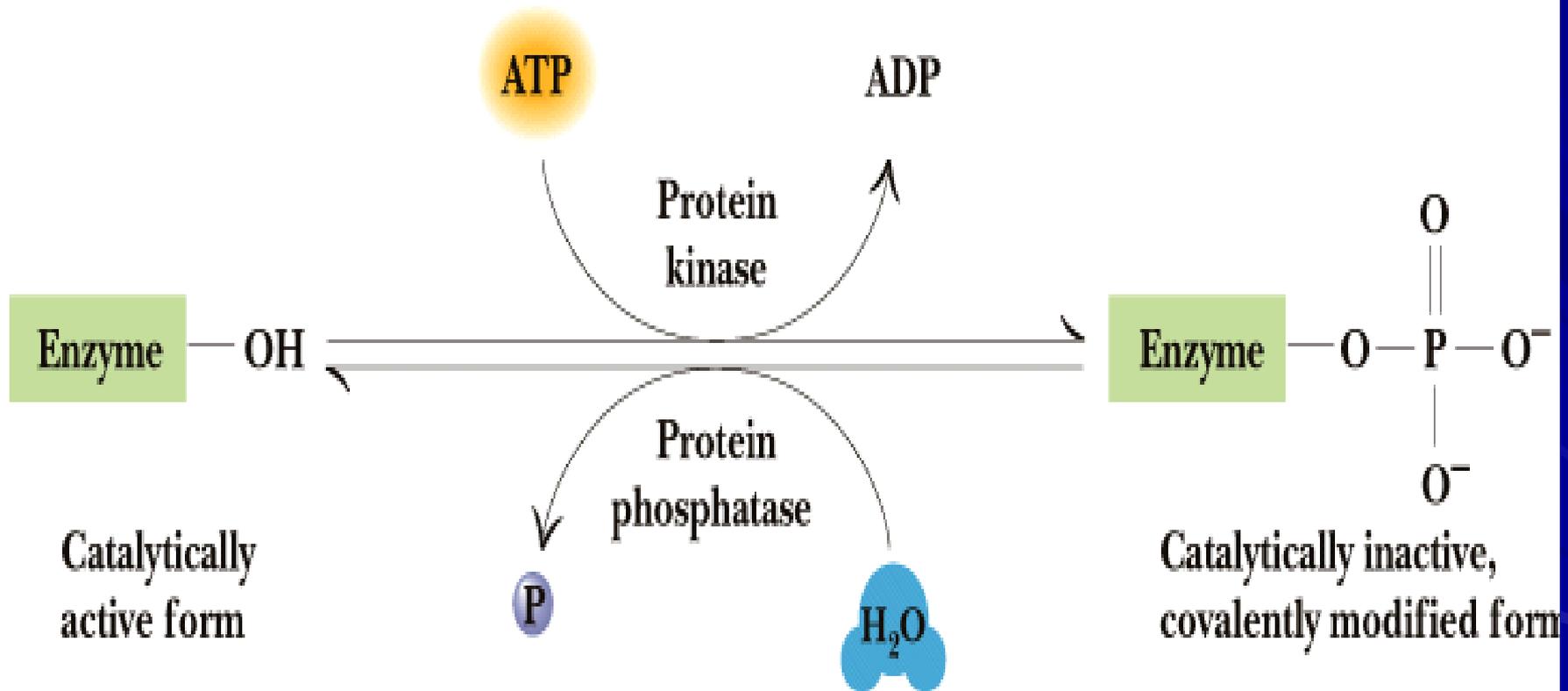
# Схема гликолиза



# Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования



# Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования



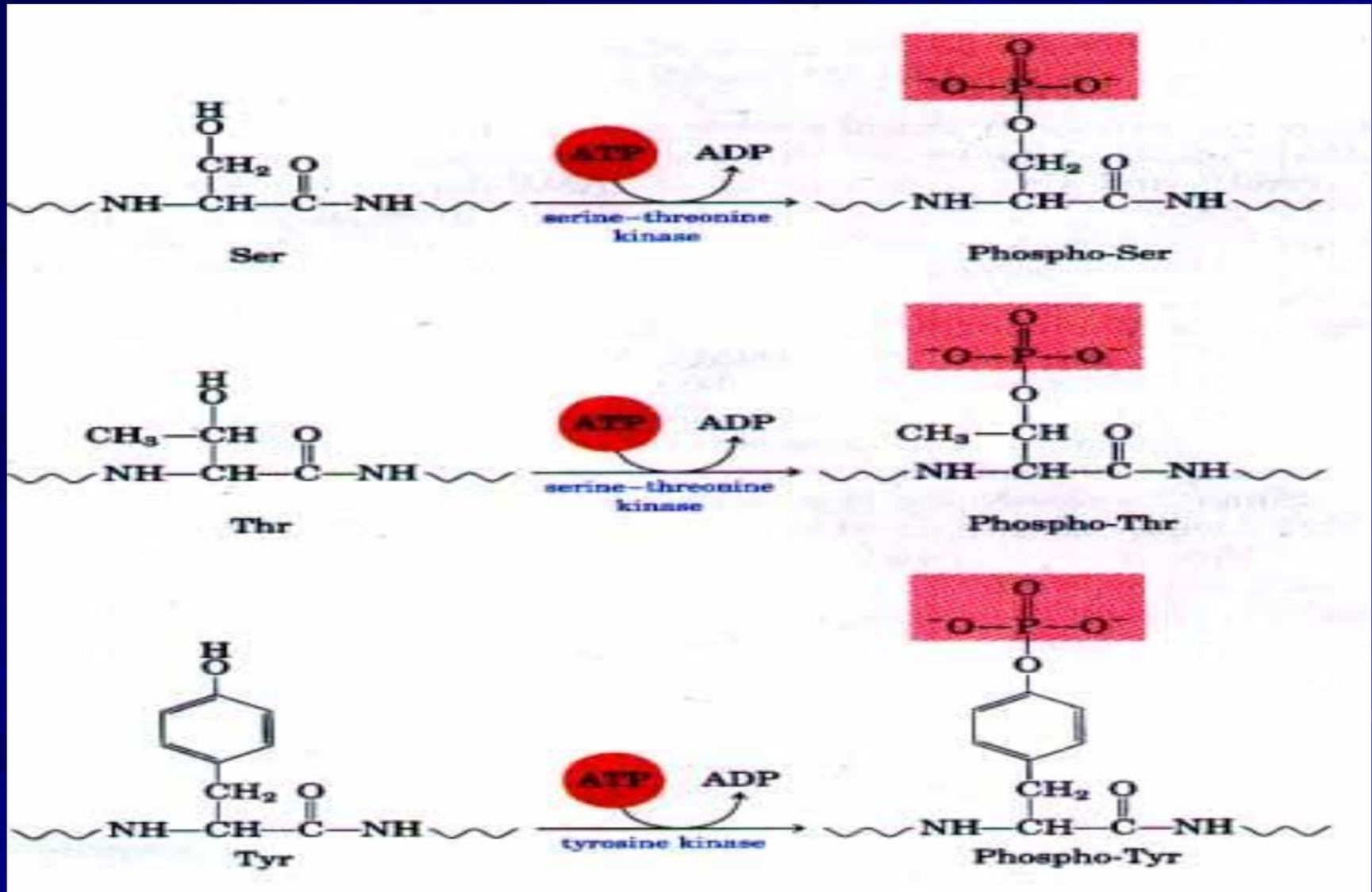
## Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования

- Е, катализирующие фосфорилирование белков - протеинкиназы (ПК, АТФ-зависимые). Белки фосфорилируются по Сер, Тре или Тир (серин-треонинкиназы и тирозинкиназы). Е обратной реакции – протеинфосфатаза.
- Протеинкиназы могут быть субъединицей мембранного R (напр. Тир-ПК R инсулина), активность которой регулируется гормоном. Другая группа ПК — ПК, регулируемые вторичными посредниками (цАМФ, цГМФ, ИФ<sub>3</sub>, ДАГ, Са<sup>2+</sup>).

## Ковалентная модификация ферментов путем фосфорилирования-дефосфорилирования

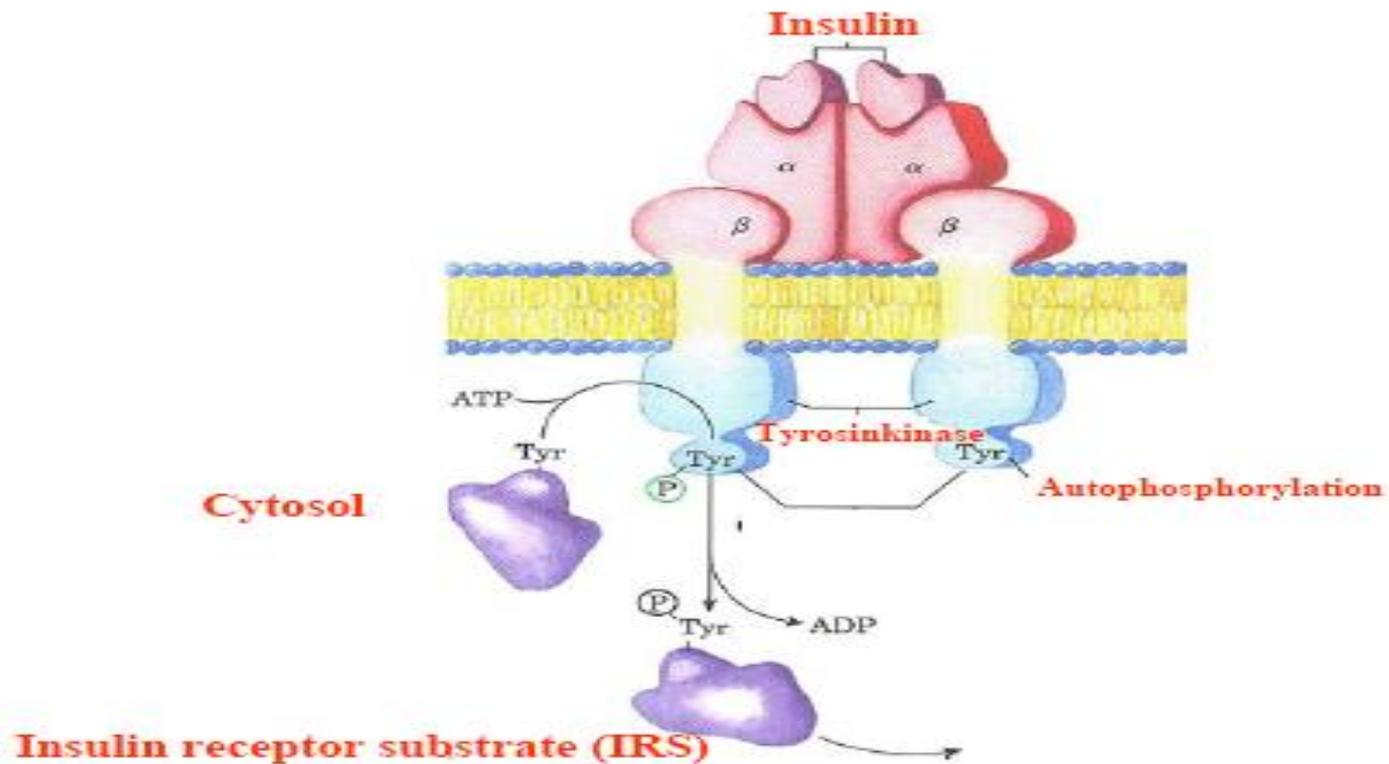
- цАМФ — активатор ПК А;
- цГМФ — активатор ПК G;
- ИФ<sub>3</sub> ↑ внутриклеточную [Ca<sup>2+</sup>];
- комплекс ДАГ с Ca<sup>2+</sup> активирует ПК С;
- комплекс Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин — активатор Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимой ПК.

