

ЛЕКЦІЇ

УДК 517.151.4
К 54

М.Д. Курський, О.М. Корженко*

РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ)
*Поліклініка №1 лікарні для вчених НАНУ (м. Київ)

За останні роки накопичилися фактичні дані стосовно вивчення механізмів протікання хімічних реакцій, що складають основу метаболізму живого організму. Розкриття закономірностей регулювання і взаємозв'язків метаболічних шляхів відноситься до нових напрямів біохімії, молекулярної біології та медицини. Окремі положення стосовно складних цих процесів є дискусійними, не досить підсумованими, конкретизованими і доступними в навчальному плані для широкого кола читачів. Виникла необхідність аналізу і стислого викладення основних відомостей про шляхи і механізми регулювання ферментативної активності, опису яких позбавлені більшість сучасних підручників.

Регулювання активності ферментів визначають як зміни швидкості і напрямків каталізованих реакцій.

Виділяють два основні шляхи регулювання активності ферментів:

1-шлях зміни концентрації ферментів;

2-шлях зміни каталітичної активності ферментів у післясинтетичний період.

Перший (1) шлях регулювання є механізмом довготривалої адаптації біосинтетичного ферментного апарату. У більшості випадків він полягає, з одного боку, в змінах інтенсивності **біосинтезу** відповідних білків-ферментів пов'язаних з функціонуванням процесів транскрипції і трансляції, а з другого — процесів їх **протеолізу**.

Генетично обумовлені варіації в структурі ферментів не обмежуються видовими відмінностями. В межах одного виду існують ферменти у вигляді **ізоферментів**, які, як правило, каталізують одну і ту ж реакцію, але відрізняються поміж собою фізико-хімічними властивостями — характеризуються різними кінетичними константами і регу-

ляторними властивостями. Ізоферменти визначаються відмінностями первинної структури молекул білка, окремих субодиниць чи їх набором, які, як правило, локалізовані в різних компартментах клітини або в різних тканинах. Явище наявності ізоферментів пояснюють або існуванням багаточисельних *генетичних локусів*, які кодують відповідні варіанти даного ферментного білку, або ж існуванням багаточисельних *алелей одного локуса*. За класифікацією Комісії по ферментам Міжнародного біохімічного союзу ізоформи 1, 2 і 3 класів є істинними ізоферментами, і їх синтез контролюється відповідними ділянками ДНК; ізоферменти 4, 5 і 6 класів є вторинними, що утворюються в результаті післятрансляційної модифікації продуктів одного з генів.

Другий (2) шлях регулювання активності ферментів є результатом зміни каталітичної активності їх синтезованих форм.

Цей шлях пов'язаний: зі зміною концентрації реагуючих речовин (субстратів, продуктів, кофакторів та інше); з участю регуляторних молекул (ефекторів) і алостеричних центрів ферментів та з появою кооперативності при наявності четвертинної структури ферментів і поліферментних комплексів; з процесами ковалентної модифікації ферментів; з частковим протеолізом проферментів; з процесами білок-білкової взаємодії, участі біологічних мембран і медіаторів, гормонів, інтерлейкінів, факторів росту. Суть цих механізмів полягає в наступному.

І. Регулювання активності ферментів шляхом зміни концентрації реагуючих речовин.

Якщо фермент (E) каталізує перетворення субстрату (S) в продукт (P). Субстрат через стадію виникнення фермент-субстратного комплексу (SE) перетворюється в продукт та вільний фермент: $S + E \leftrightarrow SE \leftrightarrow E + P$. Така реакція може уповільнюватись лише за рахунок зменшення концентрації субстрату та внаслідок підвищення концентрації продукту, що перешкоджає зв'язуванню S з активним центром ферменту. Якщо реакція зворотна, то вплив P виявляється ще ефективнішим. По мірі зменшення концентрації S і накопичення P підвищується швидкість зворотної реакції-перетворення P на S. При відповідних концентраціях S і P настає рівновага: швидкості утворення P із S і S із P стають однаковими ($V_{+1} = V_{-1}$). Реакції, що каталізуються такими ферментами описуються кінетикою Михаеліса-Ментен. В цих умовах реакційні компоненти діють за конкурентним типом, (конкурентний інгібітор не зв'язується з фермент-субстратним комплексом) (рис.1).

Окремі ферменти в своєму складі мають не білкові низькомолекулярні компоненти -коферменти, які в процесі каталізу послідовно зв'язуються з білком на різних проміжках метаболічних реакцій. Близько однієї третини відомих ферментів для виявлення своєї максимальної активності потребують додавання іонів металів, як і кофакторів. Ці ферменти відносяться до металопротейнів. В цих випадках іони металів беруть участь у каталітичних процесах коли вони міцно зв'язані з активним центром, або коли є складовими субстрату.

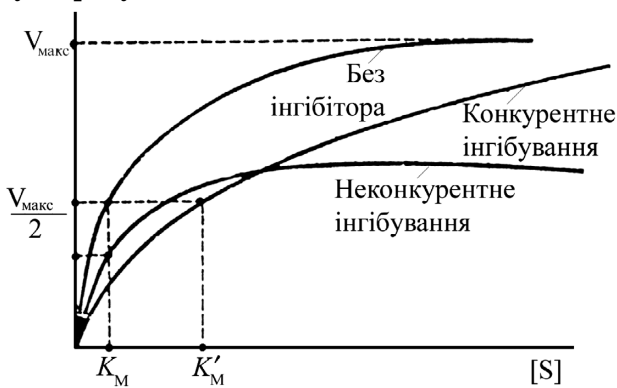


Рис.1. Залежність активності фермента від концентрації субстрата. V_{\max} - максимальна швидкість реакції; K_m і K'_m - констант Михаеліса без інгібітора і за його присутності, відповідно.

Оскільки окремим кофакторам не притаманна висока специфічність стосовно ферментів, зміна їх концентрацій в біологічних системах може призводити до зміни активності не одного, а цілої групи ферментів, на-

приклад НАД-залежних, що каталізують окисно-відновні реакції.

