

# Лекція 8 Алостеричні ферменти

## Питання для розгляду

Структура алостеричних ферментів

Сигмоїдна кінетика

Наявність ефекторів

Двофазний ефект конкурентних інгібіторів

Особливість дії денатуруючих агентів

Кооперативність

Біологічне значення алостерії. Переваги алостеричних ферментів з позитивною кооперативністю в регуляції метаболічних шляхів в клітині.

Алостеричними ферментами називають ферменти, активність яких регулюється не тільки кількістю молекул субстрату, але й іншими речовинами, званими ефекторами.

Алостеричними ефекторами часто є метаболіти саме того шляху, регуляцію якого вони здійснюють.

*Роль алостеричних ферментів у метаболізмі клітини.* Алостеричні ферменти відіграють важливу роль у метаболізмі, так як вони надзвичайно швидко реагують на найменші зміни внутрішнього стану клітини. Алостерична регуляція має велике значення в таких ситуаціях:

- при анаболічних процесах. Інгібування кінцевим продуктом метаболічного шляху і активація початковими метаболітами дозволяють здійснювати регуляцію синтезу цих сполук;
- при катаболічних процесах. У разі накопичення АТФ у клітині відбувається інгібування метаболічних шляхів, що забезпечують синтез енергії. Субстрати при цьому витрачаються на реакції запасання резервних поживних речовин;
- для координації анаболічних і катаболічних шляхів. АТФ і АДФ – аллостеричні ефектори, що діють як антагоністи;
- для координації паралельно протікають і взаємозалежних метаболічних шляхів (наприклад, синтез пуринових і піримідинових нуклеотидів, що використовуються для синтезу нуклеїнових кислот). Таким чином, кінцеві продукти одного метаболічного шляху можуть бути алостеричними ефекторами іншого метаболічного шляху.

Алостеричні ефектори. Ефектор, що викликає зниження (інгібування) активності ферменту, називають негативним ефектором, або інгібітором. Ефектор, що викликає активацію ферментів, називають позитивним ефектором, або активатором.

Алостеричними ефекторами часто служать різні метаболіти. Кінцеві продукти метаболічного шляху - часто інгібітори алостерических ферментів, а вихідні речовини - активатори. *Це так звана гетеротропная регуляція.* Такий вид алостеричної регуляції дуже поширений в біологічних системах.

Більш рідкісний випадок алостеричної регуляції, коли сам субстрат може виступати в якості позитивного ефектора. Така регуляція називається гомотропної ( ефектор і субстрат - одна і та ж речовина). Ці ферменти мають кілька центрів зв'язування для субстрату, які можуть виконувати подвійну функцію: каталітичну та регуляторну. Алостеричні ферменти такого типу використовуються в ситуації, коли субстрат накопичується в надлишку і повинен швидко перетворитися в продукт.

Виявити ферменти з алостеричною регуляцією можна, вивчаючи кінетику цих ферментів. Ці ферменти не підкоряються законам Міхаеліса - Ментен, вони мають характерну S -подібну криву залежності швидкості реакції від концентрації субстрату.

### ***Особливості будови і функціонування алостеричних ферментів:***

- зазвичай це олігомерні білки, що складаються з декількох протомерів або мають доменну будову;
- вони мають алостеричний центр, просторово віддалений від каталітичного активного центру;
- ефектори приєднуються до ферменту нековалентно в алостеричних (регуляторних) центрах;
- алостеричні центри, так само, як і каталітичні, можуть проявляти різну специфічність стосовно лігандів: вона може бути абсолютною і груповий. Деякі ферменти мають кілька алостеричних центрів, одні з яких специфічні до активаторів, інші - до інгібіторів.
- протомер, на якому знаходиться алостеричний центр, - регуляторний протомер, на відміну від каталітичного протомеру, що містить активний центр, в якому проходить хімічна реакція;
- алостеричні ферменти мають властивість кооперативності: взаємодія алостеричного ефектора з алостеричним центром викликає послідовну кооперативну зміну конформації всіх субодиниць, що приводить до зміни конформації активного центру і зміни спорідненості ферменту до субстрату, що знижує або збільшує каталітичну активність ферменту (рис 1);