# Ковалентная модификация ферментов



# Строение рецептора инсулина, содержащего тирозинкиназные домены

## Model of insulin receptor



# Ковалентная модификация E

- Примеры E, у которых E - O - P активны:

гликогенфосфорилаза,  
киназа фосфорилазы,  
ТАГ-липаза и др;

- E, у которых E – OH активны:

гликогенсинтетаза,  
ацетил-КоА карбоксилаза,  
ГМГ-КоА-редуктаза и др.

# Регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий

2 механизма активации:

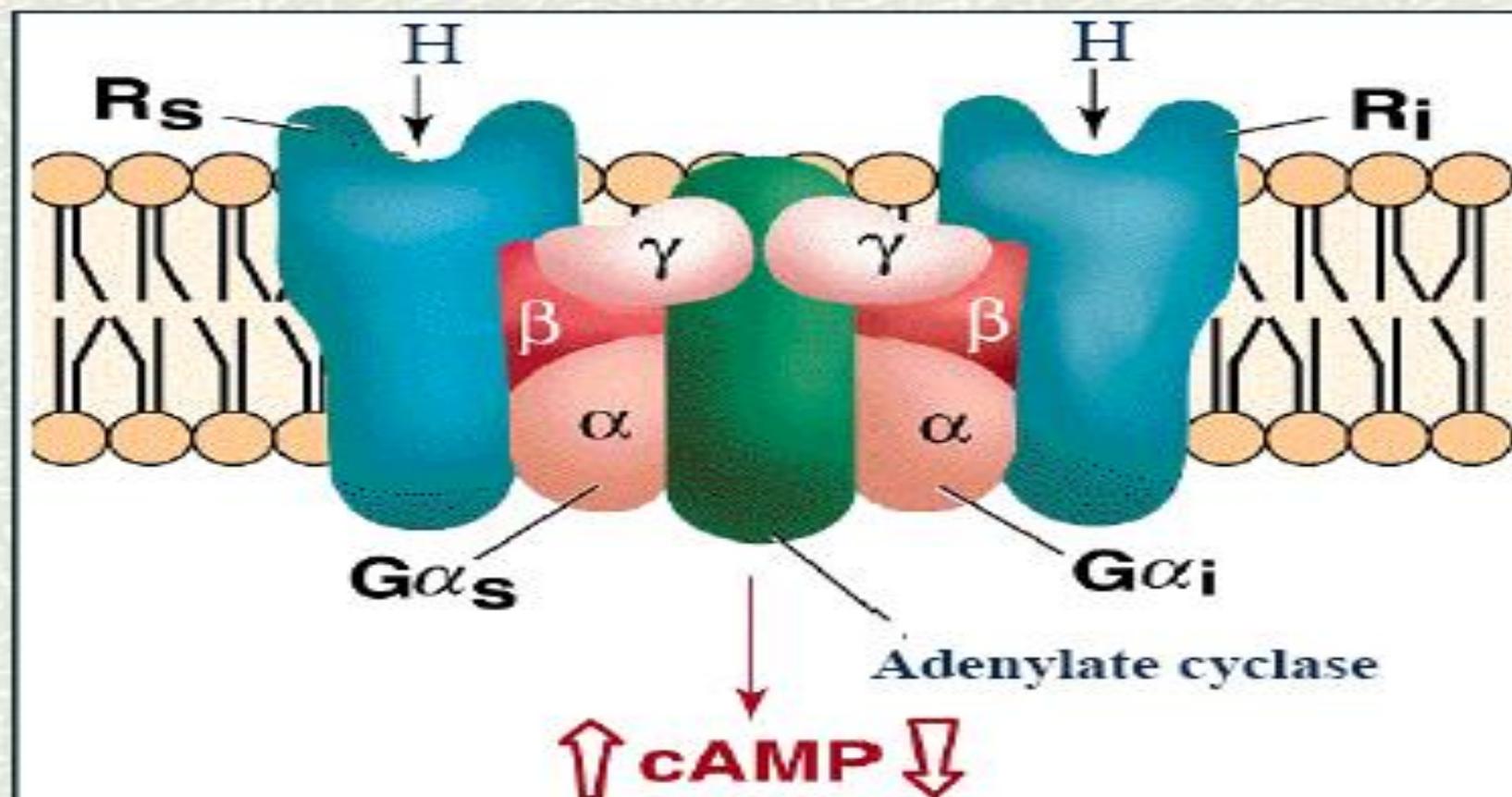
- активация в результате присоединения регуляторных белков.
- ассоциация или диссоциация протомеров E.

## Активация E в результате присоединения регуляторных белков на примере АЦ

- АЦ функционирует в мембране в комплексе с R гормона и с G-белком. G-белок (ГТФ-связывающий белок) – олигомерный белок ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -субъединицы).  $\alpha$ -субъединица имеет центр связывания и расщепления ГТФ. При отсутствии гормонального сигнала G-белок связан с ГДФ. При связывании G с R  $\rightarrow$  изменение конформации G-белка,  $\downarrow$  его сродства к ГДФ и  $\uparrow$  сродства к ГТФ. Присоединение ГТФ  $\rightarrow$  конформационные изменения в G-белке и диссоциация его на  $\alpha$ -субъединицу ( $\alpha$ -ГТФ) и димер  $\beta$ ,  $\gamma$ .  $\alpha$ -ГТФ имеет сродство к АЦ, его присоединение активирует АЦ. Т.о.,  $\alpha$ -ГТФ – регуляторный белок.

# Активация в результате присоединения регуляторных белков. G-белки

## G-proteins



# Рецепторы, действующие через G-белки

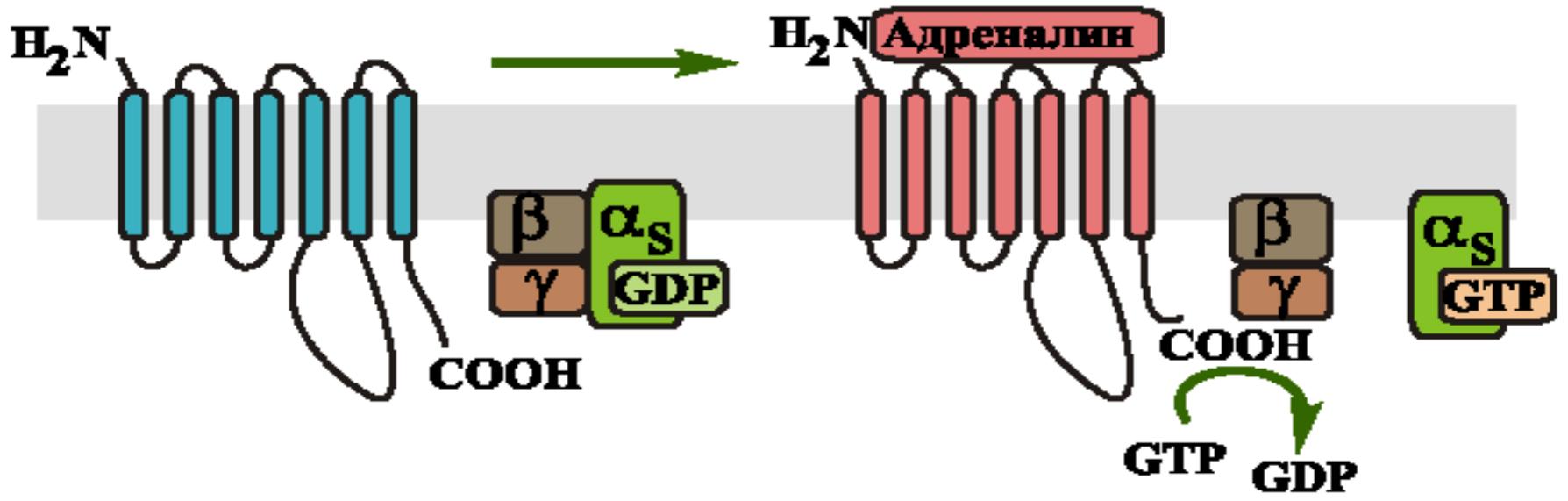
Рецепторы внеклеточных сигналов

Рецепторы, действующие через G-белки

$\beta$  адренергический рецептор:

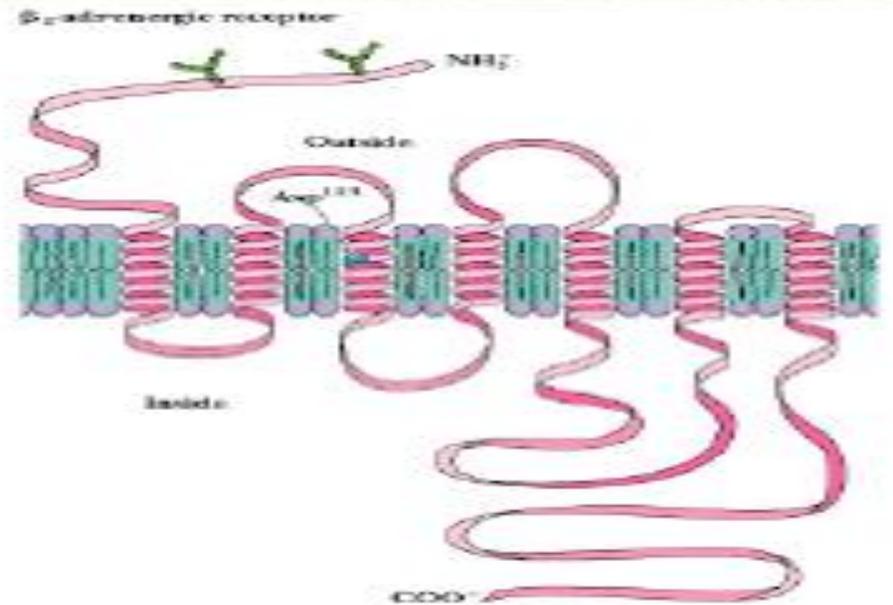
$\beta_1$  - учащение частоты сокращений сердечной мышцы