В загальному плані найбільш ефективний контроль з використанням субстрату може здійснюватись *регуляторними (ключовими)* ферментами, які знаходяться на початку метаболічного ланцюга. Ключові ферменти має низьку каталітичну активність і піддається регулюванню зміною концентрації субстрату, можливо навіть на рівні його транспорту в клітину або у відповідний компартмент, що визначає загальну швидкість процесу. Тому, для впливу на той чи інший метаболічний цикл ферментативного каталізу достатньо регулювати активність ферменту, який каталізує зазначену вище повільну стадію – на *ключовий*. Активність ключового фермента регулюється на трьох незалежних рівнях: а-контролю транскрипції на генетичному рівні; б- контролю на рівні взаємоперетворень ключового ферменту при метаболічній потребі (за умов дії відповідних сигналів, опосередкованих вторинними месенджерами) активуючий фермент (E_1) переводить ключовий фермент в каталітичноактивну форму. Коли потреба в цьому зникає, інактивуючий фермент (E_2) переводить ключовий фермент в неактивну форму (наприклад фосфорилування протеїніназами і дефосфорилування фосфатази): в-модуляції лігандами (субстратами, кінцевими продуктами, кофакторами та іншими ефекторами), які зв'язуються в алостеричному центрі ключового фермента.

2. Механізми алостеричного і кооперативного регулювання активності ферментів

З ускладненням метаболічних процесів, ускладнюються і молекулярна структура ферментів, що, зокрема, супроводжувалося виникненням додаткових механізмів підсилювання регуляторних сигналів. Ці механізми зв'язані з появою в молекулах ферментів, крім активних центрів, спеціальних сайтів – *алостеричних центрів*, з якими взаємодіють *алостеричні ефектори (регулятори, модулятори)*. Каталітична активність алостеричних ферментів регулюється ефекторами різної природи (субстратами, продуктами каталізуємих реакцій, а також кінцевими продуктами інших метаболічних циклів). Ефектори виявляють позитивні і негативні регуляторні властивості. Алостеричні ферменти можуть регулюватися одним або декількома ефекторами, тобто, можуть мати один або декілька алостеричних центрів, а звідси бути моно- або полівалентними. Розрізняють *гомotropні, гетерotropні і гомогетерotropні* алостеричні ферменти. Для *гомotropних* ферментів позитивними і негативними ефекторами є субстрати; для *гетерotropних* – специфічні сполуки, які не

є субстратами; для *гомогетеротропних*- субстрат є одним з двох або декількох ефекторів. Ефектори можуть зв'язуватися з вільними ферментами і з фермент-субстратними комплексами в алостеричному центрі. Такий механізм регулювання активності ферментів є неконкурентним і більш досконалим, ніж регулювання на рівні активного центру. З появою у ферментів декількох алостеричних центрів, може спостерігатися S-подібна (сигмоїдна)- крива каталітичної залежності швидкості реакції від концентрації субстрата (рис.2).

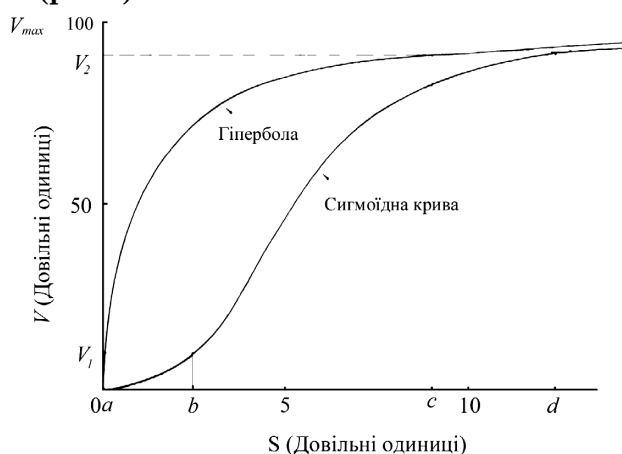


Рис. 2. Гіперболічна та сигмоїдна криві залежності активності фермента від концентрації субстрата (для підвищення активності від v_1 до v_2 необхідна зміна концентрації субстрата від b до d у сигмоїдному випадку).

Така форма кривої може бути обумовлена також наявністю *четвертинної структури* ферментів, коли кожна складова їх субодинаця має активний центр і може зв'язувати субстрат. Зв'язування субстрату в активному центрі однієї субодинаці або ефектора в алостеричному центрі може впливати на приєднання слідуєчих молекул субстрату до центрів, які ще залишилися вільними. При цьому відбувається кооперативна взаємодія між субодинацями, яка не є прямим ефектом, а опосередкована зміною конформації структури субодинаць ферментного білка. За таких умов відбувається передача інформації кооперативних змін між субодинацями, або в молекулі алостеричного ферменту. Відомо, що об'єднання лише субодинаць не дає відчутних змін каталітичної активності, але значно підсилює чутливість фермента до дії регуляторів. Кооперативність забезпечує значну зміну активності фермента у відповідь на незначні зміни концентрації субстратів або ефекторів.

Так, якщо для підвищення активності фермента, підпорядкованої кінетиці Михаєліса–Ментен, з 10 до 90 % від максимальної швидкості, необхідно концентрацію субстрату підвищити в декілька десятків разів (що досить рідко буває в біологічних системах), то для такого підвищення активності ферменту з кооперативними властивостями потрібно підвищити концентрацію субстрата лише в чотири рази.

Поява спеціальних *регуляторних ферментів або субодинаць*, супроводжується регулюванням віддаленими субстратами і продуктами біохімічних циклів, за типом *зворотних негативних зв'язків*. При цьому, як правило, не змінюється спорідненість ферменту до субстрату. В свою чергу і субстрат не може змінювати регуляторну дію ефектора.

Так, якщо уявити будь-який процес у вигляді замкнутого циклу, то кожний його учасник регулює хід відповідної реакції. Вирішальним фактором при цьому є властивість молекули ключового ферменту змінювати свою активність за рахунок структурних перетворень під впливом активуючих і інгібуючих ферментів субстратів і продуктів реакції.

Роль продуктів реакції значно вища в регулюванні ферментативної активності шляхом інгібування за типом негативних зворотних зв'язків, по не конкурентному механізму. Наприклад, АТФ, яка є кінцевим продуктом процесів перенесення електронів і фосфорилування, субстрати для яких надходять з гліколітичного та трикарбонового циклів, інгібує 6-фосфофрукто-кіназу реакцію гліколітичного циклу.

Щодо можливих молекулярних механізмів кооперативності запропоновано декілька моделей, які активно дискутуються. Зокрема модель Ж.Моно, Дж.Уаймена, Ж.-П. Шанжьо передбачає існування двох фізичних станів алостеричного ферменту, що відрізняються своєю конформацією та каталітичною активністю: *каталітичний (релаксований-R)* та *інгібіторний (напружений-T)*, причому, рівновага зсунута в бік T-форми (рис.3).