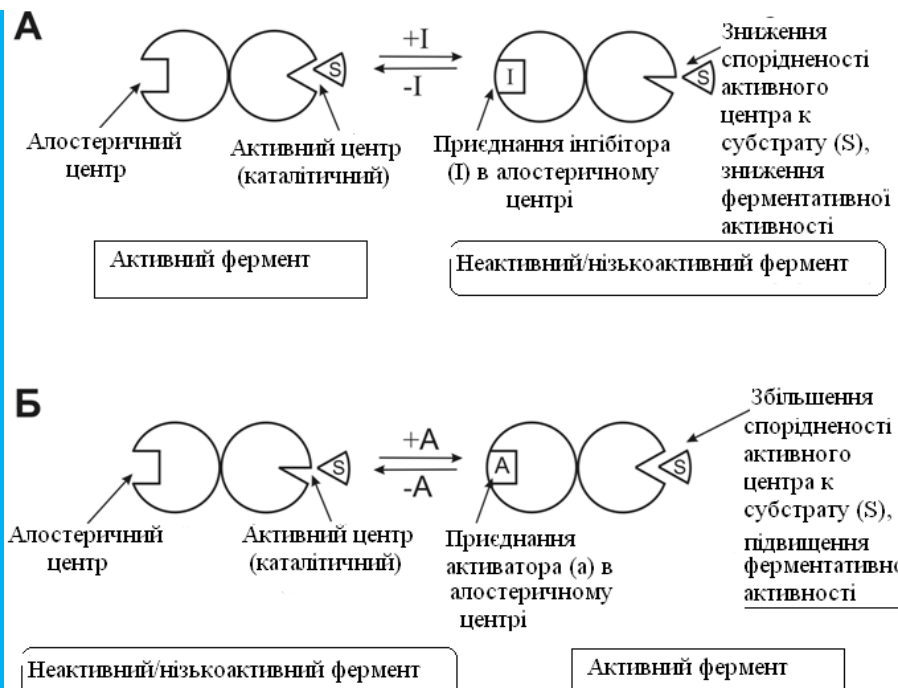


Рис. 1 - Схема, що пояснює роботу алостеричного ферменту. А - дія негативного ефектора (інгібітора); Б - дія позитивного ефектора (активатора).

- регуляція алостеричних ферментів оборотна: від'єднання ефектору від регуляторної субодиниці відновлює вихідну каталітичну активність ферменту;
- алостеричні ферменти каталізують ключові реакції даного метаболічного шляху.

### **Локалізація алостеричних ферментів в метаболічному шляху.**

Швидкість метаболічних процесів залежить від концентрації речовин, що використовуються і утворюються в даному ланцюгу реакцій. Така регуляція представляється логічною, так як при накопиченні кінцевого продукту він (кінцевий продукт) може діяти як алостеричний інгібітор ферменту, що каталізує найчастіше початковий етап даного метаболічного шляху.

### **Структура алостеричних ферментів**

Алостеричні або регулюючі ферменти складаються з декількох субодиниць (чверткова структура), які пов'язані одна з одною слабкими взаємодіями - водневі й гідрофобні зв'язки й мають декілька активних центрів. Алостеричні ферменти існують в активних і неактивних формах, що відрізняються по тривимірній структурі. Алостеричні ферменти часто мають декілька інгібіторів або активаторів, які залучені в перемикання між їхніми активними й неактивними формами

### **Сигмоїдна кінетика**

Графік залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату має вигляд, який називають сигмоїдна або S – образна залежність (рис.2).