$\beta_2$  - релаксация гладкой мускулатуры бронхов

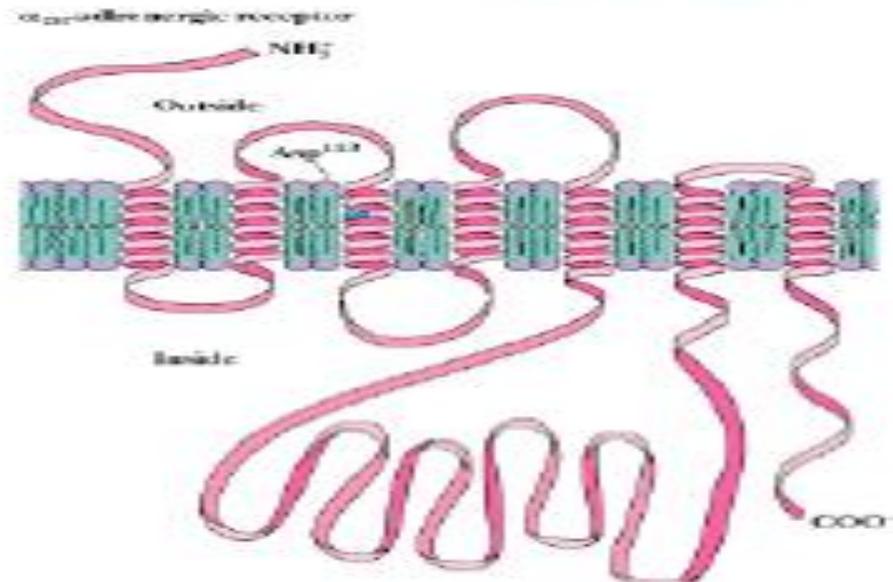


# Структура мембранного рецептора

$\beta_2$  -adrenergic receptor



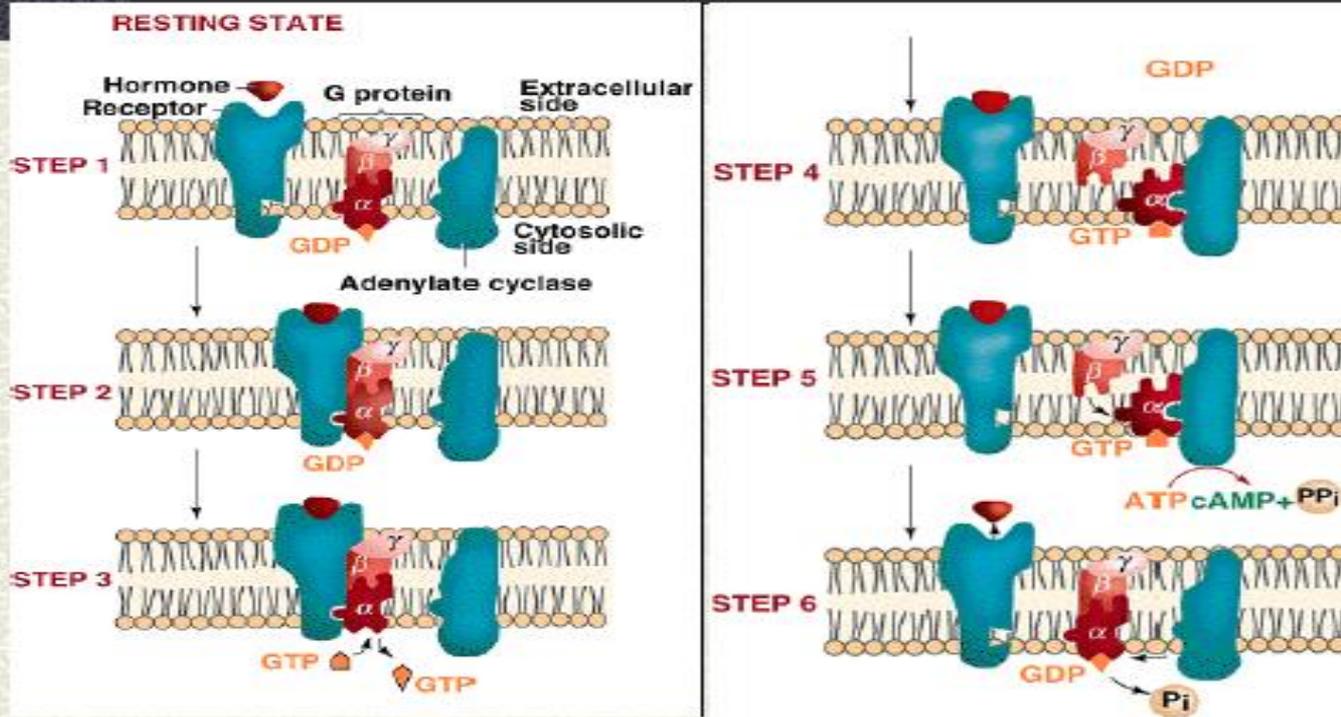
$\alpha_2$  -adrenergic receptor



# Активация E в результате присоединения регуляторных белков на примере АЦ.

## Роль G-белков в передаче гормонального сигнала

### Hormonal signal transduction mediated by G-protein



## Характеристика G-белков

- *G-белки* ассоциированы с рецепторами на цитозольной стороне мембраны, осуществляют связь между R и АЦ (АТФ  $\xrightarrow{\text{АЦ}}$  цАМФ) или ФЛ-азой С (ФИФ<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{ФЛ-аза С}}$  ИФЗ + ДАГ).
- *G-белок* (ГТФ-связывающий белок) способен связывать гуаниловые нуклеотиды: ГТФ или ГДФ.
- G- белок имеет 2 типа белков G<sub>s</sub> и G<sub>i</sub> , проявляющих соответственно активаторную и ингибиторную активность.
- *G-белок –гетеротример*, — три субъединицы: α, β и γ. α-субъединица связывает гуаниловые нуклеотиды (ГДФ или ГТФ).
- Гормон-рецепторный комплекс сообщает G-белку способность заменять ГДФ на ГТФ и переводить G<sub>s</sub> – белок в активированное состояние, при этом Gα-ГДФ отделяется от Gβγ.

## Типы G-белков

Эффект  $G\alpha$ -ГТФ зависит от типа G-белка:

- $G_s$  стимулирует аденилатциклазу;
- $G_i$  – ингибирует аденилатциклазу;
- $G_q$  ( $G_{\beta\gamma}$ ) стимулирует активность фермента фосфолипазы C.
- $G\alpha$  субъединица всех G белков обладает ГТФазной активностью. Она гидролизует ГТФ до ГДФ и остатка фосфорной кислоты, после чего становится неактивной ( $G\alpha$ -ГДФ).  $G\alpha$ -ГДФ реассоциирует с  $G\beta\gamma$  и остается таковой до получения следующего сигнала.

# Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А

■ ПК А – тетрамер  $R_2C_2$  - не активен

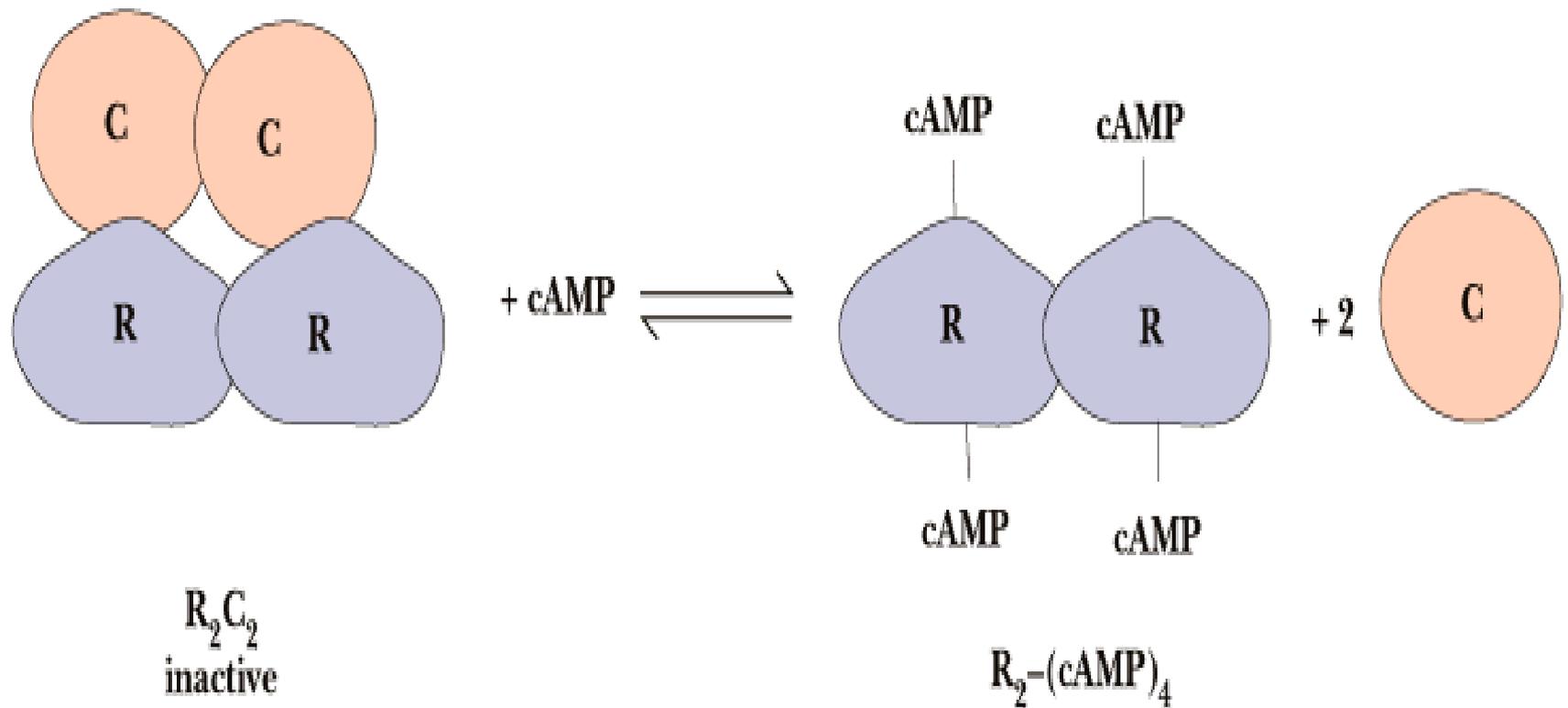
■ цАМФ – активатор ПК А



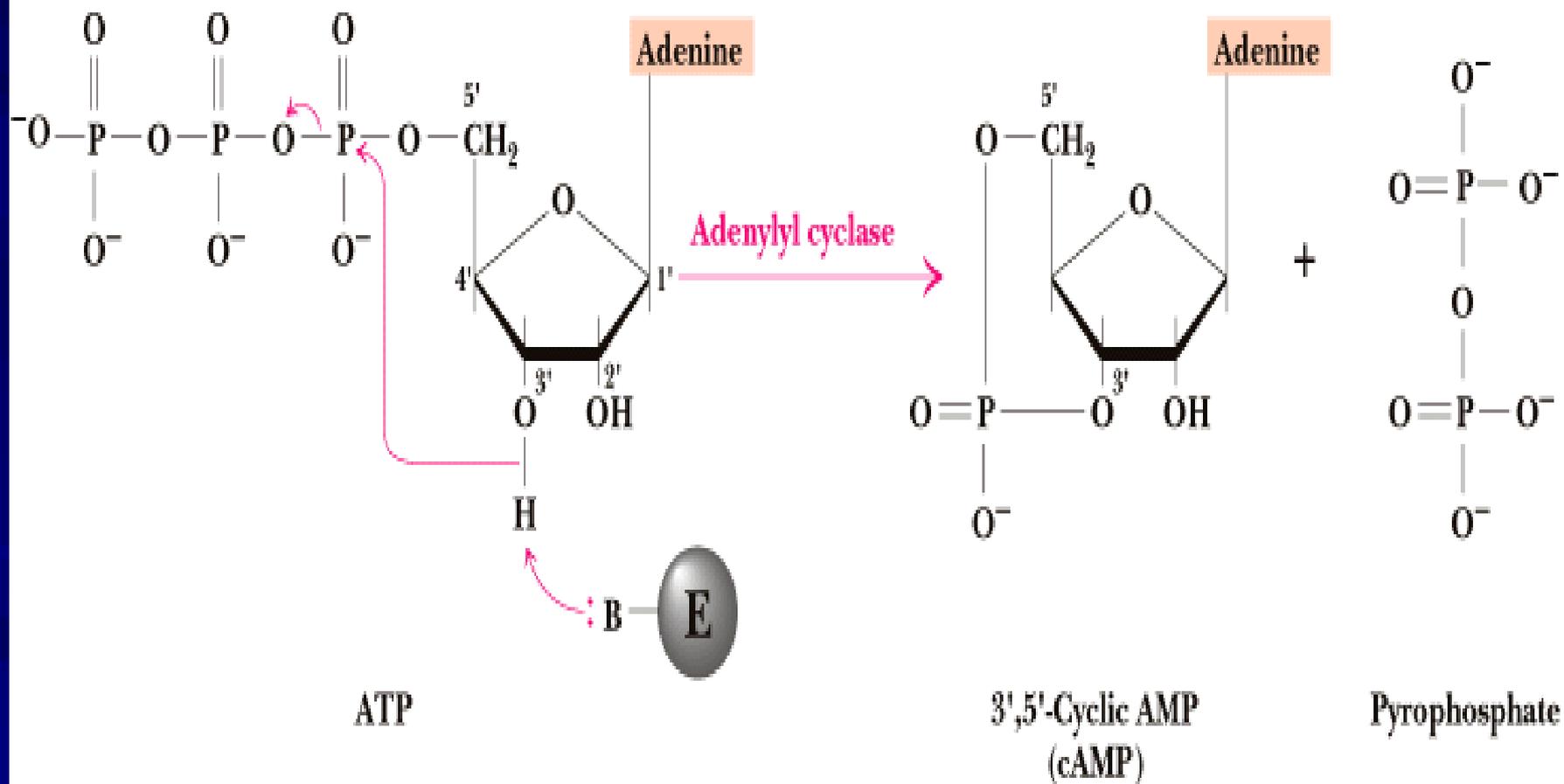
# Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А