Приєднання субстрата до любого протомера в відповідній формі ніяк не впливає на зв'язування субстрата іншими протомерами в тій же формі. Зворотний перехід між $R \leftrightarrow T$ залежить від взаємодії фермента з алостеричними ефекторами, які стабілізують його молекулу в одному з конформаційних станів (активному чи заінгібованому).

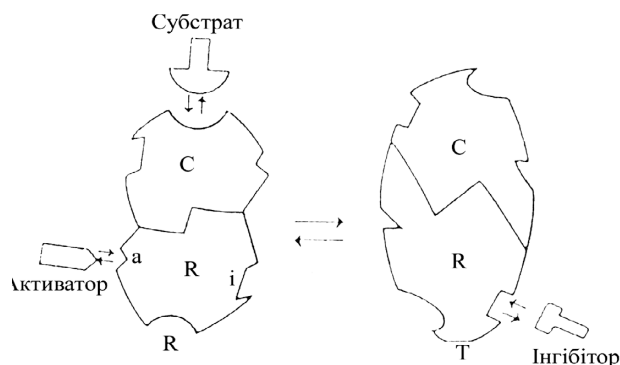


Рис.3. Перехід між активною (R) та неактивною (T) формами алостеричного фермента.

Які ж переваги дає клітині або цілому організму регуляція активності ферментів за сигмоїдною (S-подібною) кінетикою в порівнянні з гіперболічною? Ці переваги зв'язані з фізіологічними функціями конкретних білків. Одним з прикладів S-подібної кінетики є зв'язування кисню двох гемовмістних білків: з гемоглобіном (тетрамером) і гіперболічної кінетики зв'язування кисню міоглобіном (мономером) (рис.4).

Відомо, що в молекулі гемоглобіну є чотири субодиниці з відповідними ділянками, що зв'язують кисень. Значить, S-подібність кривої можна пояснити тим, що приєднання молекули кисню до одного гему призводить до підвищення спорідненості до кисню останніх гемових груп.

Зв'язування кисню мономерним міоглобіном, який має один центр для зв'язування кисню, реакція протікає за кінетикою Михаеліса–Ментен. Звідси витікає, що поява четвертинної структури гемоглобіну ($\alpha_2\beta_2$) призводить до різкої зміни кисеньзв'язуючої здатності в кожній послідовній субодиниці: приєднання кисню до перших двох субодиниць призводить до різкого (в 500 разів) збільшення спорідненості кисню до останніх двох.

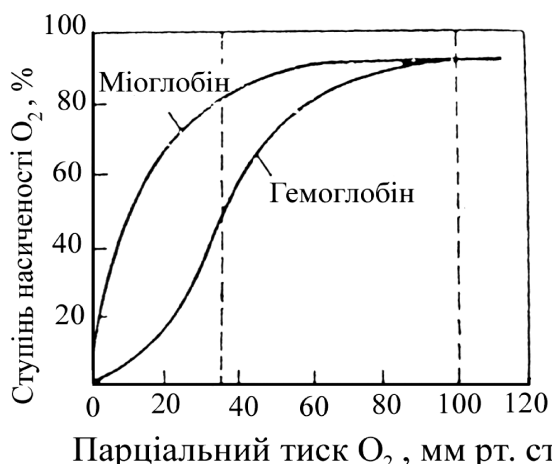


Рис. 4. Ступінь насиченості киснем міоглобіну і гемоглобіну при різних значеннях

тиску кисню. Між штрихованими лініями знаходяться значення тиску кисню, що відповідають фізіологічним—від периферичних тканин до легень відповідно 35-100 мм.рт.ст. або 4,55 та 13 кПа.

Ферментам, які каталізують реакції з участю більше ніж одного активного центра, притаманні характерні особливості, які створюють основу для кінетичної теорії кооперативного ефекту. Суттєвою відмінністю двохсубстратних реакцій є більш складна кінетика в порівнянні з односубстратними реакціями. Ця складність має відхилення від лінійності на графіку подвійних зворотних величин.

В.Фердинанд для пояснення цього явища допускає дію фермента по випадковому механізму, де він приєднував би один субстрат не залежно від зв'язування другого, тобто, допускає існування альтернативних шляхів утворення потрібного комплексу: $E \leftrightarrow ES_1 \leftrightarrow ES_1S_2 \rightarrow E + \text{продукти}$.

3. Регулювання активності ферментів шляхом ковалентної хімічної модифікації білків.

В біологічних системах широко розповсюджений метод регулювання активності ферментів шляхом ковалентного приєднання до білків хімічних груп або цілих молекул (хімічної модифікації). Цей тип регулювання має три важливі особливості: а) фермент метаболічного шляху, який регулюється, існує в двох формах, одна з яких неактивна, або значно менш активна; б) неактивна форма фермента не дуже легко перетворюється в активну, тобто, в реакції з високою константою рівноваги; аналогічно, активна форма переходить в неактивну в результаті другої реакції також з високою константою рівноваги; в) регулятор X змінює активність взаємоперетворюючих ферментів, а не основного фермента метаболічного шляху (рис.5).

Типовим прикладом такої модифікації білка–ферментативне ковалентне приєднання коферментів, ліпідів, вуглеводів та інших хімічних сполук. Цей процес каталізують інші ферменти, він є досить специфічним і зв'язуються хімічні групи чи сполуки лише з відповідними залишками амінокислот білка та за відповідними зв'язками. Окремі ферменти можуть піддаватися одразу декільком видам модифікації. Наприклад, гістони можуть піддаватися фосфорилуванню, метилуванню і ацетилюванню. Олігосахариди приєднуються O-глікозидним зв'язком до OH-груп серина, треоніна, або ж до амінного азоту аспарагіну і глутаміну. Деякі білки м'язів і мозку (рідше інших тканин) метилуються ферментами метилазами, субстратом яких є

S-аденозилметіонін. При цьому в складі білку утворюються N-метил-, диметил-, або триметиллізин, N-метил-аргінін або 3-метилгістидин.

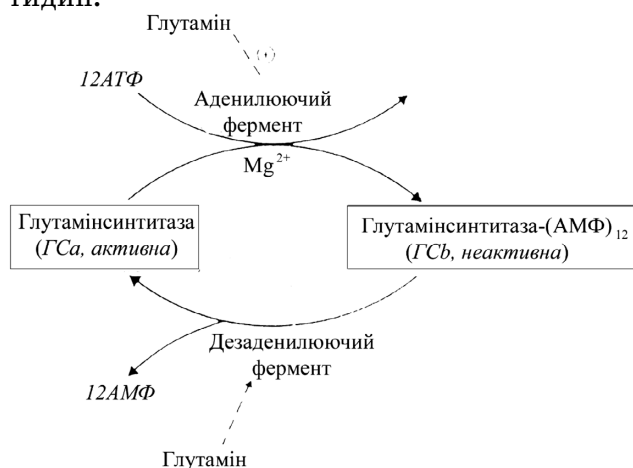


Рис. 5. Регулювання активності глутамінсинтетази шляхом ферментативних перетворень.