# Регуляция активности ферментов путем ассоциации или диссоциации на примере протеинкиназы А

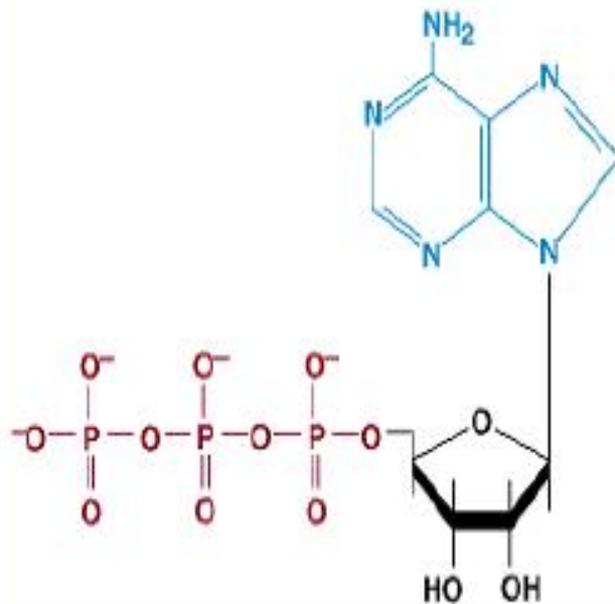


# Образование цАМФ из АТФ

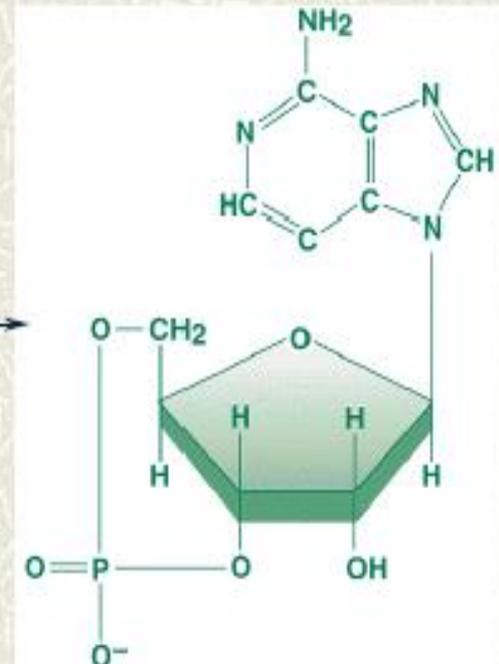


# Синтез цАМФ из АТФ

## Synthesis of cAMP

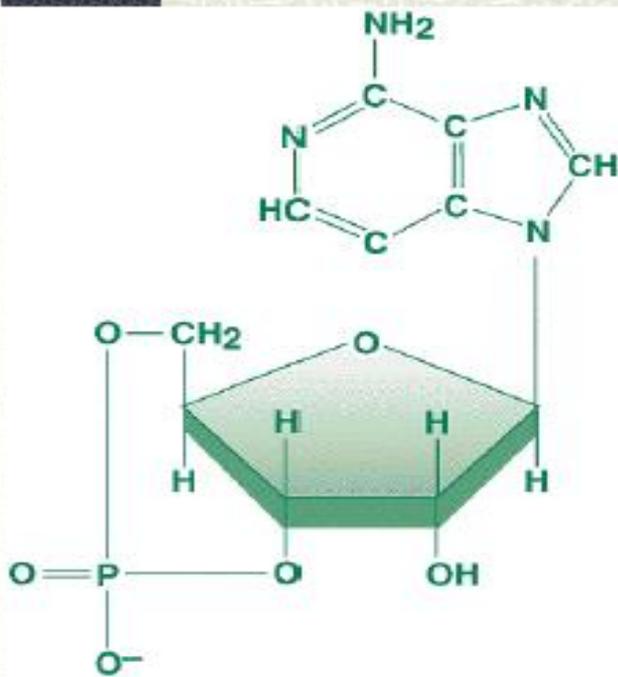


Adenylate cyclase



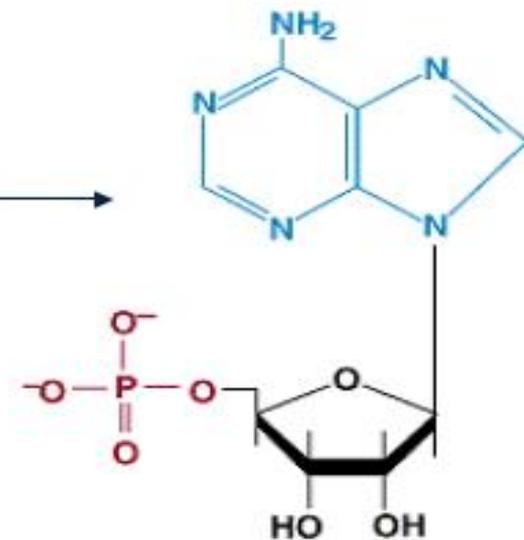
# Распад цАМФ под действием фосфодиэстеразы

## cAMP decomposition

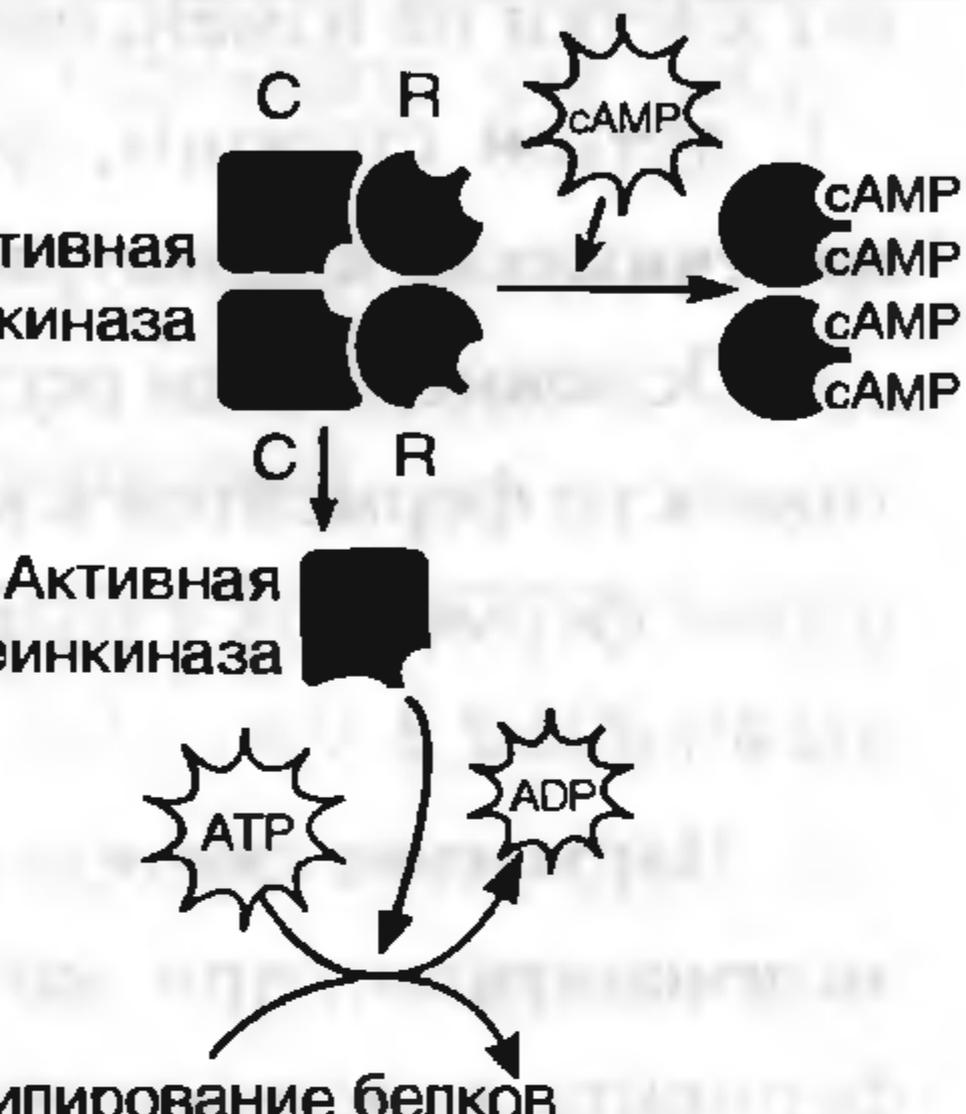


Phosphodiesterase

$H_2O$



Caffein inhibits the enzyme



— Решающее значение для активации протеинкиназы А имеет изменение четвертичной структуры — отщепление регуляторных субъединиц (R) от каталитических (C)



— Свободные C-субъединицы протеинкиназы А активны и вызывают фосфорилирование белков

— cAMP (циклический АМФ) — активатор протеинкиназы А, образуется из АТФ под действием фермента аденилатциклазы и является вторичным посредником в передаче многих гормональных сигналов внутрь клетки

Протеинкиназа

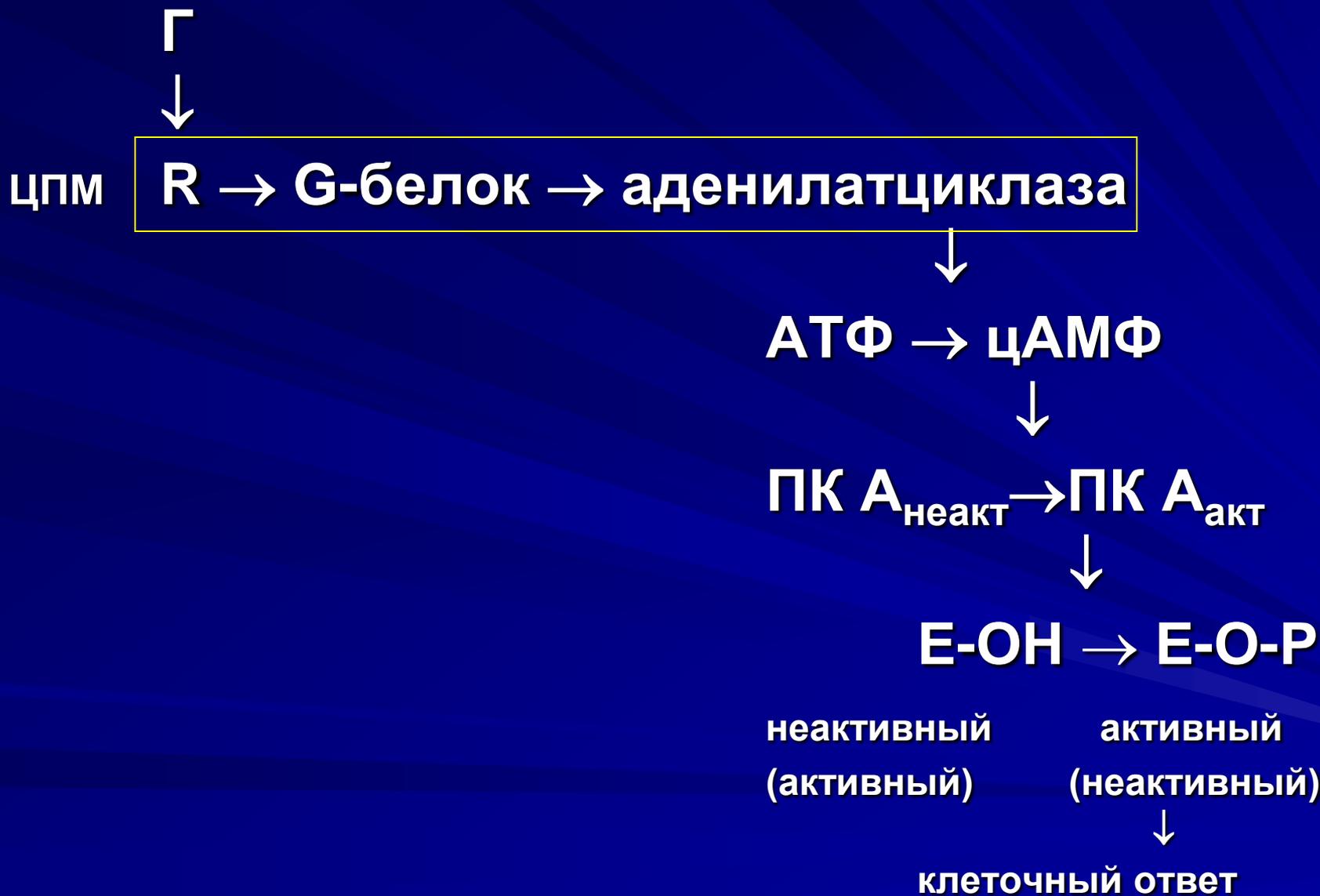
ADP

Введение отриц

## Аденилатциклазная система регуляции

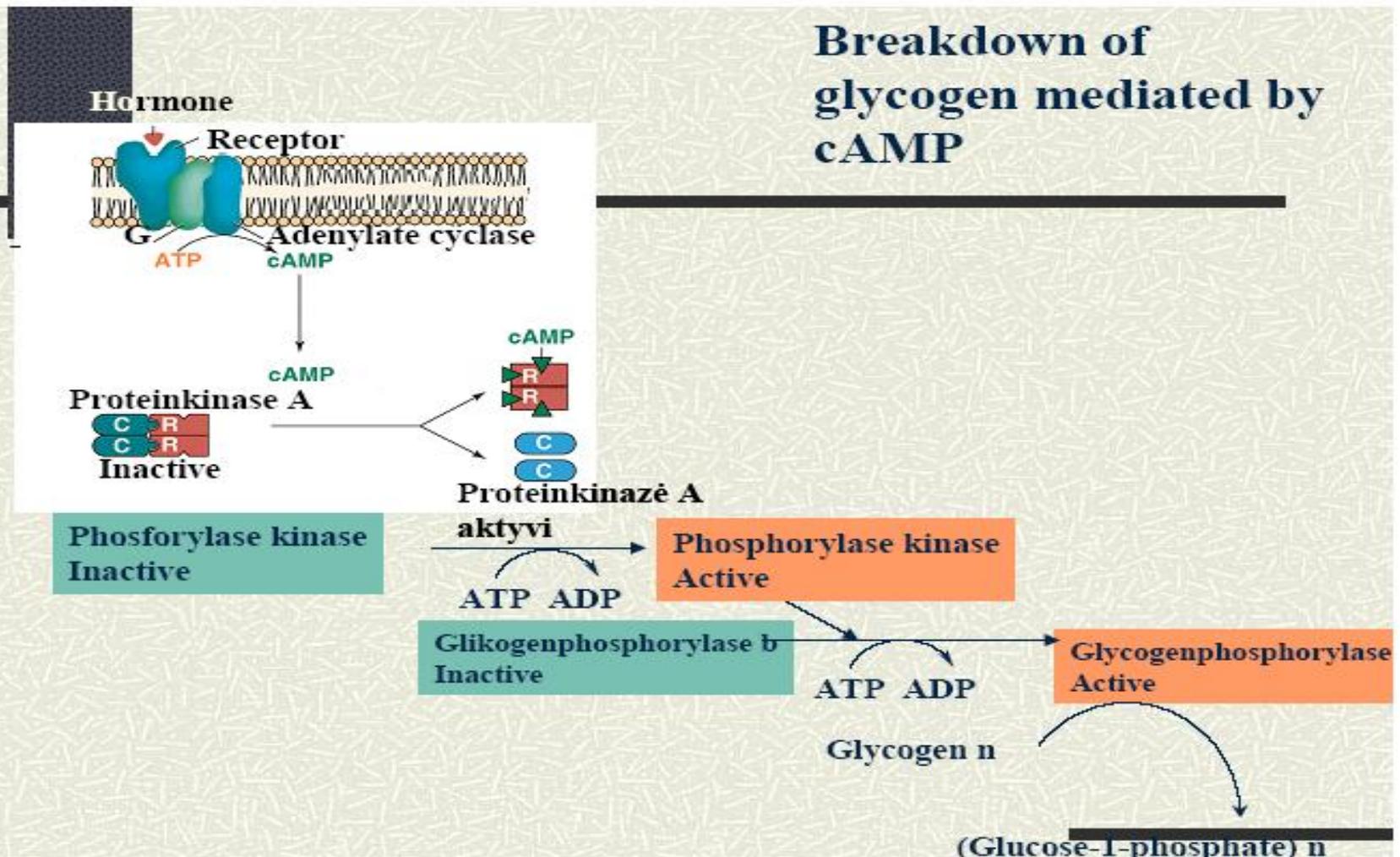
- цАМР — вторичный посредник в проведении гормональных сигналов внутрь клетки.
- АЦ и ПК катализируют взаимозависимые реакции, которые составляют единую регуляторную систему. С помощью этой системы в клетку передаются сигналы из внеклеточной среды и метаболизм клетки изменяется в нужном направлении. Внеклеточным (первичным) посредником сигнала могут быть разные молекулы, в том числе и гормоны. Они не проникают внутрь клетки, но «узнаются» мембранными рецепторами.

# Схема аденилатциклазной системы регуляции

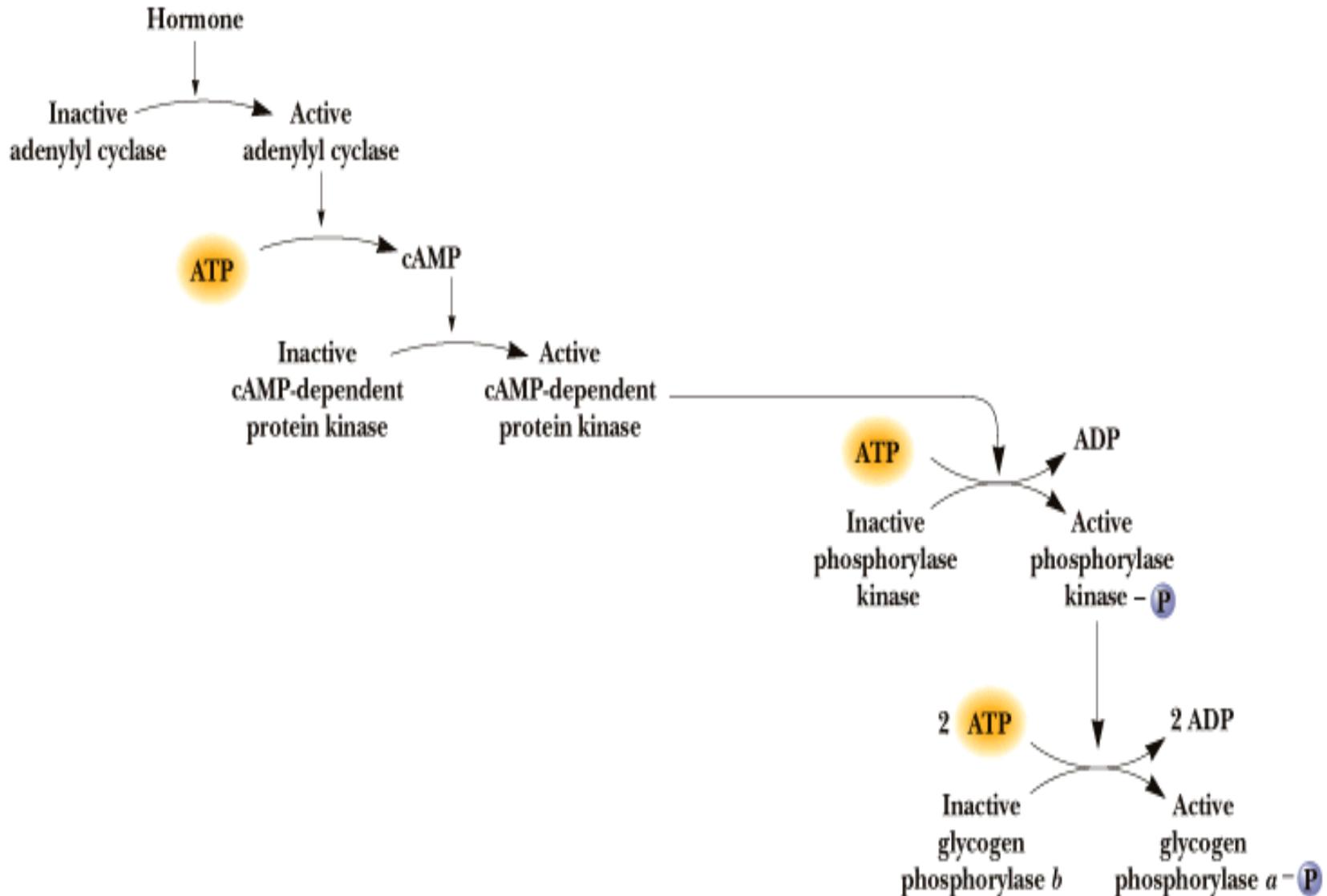


# Аденилатциклазный механизм распада гликогена

## Breakdown of glycogen mediated by cAMP



# Регуляция распада гликогена гормонами



# Регуляция распада гликогена гормонами

- Фосфорилированная форма гликогенфосфорилазы активна, а гликогенсинтетаза неактивна. При дефосфорилировании их активность меняется на противоположную. Биологический смысл — когда происходит биосинтез гликогена, его распад ингибируется, и наоборот.

## Активация E в результате присоединения регуляторных белков

- Другой пример белка-модулятора — кальмодулин, он содержит 2 глобулярных домена, соединенных  $\alpha$ -спиральным доменом. Каждый домен имеет два центра связывания  $\text{Ca}^{2+}$ .  $4\text{Ca}$ -кальмодулин — активная форма белка образуется так:  $4\text{Ca}^{2+} + \text{кальмодулин} \leftrightarrow 4\text{Ca}^{2+}\text{-кальмодулин}$ , способен связываться с E и активировать их, в частности он активирует  $\text{Ca}$ -зависимые ПК.