Таким же чином, за участі спеціальних ферментів і речовин, що є донорами відповідних функціональних груп, відбувається ацетилювання, гідроксилювання, аденилювання, урідилування, фосфорилювання, АДФ-рибозилування тощо. Є приклади, коли білки піддаються ковалентній модифікації під час рибосомального їх синтезу. Наприклад, синтез проколагена на рибосомах завершується його гідроксилюванням з утворенням білка з оксипроліном і оксилізином. Але в більшості випадків, білки модифікуються після їх синтезу.

Постсинтетична ковалентна модифікація може призводити до цілого ряду змін властивостей ферментів: кінетичних, стійкості до протеолізу, а також до зміни їх компартменталізації. Термін життя окремих видів модифікацій теж різний: наприклад фосфорилювання зберігається хвилини, аденилювання і ацетилювання – декілька годин, днів, а метилювання і гідроксилювання може зберігатися все життя. Слід відмітити, що ковалентній модифікації піддаються не лише білки, але і поліпептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди. Властивості цих полімерів також змінюються. Оскільки хімічна модифікація білків відбувається, як правило, за участю макроергічних сполук, то ці реакції термодинамічно незворотні. В клітині модифікуючі групи знімаються з білків за участю спеціальних ферментів, які теж піддаються регулюванню, тобто, активність ферментів регулюється шляхом ферментативного взаємоперетворення. Одним з швидких і широко розповсюджених процесів хімічної

модифікації білків є їх фосфорилювання-дефосфорилювання, які каталізують ц-АМФ-, ц-ГМФ-, Са-кальмодулін-, диацилгліцеринзалежні протеїнфосфокінази і фосфопротеїнфосфатази. Донором фосфатних груп слугує переважно АТФ і фосфорилюються ОН- групи серину і треоніну, значно рідше ОН – групи тирозину регулюємих білків.

Конкретні приклади таких реакцій розглядаються як механізм передачі інформації від мембранних рецепторів шляхом включення каскадних ферментних систем підсилення зовнішньоклітинних сигналів.

5. Регулювання активності ферментів шляхом часткового протеолізу білків.

За цим механізмом відбувається незворотне регулювання ферментів шляхом обмеженого протеолізу білків. Багато білків-ферментів синтезуються в неактивній формі у вигляді проферментів (зимогенів). В активну форму вони переходять після відщеплення від них окремих молекул або фрагмента поліпептидного ланцюга. У пептидах, що залишаються після часткового протеолізу, відбуваються конформаційні зміни, які призводять до створення активної форми білка-фермента. Це дозволяє клітині швидко і без додаткового підсилення процесів транскрипції або трансляції збільшувати концентрацію активного білка у відповідь на регуляторний сигнал. Існує думка, що синтез молекули білка з великою молекулярною масою необхідний для формування відповідної третинної структури. Після утворення водневих або сульфгідрильних зв'язків, які стабілізують структуру, частина поліпептидного ланцюга виявляється функціонально непотрібною і вона відщеплюється протеазами. Цей регуляторний механізм функціонує при утворенні активних форм більшості протеолітичних ферментів: активних протеаз фібрінолітичної системи, травного каналу – пепсину, трипсину, хімотрипсину, які утворюються з пипсиногену, трипсиногену, хімотрипсиногену, проінсуліну тощо.

6. Регулювання активності ферментів шляхом білок-білкової взаємодії.

Останнім часом широко вивчаються і дискутуються питання регуляції ферментативної активності за участю спеціальних, не виявляючих ферментативної активності білків шляхом білок-білкової взаємодії. Прикладами таких білків можуть бути кальмодулін, ГТФ-зв'язуючі білки (G-білки), інгібітори протеїназ (стрептокіназа), антигемофільний глобулін А та інші. Кальмодулін (КМ)-Са-чутливий білок, який є хімічним сенсором зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Зв'язуючи чотири іони Ca^{2+} , кальмодулін стає здатним активувати багато фермент-

них і неферментних білків, зокрема фосфодіестерази циклічних нуклеотидів, легких ланцюгів міозину, іонних каналів тощо. Так, в багатьох тканинах функціонує фосфодіестераза -ФДЕ-1, яка безпосередньо активується Ca^{2+} -КМ. На гомогенних препаратах фермента показано, що її молекула включає дві ідентичні субодиниці з мол. масою 57 кД. За умов зв'язування Ca^{2+} з кальмодуліном, дві молекули його приєднуються до субодиниць ФДК-1. Після утворення такого комплексу активність ФДЕ-1 підвищується у 6-10 разів. Зниження концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі спричинює дисоціацію цього катіону від кальмодуліну, білок-білковий комплекс розпадається і ФЕД втрачає активну форму (рис.6).

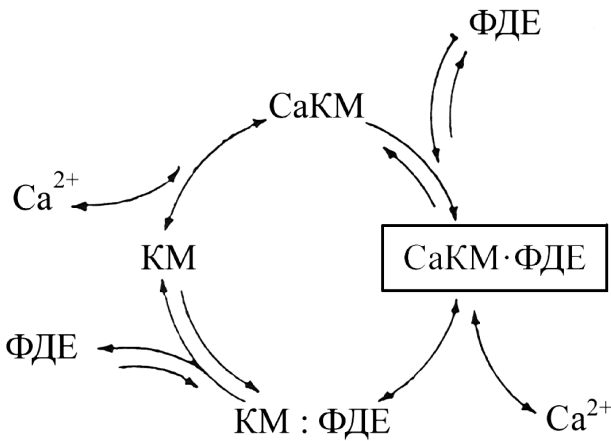


Рис. 6. Схема регулювання активності фосфодіестерази(ФДЕ-1) кальмодуліном(КМ) та іонами Ca^{2+} .

Значна кількість агоністів зв'язуються з рецепторами плазматичних мембран клітин, які спряженими з ГТФ-зв'язуючими білками (G-білками). В даний час виділено біля 100 таких рецепторів. G-білки складають суперсімейство афінних ГТФ-фосфогідролаз. Це периферійні тетрамерні білки, в склад яких входять α, β, γ -субодиниці зі своїми характерними особливостями. ГТФ-гідролазну активність виявляє γ - субодиниця, яка, після зв'язування з ГТФ дисоціює від α, β - димеру, що залишаються зв'язаними з мембранами (рис. 7). При гідролізі ГТФ G-білки переходять з активного в неактивний стан, що виявляється в зміні процесу їх взаємодії з іншими макромолекулами.