# Гуанилатциклазная система регуляции

- ГЦ-аза катализирует реакцию:



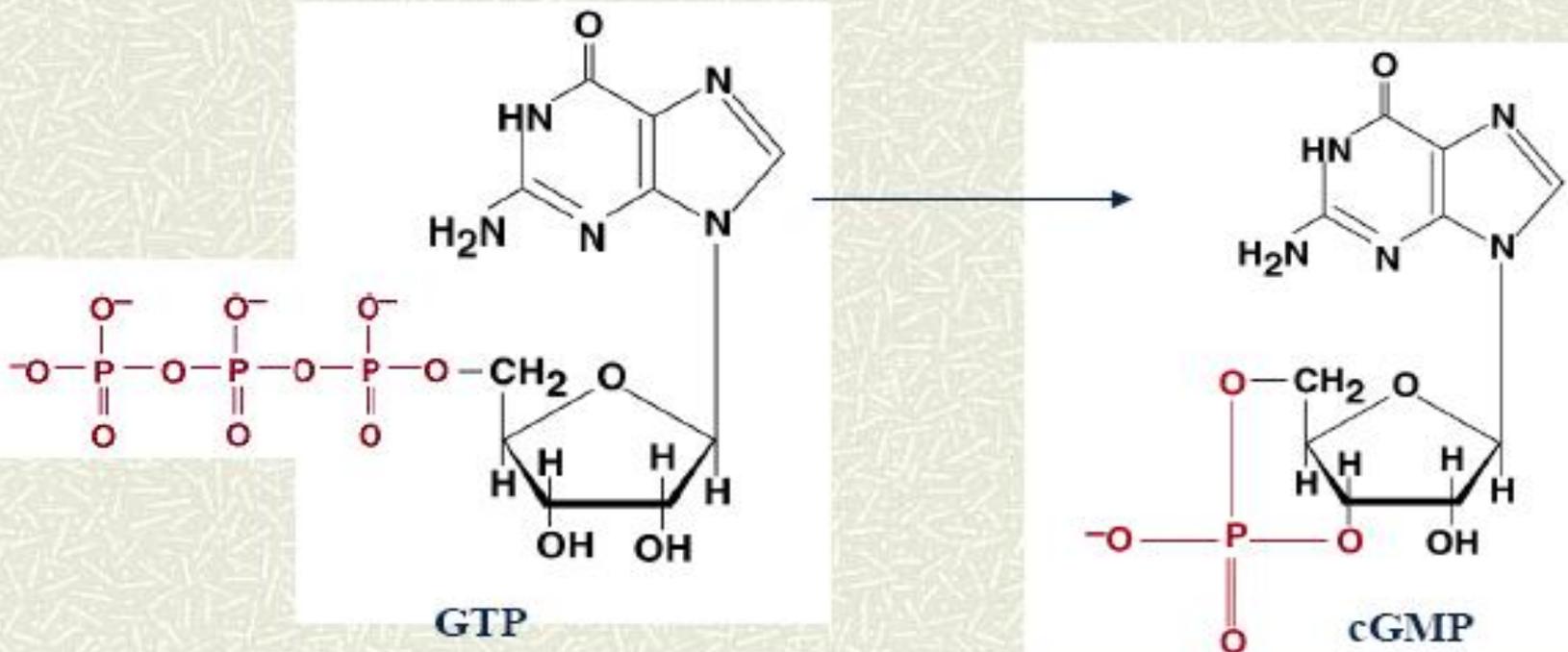
- цГМФ активирует цГМФ

зависимую протеинкиназу  $\rightarrow$

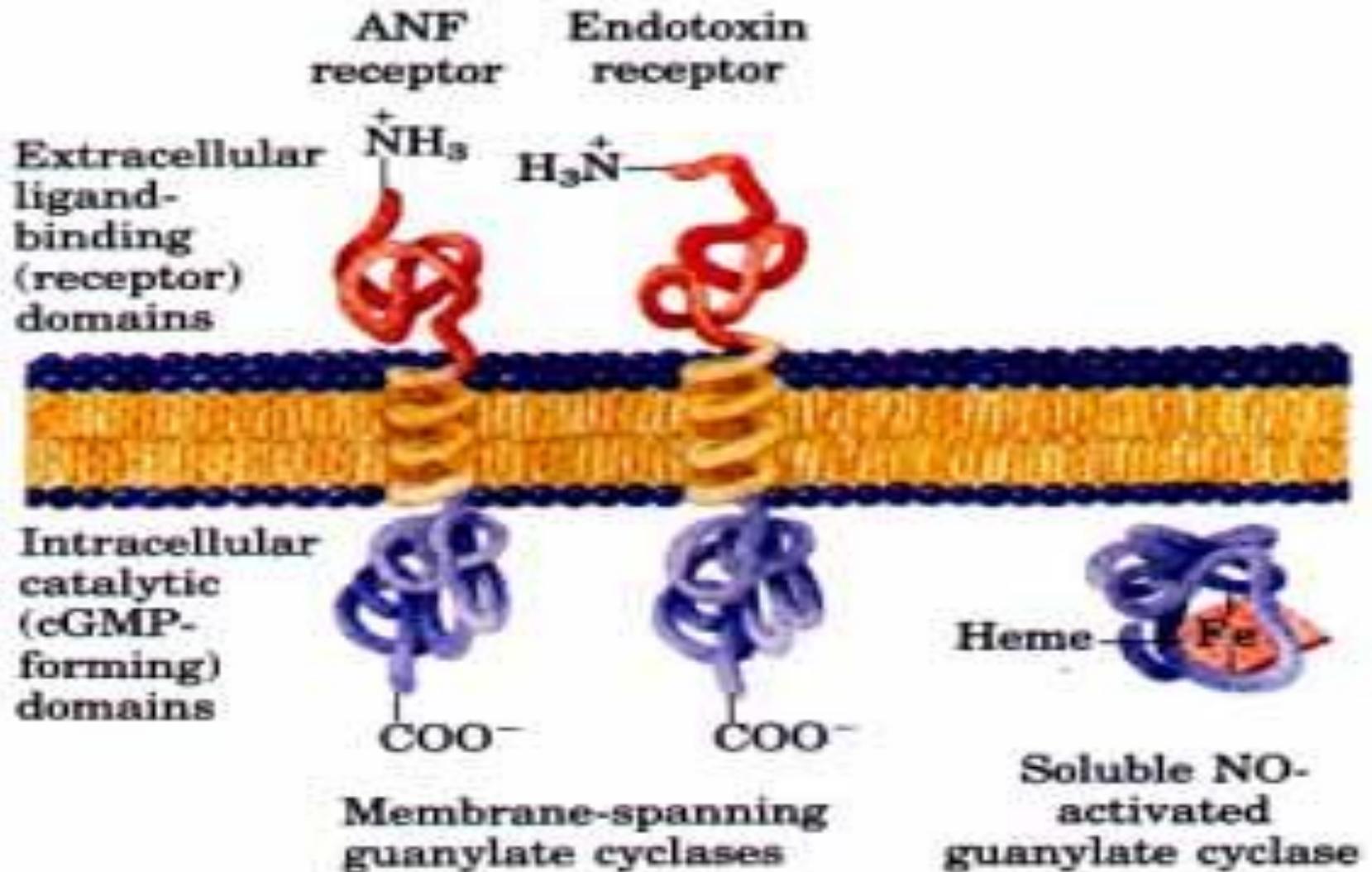
изменение метаболизма

# Образование цГМФ из ГТФ

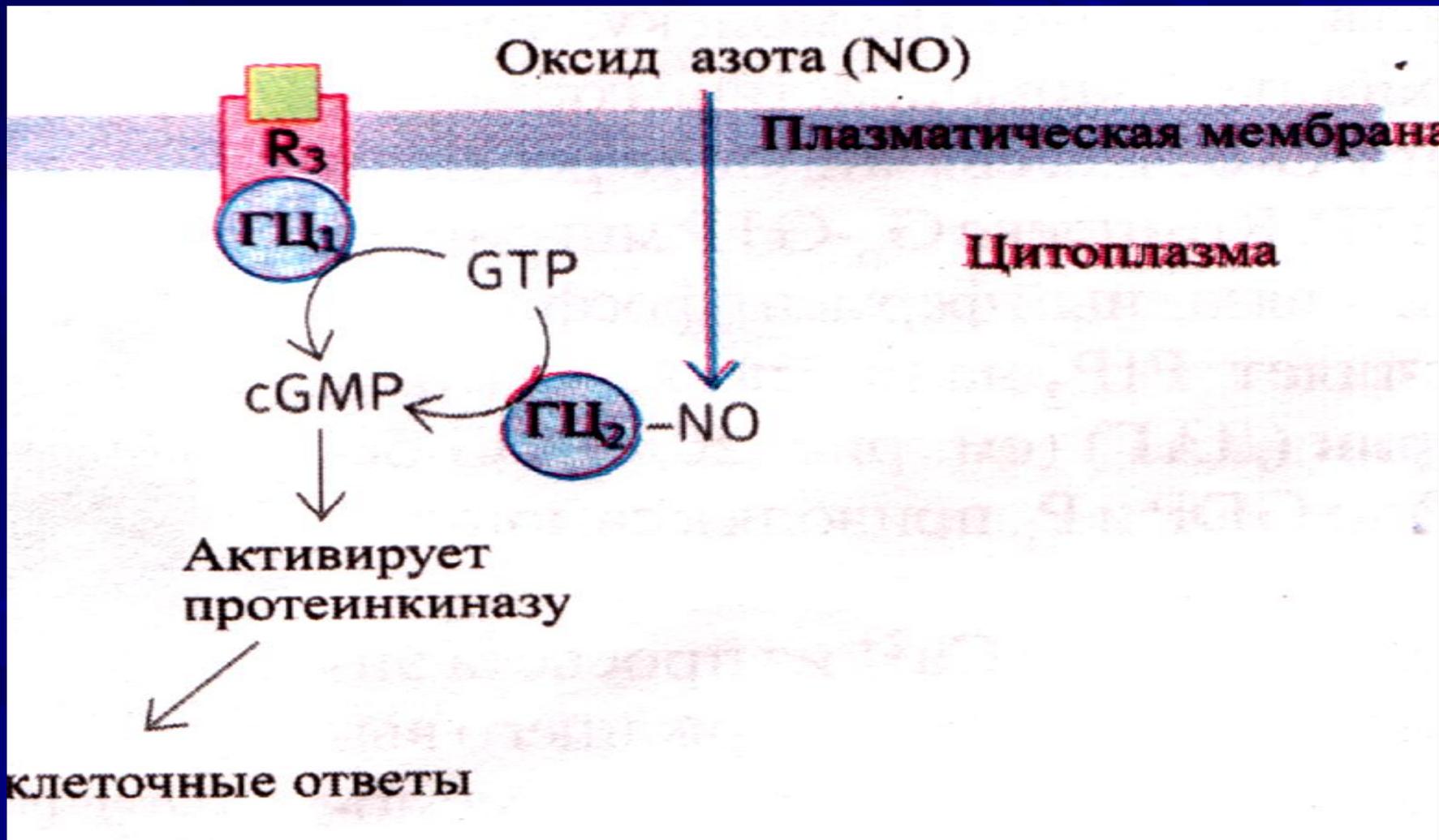
## Receptors with guanylatcycylase activity