Крім мембранозв'язаних G-білків є велика група низькомолекулярних ГТФ-зв'язуючих білків (gas-білки, білки які приймають участь у внутрішньоклітинному транспорті), фактори ініціації та інші. На сьогодні виявлено уже більше десяти спряжених з рецепторами ГТФ-зв'язуючих білків. Серед них

є такі, що активують (Gs) або інгібують (Gi) аденілатциклазу, регулюють активність фосфоліпазу C, фосфоліпазу A, тощо.

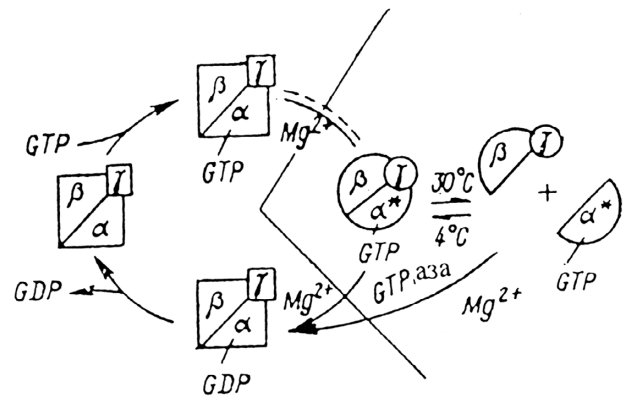


Рис.7. Схема регуляторного циклу G-білків.

Останнім часом виявилось, що кожний G-білок може контролювати більше однієї ферментної системи і зв'язаних з ними біологічних ефектів, якими можуть бути ферменти або іонні канали (рис.8).

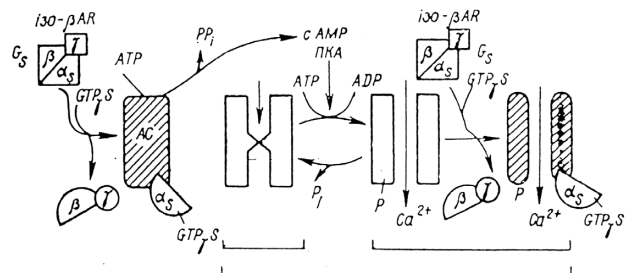


Рис. 8. Подвійний ефект G-білків-стимуляція аденілатциклази та модуляція потенціал залежних Ca^{2+} -каналів.

Шляхом білок-білкової взаємодії α -макроглобулін та α_1 -антитрипсин інактивують серинові та інші протеїнази. Антигемоліній глобулін А (фактор VIII згортальної системи крові) бере участь в активації фактора X, який запускає весь коагуляційний каскад і призводить до формування фібринового згустка. Спадкова недостатність гемофільного глобуліну А виявляється схильністю до кровотечі – гемофілії.

Є приклади цільового застосування білків бактеріального походження (стрептокіназа, яка не є ферментом) для регулювання активності протромбіну і системи фібринолізу.

7. Регуляторний вплив іонів на активність ферментів.

Для більшості елементів періодичної системи доведено їх взаємозв'язок з активністю ферментів, які виявляють свій вплив за різними механізмами. Близько однієї третини

відомих ферментів вимагають для виявлення максимальної активності або додавання іону метала, або ці ферменти мають в своєму складі міцнозв'язані іони металів, які приймають участь в каталітичних процесах. Застосування удосконалених методів аналізу металів в біологічних системах дозволили виявити значну кількість ферментів, які відносяться до металопротеїнів. Краще вивчена необхідність катіонів для виявлення активності ферментів— H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФ-аз. Більшість дегідрогеназ, кіназ, фосфатаз виявляють максимальну активність в присутності Mg^{2+} . Активуючу дію на окремі ферменти виявляють Rb^+ , Cs^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , NH_4^+ , Zn^{2+} .

Функції, які виконують іони металів у ферментативному каталізі досить різні.

В одних випадках іони утворюють комплекси з лігандами (субстратами, коферментами), формують місткові ліганди, зв'язуючись лише з лігандами і беруть участь в каталізі, не взаємодіючи безпосередньо з ферментами, наприклад Mn^{2+} в лейцинамінотрипептидазі, Zn^{2+} в карбоксипептидазі. Комплекси металів з містковими лігандами характерні для багатьох ферментів, що взаємодіють з комплексами метал- нуклеотиди і -нуклеотидфосфати, наприклад, для креатинкінази, аргінінкінази, аденілаткінази та тетрагідрофоліатсинтеази. В більшості випадків АДФ $^{3-}$ · АТФ $^{4-}$ мають майже однакову спорідненість до ферментів, як і активний комплекс Mg^{2+} -нуклеотид, але вони діють і як інгібітори реакцій. Отже, роль іона метала в таких випадках полягає в активації атома фосфору, за яким відбувається каталітична атака з утворенням комплексу фермент-ліганд-метал. Метал забезпечує взаємодію апофермента з коферментом, як це продемонстровано на алкогольдегідрогеназі печінки—НАД з цинком.

Друга можливість участі іонів металів у ферментативному каталізі зводиться до утворення комплексів з субстратами, в яких центром зв'язування ліганда частково або цілком є іон металу: метал- фермент-субстрат. Такі приклади описані також для активації аргінази, пептидаз і багатьох інших металзалежних ферментів.

Безпосередня участь металів в акті каталізу часто зводиться до переносу електронів (Fe^{3+} в феродокиназах, Mo^{2+} в нітратредуктазі та ін.).

Іони металів можуть зв'язуватись не з активними центрами фермента, а з алостеричними. Така взаємодія призводить до індукції зміни активного центра фермента, або до його стійкості і в цілому до стабілізації конформації білка, або забезпечує асоціацію його субодиниць.

Слід відмітити, що окремі ферменти для каталітичної активності вимагають наявності декількох іонів. Це може бути обумовлено тим, що в механізмі каталіза можуть брати участь декілька типів комплексів і з різними металами. Так, наприклад, для КоА-синтеази необхідні три іони метала. Ксантиносидаза має в своєму складі дві білкові субодиниці, дві молекули ФАД, два атоми молібдену і вісім атомів заліза. Молібден безпосередньо бере участь в каталітичному окисленні гіпоксантину і ксантину ксантиноксидазою. Різні феродокинази містять залізо-сірчані комплекси. Існує також антагонізм іонів при їх дії на ферменти, наприклад, антагонізм поміж Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} та Ca^{2+} , K^+ і Na^+ .