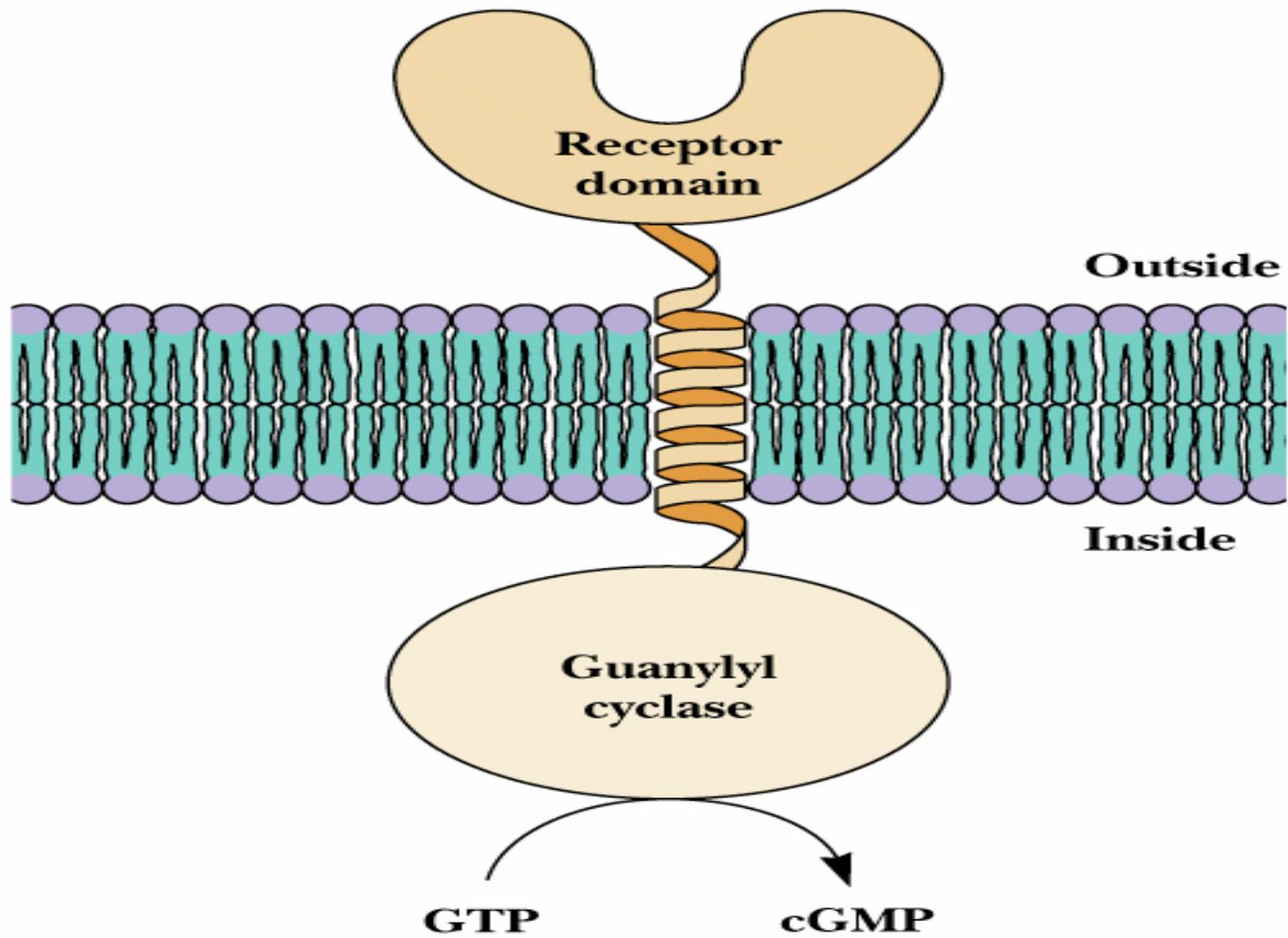
## 2 формы гуанилатциклазы



# Гуанилатциклазный механизм регуляции активности Е



# Гуанилатциклаза



# Инозитолфосфатный цикл

- К внутриклеточной системе вторичных посредников относят также производные ФЛ мембран эукариотических клеток – фосфорилированные производные ФИ. Они освобождаются в ответ на внешний сигнал – гормон под действием мембраносвязанной ФЛ-азы С.
- Из ФИФ<sub>2</sub> образуются 2 вторичных посредника – ДАГ и ИФ<sub>3</sub>.
- Действие ДАГ опосредованно через мембраносвязанный Е ПК С, катализирующую фосфорилирование внутриклеточных Е, изменяя их активность.
- ИФ<sub>3</sub> связывается со специфическим R на ЭР, способствуя выходу из него Ca<sup>2+</sup> в ЦП. Ca<sup>2+</sup>, присоединяясь к кальмодулину, активирует Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимые ПК.

## Инозитолфосфатный цикл

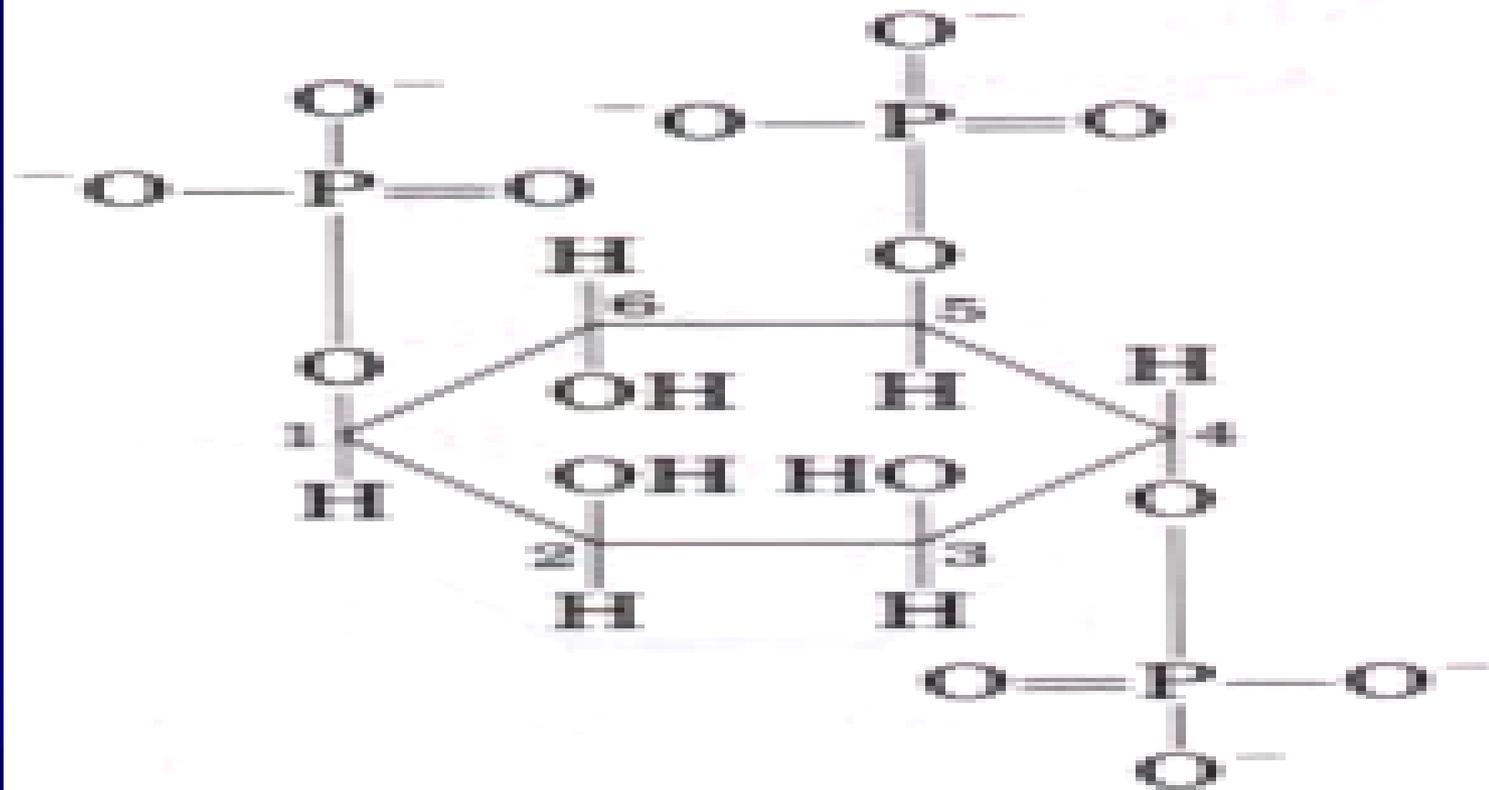
- Регуляторной субъединицей специфической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы является белок кальмодулин.
- При повышении  $[\text{Ca}^{2+}]$  в клетке ПК катализирует фосфорилирование внутриклеточных Е, регулируя этим самым их активность. Кальмодулин содержит 4 участка связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Связывание 4 ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает конформационные изменения кальмодулина, что определяет его способность изменять активность Е. Кальмодулин часто бывает одной из субъединиц белков и участвует в регуляции активности различных киназ, а также Е синтеза и распада циклических нуклеотидов.

# Схема инозитолфосфатной системы регуляции.



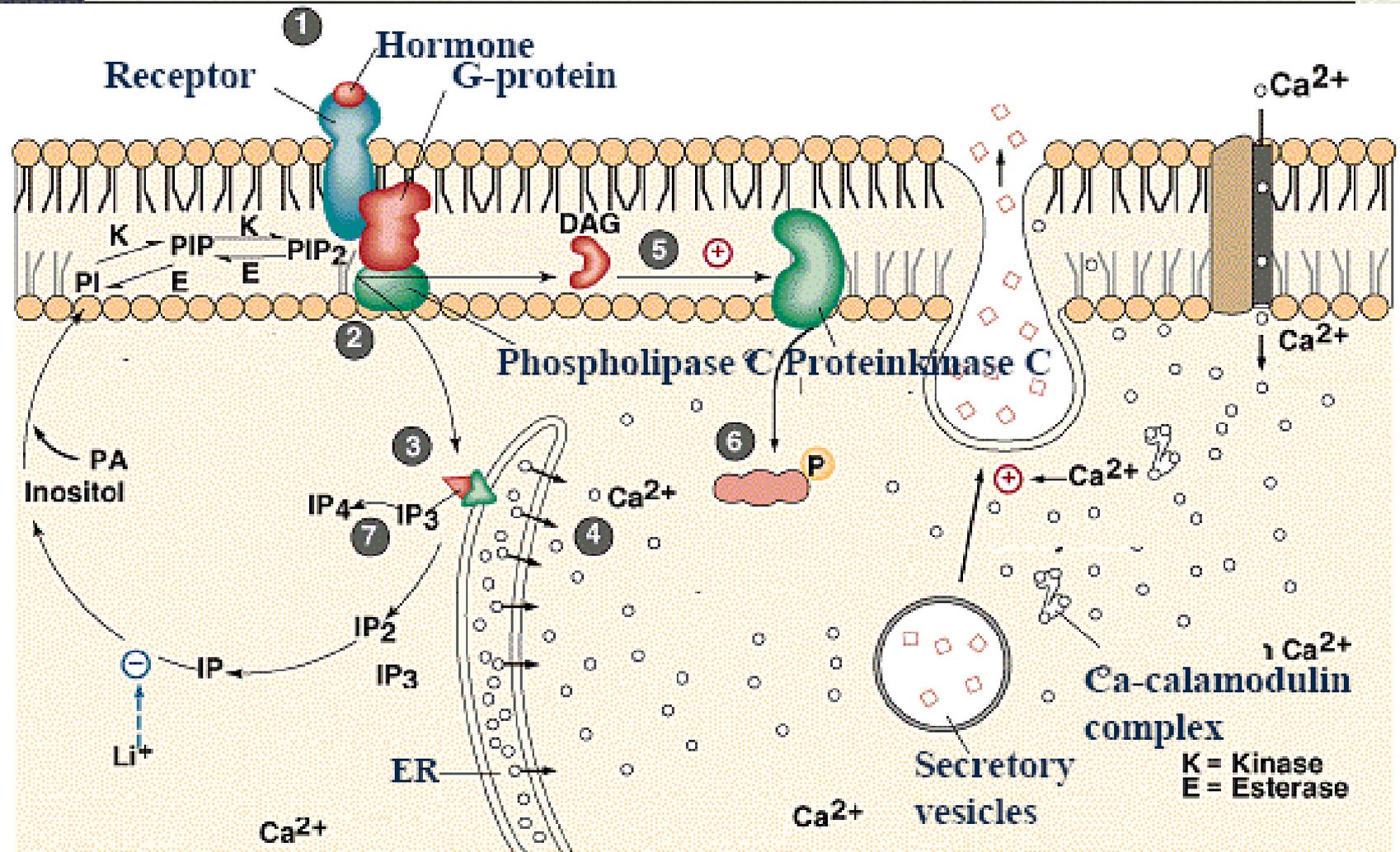
Вторичные посредники: DAG, ИФ<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>