8. Роль мембран в регулюванні активності ферментів.

Відомо, що клітини живих організмів являють собою систему мембран, усі компоненти цитоплазми, в тому числі ферменти, мають чітку організацію на мембранах або вмонтовані у них.

Як кооперативні, надмолекулярні структури мембрани виявляють суттєвий вплив на активність ферментів шляхом компартменталізації, рецепції, контактних взаємодій клітинних поверхонь, транспортування речовин тощо.

У зв'язку з цим, стан біомембран виявляється дуже важливим регуляторним фактором на рівні біосинтезу білків, а також функціонування їх у постсинтетичний період. В регулюванні активності мембранозв'язаних ферментів мають велике значення біохімічні та фізико-хімічні властивості мембранного матриксу, зокрема ліпідів, ліпід-білкових взаємодій, та впливу зовнішніх факторів—Т, Р, рН, І, Д.

Відомо, що за відповідних фізіологічних станів організму в мембранах відбувається перехід ліпідних складових з рідинно-кристалічного в кристалічний стан, або ж навпаки. Визначальними параметрами при цьому є довжина вуглеводневих ланцюгів, ступінь їх насиченості і розгалуженості, положення подвійних зв'язків, природа їх зв'язків з полярною частиною ліпідних молекул, а також ступінь окисненості жирнокислотних залишків. Ліпіди беруть також участь у фіксації білків на (або в) мембранах, сприяють ізолюванню білків, зокрема ферментів. Ліпіди є неполярним середовищем для жиророзчинних субстратів, носіїв і кофакторів, забезпечують орієнтацію білків при утворенні мембран, зумовлюють їх конформаційні зміни а також виступають в якості регуляторів і модуляторів ферментативної активності. Вплив ліпідів на актив-

ність мембранозв'язаних ферментів виявляється через цілий ряд дій—електростатичних, дисперсійних, стеричних тощо.

Зміна ступеню насиченості жирних кислот мембранних ліпідів при їх кристалізації може зумовлювати зміни глибини занурення ферментів у мембранний матрикс, а звідси визначати доступ субстрата до активного центра. Кінетичні параметри мембранозв'язаних ферментів суттєво змінюються при переході їх у розчинний стан: трансмембранні ферменти втрачають активність, а повехнезов'язані можуть її підвищувати. Вивчення кінетичних параметрів солюбілізованих з мембран ферментів вимагає наявності штучних ліпідних мембран. Має також значення величина поверхневого заряду мембран, яка залежить від адсорбції катіонів і аніонів, значення рН, від природи та концентрації електролітів тощо. Важливе значення має питома упорядкованість молекул води поблизу поверхні розділення фаз або поверхні мембрани. Звідси, не виключено, що ряд аномалій в кінетичній поведінці мембрано-зв'язаних ферментів, які спостерігаються при зміні температури, цілком можуть бути наслідком структурних переходів води, структурованої поблизу поверхні розділу фаз. Доведено, що мембрани

впливають на швидкість перебігу неферментативних реакцій, наприклад, хелатування АТФ з іонами кальцію або магнію. Це веде до локальних змін концентрації реагуючих речовин та швидкості ферментативних реакцій в цілому, що визначається наявністю гомогенного і гетерогенного каталізу (рис.9).

Аналіз кінетики мембранозв'язаних ферментів свідчить про те, що кількість продукту, який утворюється при каталізі, залежить не тільки від вихідної концентрації субстрату, але і від коефіцієнта його дифузії. У зв'язку з цим виникають питання можливої достовірності використання гомогенної кінетики, розробленої на прикладах простих розчинних ферментів.

Якість і швидкість гетерогенного біохімічного процесу, який каталізують мембранозв'язані ферментами, залежить, щонайменше, від співвідношення двох процесів: дифузії субстрату до поверхні мембранного матриксу і власне ферментативної реакції. У цьому випадку з недостатньою імовірністю можна використовувати кінетичний апарат, розроблений Михаелісом – Ментен, а необхідно застосовувати інші, більш складні розрахунки.

Вплив зовнішніх факторів

(T, P, pH, I, D)

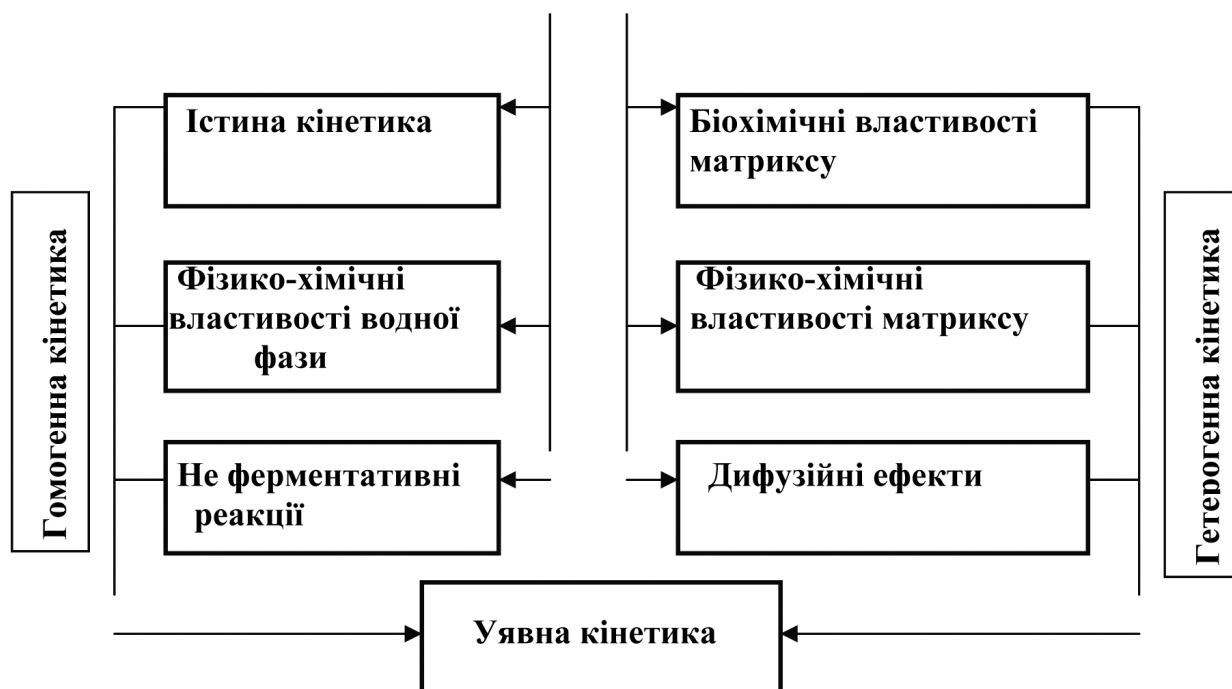


Рис. 9. Схема впливу зовнішніх факторів на гомогенну та гетерогенну кінетику мембранозв'язаних ферментів.

9. Нейрогуморальне регулювання активності ферментів.

В еволюційному розвитку у багатоклітинних організмів виникла необхідність отримувати інформацію відносно протікання фізіологічних і метаболічних процесів в одній, в сусідніх клітинах, тканинах, органах багатоклітинних організмів та узгоджувати їх. Регулювання метаболізму за цих умов забезпечується за участю аутокринної, паракринної, ендокринної та нейрогуморальної систем—за участю нейромедіаторів, гормонів, інтерлейкінів, факторів росту, які узгоджують хімічні реакції в часі, швидкості і за місцем протікання внутрішньо- і зовнішньоклітинних процесів.

Що стосується суті нейрогуморального регулювання активності ферментів, то воно зводиться до використання всіх існуючих (вище розглянутих), без створення нових, механізмів. Таким чином, переважна більшість біологічних і фармакологічних активних речовин (гормони, нейромедіатори, цитокіни, фактори росту, отрути, токсини, лікарські препарати та інші) діють на функціональну та метаболічну (ферментативну) функцію клітини за одним із наступних механізмів: зміни концентрації ферментів в

клітинах шляхом їх синтезу або деградації; зміни мембранної компартменталізації ферментів, субстратів, ефекторів в клітинах або в клітинному ансамблі; зміни проникливості мембран для іонів, коферментів, метаболітів. Підсилення або ослаблення каталітичної активності ферментів досягається, частіше всього, шляхом синтезу і післясинтетичної їх модифікації. Регулювання індукції і репресії синтезу білків контролюється, головним чином, стероїдними і тиреоїдними гормонами. Представники нейрогуморального регулювання, які діють через систему рецепторів—вторинних посередників в клітинах можуть впливати не лише на каталітичну активність ферментів, але і змінювати компартменталізацію речовин, ідукцію-репресію синтезу білків, змінювати проникливість мембран. В принципі дія окремих факторів зовнішнього середовища, біологічно активних сполук повинна реалізуватись через відповідну або головну сигнальну систему, яка переважно визначає формування клітинної відповіді. При дії кількох факторів (а в окремих випадках навіть при дії одного) в клітинах активуються кілька сигнальних систем, і тоді важливим для формування відповіді клітини стає взаємодія цих систем (рис.10).

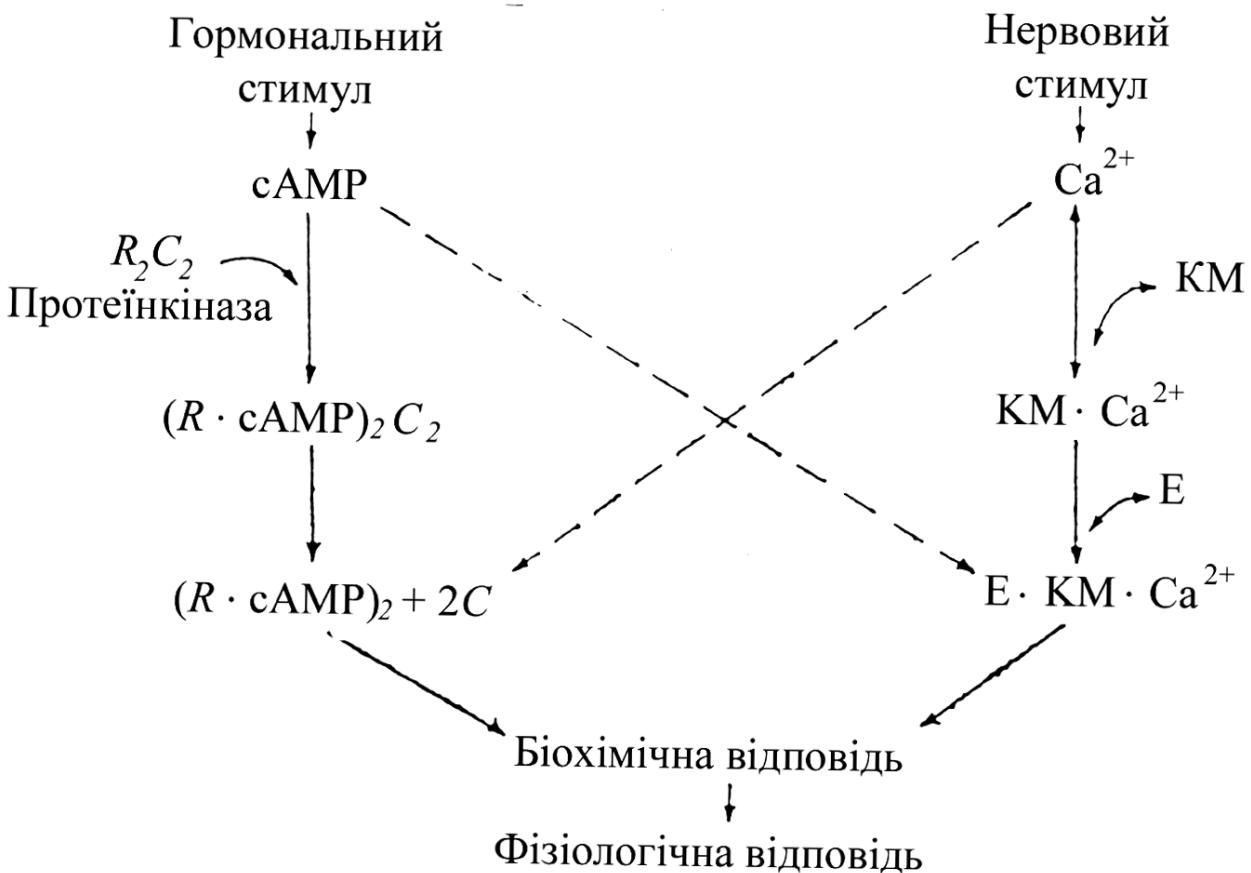


Рис. 10. Реалізація гормонального та медіаторного регуляторних сигналів за участю cAMP , Ca^{2+} , протеїнкіназ і кальмодуліну. Пунктирними лініями показано регуляторний вплив cAMP на Ca^{2+} -залежні ферменти і, навпаки, вплив Ca^{2+} на cAMP -залежні.