# Структура инозитолтрифосфата



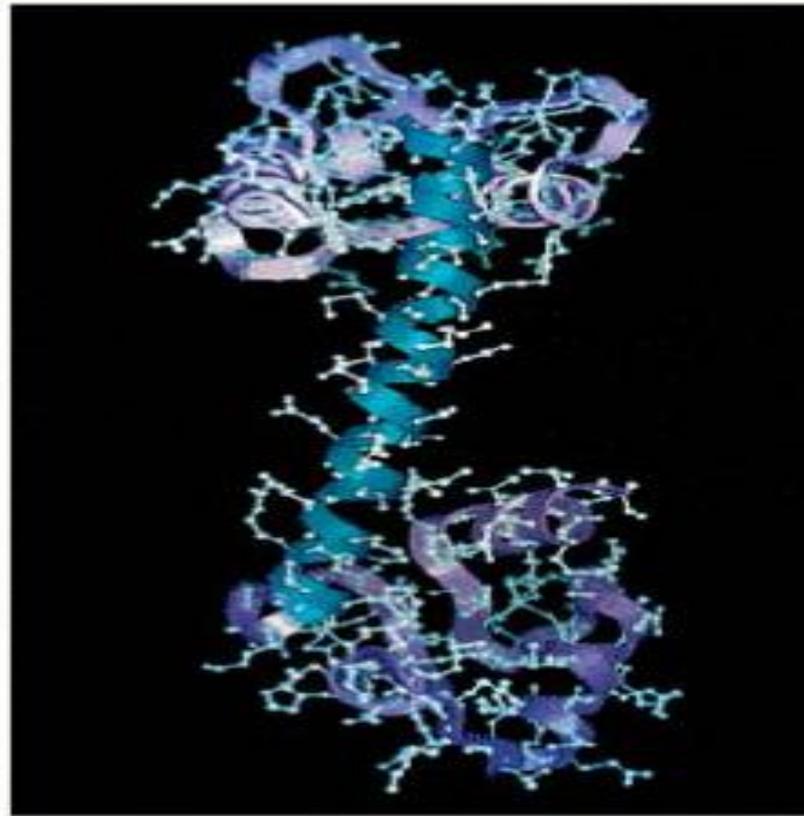
Inositol-1,4,5-trisphosphate

# Transduction of hormonal signal through phospholipase C system



# Строение кальмодулина

The model of calmodulin



# Контроль транскрипции

- Контроль за биосинтезом Е осуществляется на генетическом уровне – регуляция транскрипции.
- В основе процесса – индукция или репрессия синтеза Е с участием индукторов или корепрессоров, связывающихся с белком-репрессором. В качестве индуктора часто - S ферментативной реакции, а корепрессора – конечный продукт
- У животных индукцию синтеза белков – ферментов могут вызывать гормоны (глюкокортикоиды → ТАТ, ферменты глюконеогенеза и т.д.). ХС подавляет экспрессию генов, кодирующих ГМГ-КоА-редуктазу.

## Другие типы регуляции активности

**Компартментализация – пространственное разъединение E со своими субстратами с помощью биомембран (например, гидролитических E лизосом - с веществами ЦП, на которые они действуют).**

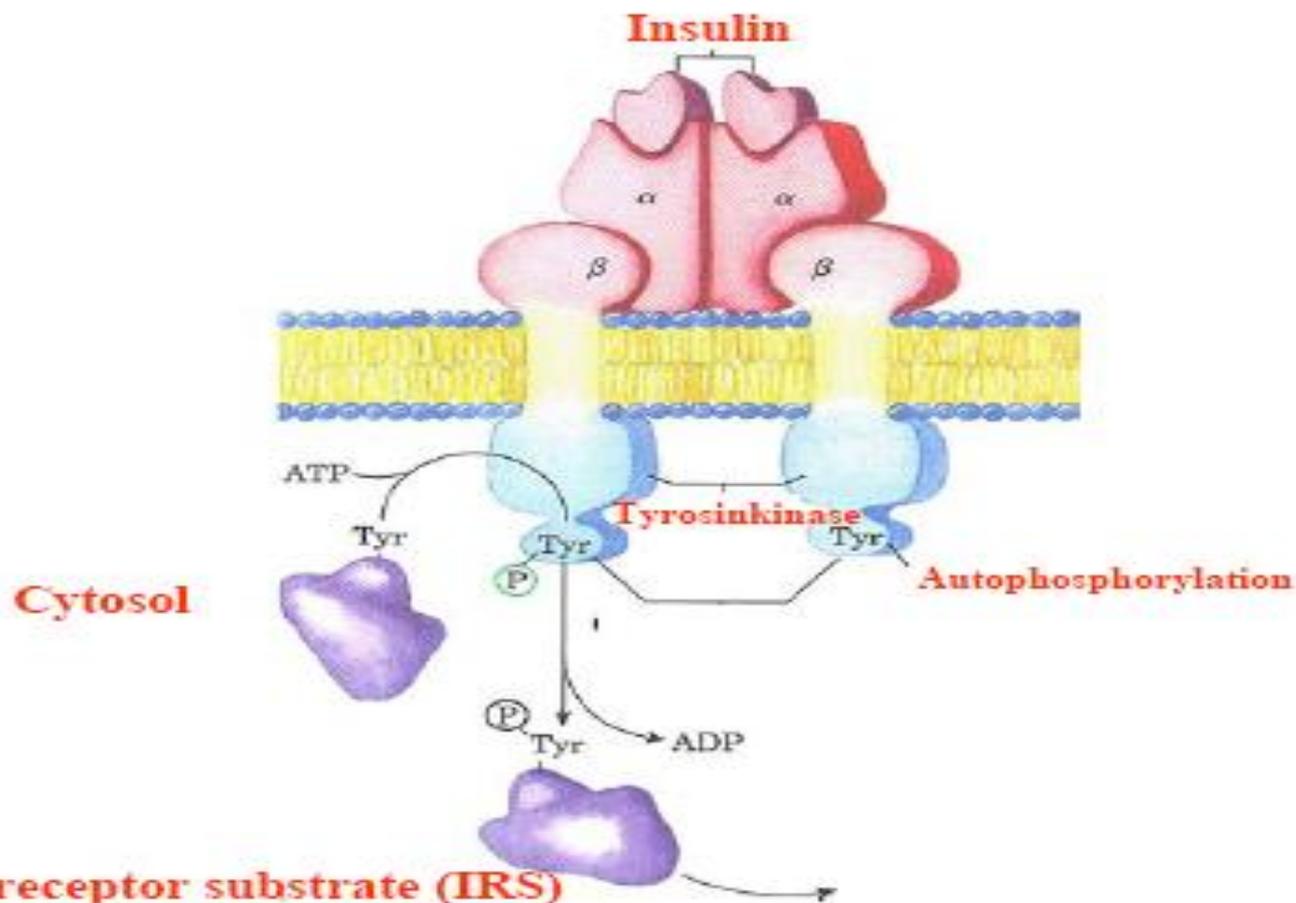
- **Механизм позволяет разделить несовместимые метаболические процессы (например, синтез ВЖК – в ЦП, а окисление – в МТХ). Однако при этом возникает проблема транспорта метаболитов и восстановительных эквивалентов через биомембраны органелл. Эту задачу решают челночные механизмы, позволяющие перевести метаболиты в формы, способные пройти через мембраны.**

## Другие типы регуляции активности

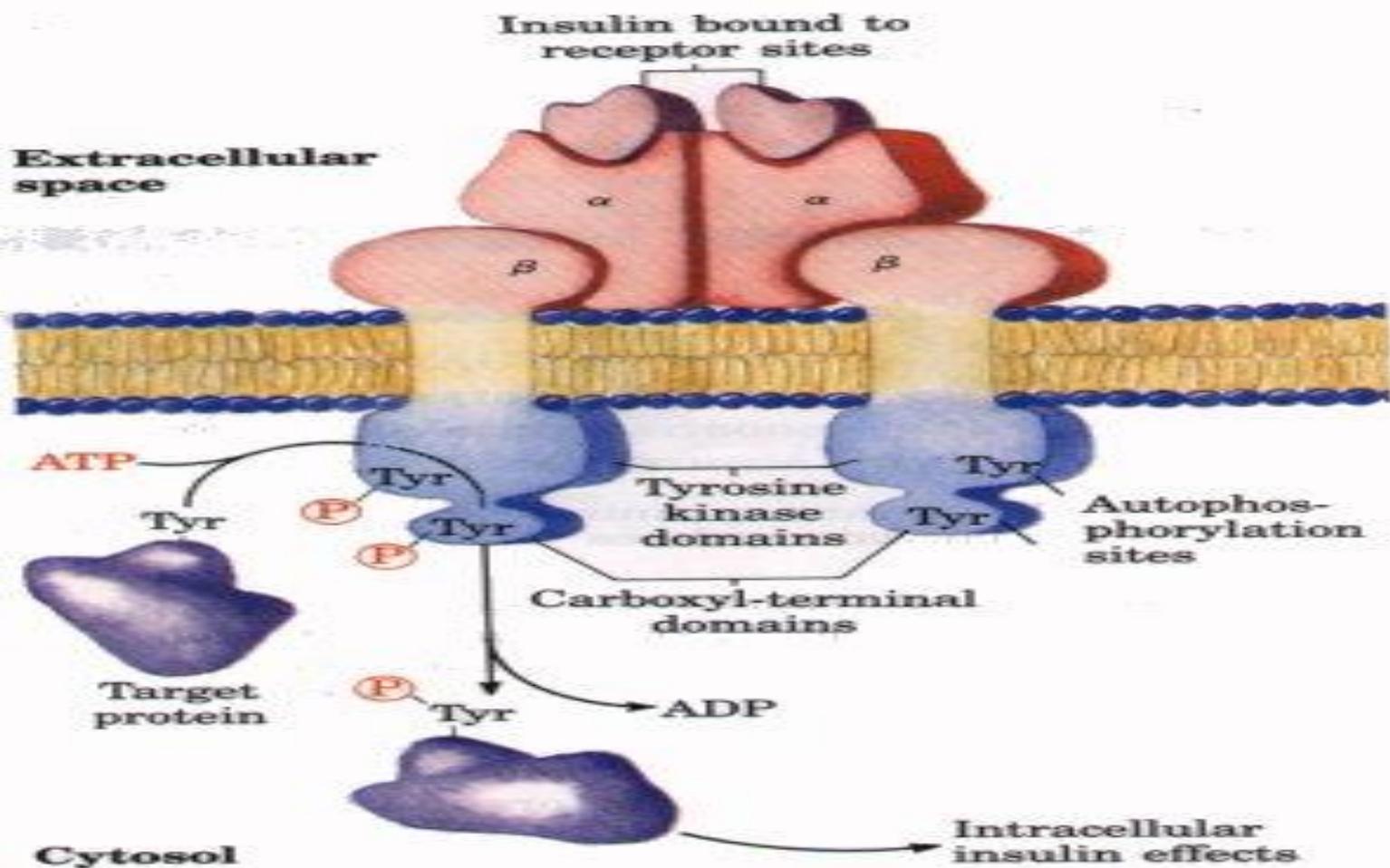
- Модуляция лигандами. Активность ключевого E может регулироваться лигандами (S, P, коферментом, другим эффектором).
- Важный параметр, контролирующий протекание метаболического пути, — наличие субстратов, и главным образом — наличие первого S. Чем больше [исходного S], тем выше скорость метаболического пути.
- Часто лимитирующий фактор — доступность кофермента, а именно наличие регенерированных коферментов. Например, в реакциях дегидрирования S коферментами дегидрогеназ служат окисленные формы  $\text{NAD}^+$ , FAD, FMN, которые восстанавливаются в ходе реакции. Чтобы E вновь участвовали в реакции, необходимо превращение их в окисленную форму.

# Строение рецептора инсулина, содержащего тирозинкиназные домены

## Model of insulin receptor



# Строение рецептора инсулина, содержащего тирозинкиназные домены



# Роль иона Me:

- функции простетических групп;
- служат акцепторами и донаторами электронов;
- Роль Me в присоединении S в АкЦ E:
  - стабилизаторы молекулы S;
  - стабилизаторы АкЦ E;
  - стабилизаторы третичной и четвертичной структуры.
- Роль Me в регуляции активности E.