Заключення.

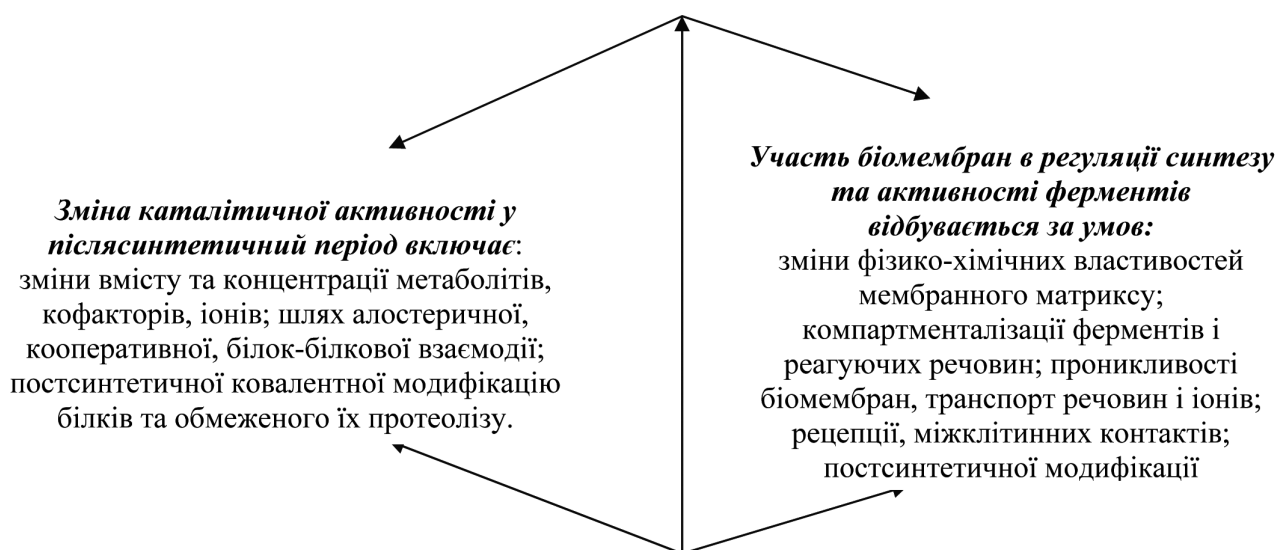
Жива клітина – це відкрита система, яка постійно обмінюється речовинами і енергією з зовнішнім середовищем. В лютий момент життя в клітині протікає безліч різноманітних хімічних реакцій. Всі вони чітко узгоджені поміж собою в часі, швидкості та за місцем протікання. Ця узгодженість і упорядкованість всіх процесів відбувається завдяки наявності складних різноманітних внутрішньоклітинних, міжклітинних та зовнішньоклітинних механізмів регулювання активності ферментів.

Для впливу на відповідний метаболічний шлях (цикл) ферментативного каталізу достатньо регулювати активність ферменту, який каталізує найбільш повільну стадію – *ключову*. Активність ключового фермента регулюється на трьох незалежних рівнях:

а) – *контроль транскрипції на генетичному рівні*; б) – *контроль на рівні взаємоперетворень ключового ферменту при метаболічній потребі* (за умов дії відповідних сигналів, опосередкованих вторинними месенджерами) активуючий фермент (E_1) переводить ключовий фермент в каталітичноактивну форму. Коли потреба в цьому зникає, інактивуючий фермент (E_2) переводить ключовий фермент в неактивну форму (наприклад фосфорилювання протеїнкіназами і дефосфорилювання фосфатазами); в) – *модуляція лігандами* (субстратами, кінцевими продуктами, кофакторами та іншими ефекторами), які зв'язуються в активному центрі ключового фермента.

Схематично загальну систему регулювання активності ферментів можна представити в слідуєчому вигляді (рис.11).

На першому етапі активність ферментів регулюється зміною їх концентрації шляхом синтезу і гідролізу.



Регуляція і інтеграція ферментів, упорядкованість і узгодженість фізіологічних та метаболічних процесів відбувається за участю нейромедіаторів, гормонів, цитокінів, факторів росту та інших біологічно-активних речовин.

Рис. 11. Загальна схема регулювання активності ферментів.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Курський М.Д. Шляхи і механізми регуляції активності ферментів / Курський М.Д. – Чернівці: Медуніверситет, 2005. -52 с.
2. Молекулярні механізми інтеграції метаболізму / [Великий М.М., Старикович Л.С., Климишин Н.І. та ін.]–Львів, 2007.–220 с.

УДК 517.151.4**К** 54**РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ****Курский М.Д., Корженко Е.М.**

Резюме. Суммированы и проанализированы данные относительно механизмов регуляции химических реакций, которые протекают и составляют основу метаболизма живого организма. Рассмотрены механизмы регуляции активности ферментов на уровне изменения их концентраций путем синтеза и протеолиза белков. В постсинтетический период активность ферментов регулируется путем изменения концентрации субстратов, коферментов, эффекторов; путем возникновения аллостерических центров, кооперативности; путем ковалентной модификации, частичного протеолиза, белок-белковых взаимодействий, участия биологических мембран.

Нейро-гормональное регулирование активности ферментов осуществляется путем использования всех описанных (без создания новых) механизмов.

Ключевые слова: ферменты, регуляция, кооперативность, аллостерия, кинетика, мембраносвязывание.

UDC 517.151.4**К** 54**REGULATION of ACTIVITY of ENZYMES****Kurskiy M.D., Korzhenko O.M.**

Summary. Some information about mechanisms of regulation of chemical reactions which run and form the foundation of metabolism of a living organism has been summarized and analysed. Mechanisms of enzymes activity regulation on the level of changing of their concentration by means of synthesis and proteolises of proteins are considered. In the postsynthetic period the activity of enzymes is regulated by means of substrates, coenzymes, effectors concentration changes, the presence of allosteric centres, cooperativity, covalently modification, protein-proteins interactions, partial proteolysis, a participation of biological membranes. Neurohormone-containing regulation of enzymes activity is fulfilled by means of using all described (without creation of new) mechanisms.

Key words: enzymes, regulation, cooperativity, allosteric, kinetic, membrane-bound.

Стаття надійшла 11.01.2010 р.