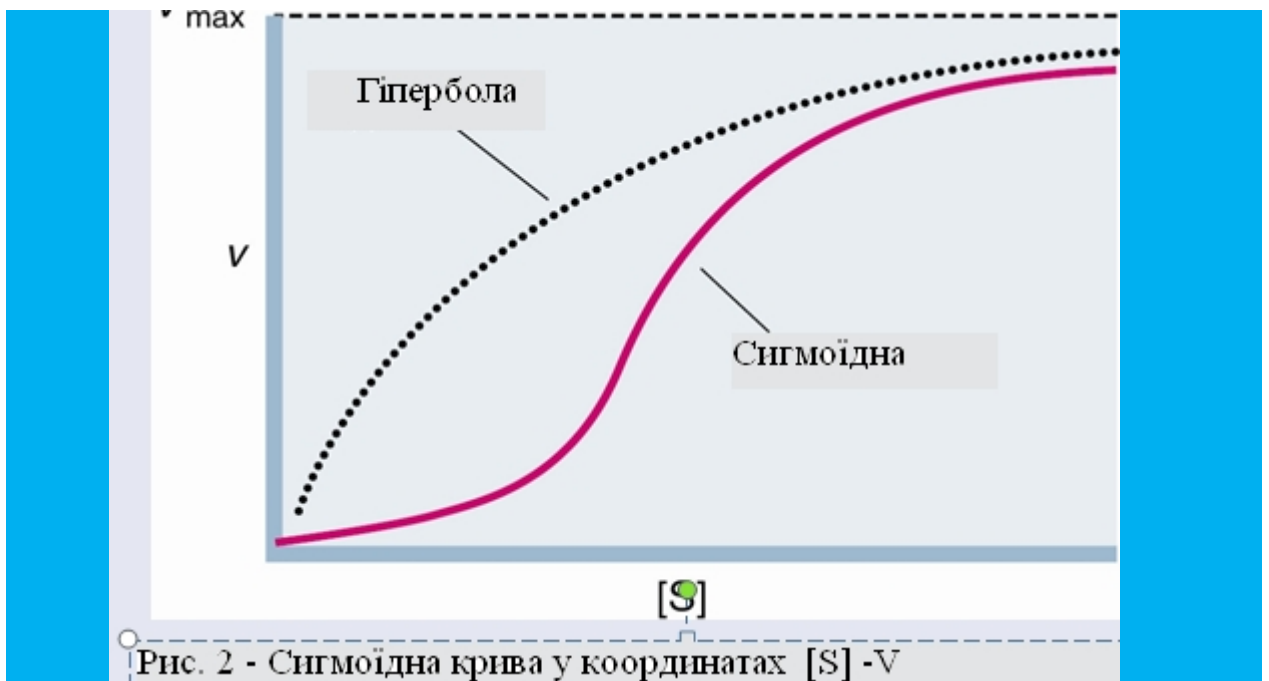


Рис. 2 - Сигмоїдна крива у координатах  $[S]$  -  $V$

Ключовий елемент цієї кривої - "носок" який добре видний при низьких концентраціях субстрату. У цій крапці незначне збільшення концентрації субстрату приводить до відповідно невеликого збільшенню швидкості – невеликий нахил кривої. Подальше незначне підвищення концентрації субстрату визначає непропорційно швидкий, драматично швидкий підйом швидкості й крутизна графіка різко збільшується. В умовах насичення ферменту субстратом графік наближається до гіперболи: крива виходить на плато, досягається максимальна швидкість реакції.

Цей тип графіка свідчить про позитивну кооперативність субстрату. При дуже низьких концентраціях субстрату тільки деякі активні центри ферменту пов'язані із субстратом, у інших активних центрів спорідненість до субстрату низька. Саме тому ми спостерігаємо незначне збільшення швидкості в області носка кривої. Але в міру пов'язання субстрату з ферментом усе більша кількість його залучається до реакції. І це залучення стрімко наростає – крива на графіці різко йде вгору. При насичуючих концентраціях субстрату крива приймає вид гіперболи, лінія вирівнюється. Швидкість реакції наближається до максимальної.

**Наявність ефекторів.** Активатори й інгібітори алостеричних ферментів називають алостеричні ефектори. Існування алостеричних ефекторів - найважливіша властивість алостеричних ферментів. По дії на кінетику алостеричних ферментів, які характеризуються позитивною кооперативністю із субстратом, розрізняють позитивні й негативні ефектори. Присутність позитивного ефектору в різній концентрації збільшує швидкість реакції при даній концентрації субстрату, тоді як інгібітор у різній концентрації зменшує швидкість реакції при тій же концентрації субстрату. Якщо порівняти криві з інгібітором і активатором із кривій без ефектору, то ми побачимо, що інгібітор підсилив сигмовідний характер кривої, подовжив «носок», а активатор укоротив його. При вищій концентрації позитивного ефектору «носок» зовсім зникає, і крива набуває вигляду гіперболи.

К-системи й V-системи ефекторів. Ті ефектори які змінюють  $K_m$  алостеричних ферментів, називають К-системами, а ті які змінюють  $V_{max}$  називають V-системами.

### **Двофазний ефект конкурентних інгібіторів**

Алостеричні ферменти можуть піддаватися нормальному конкурентному гальмуванню. Класичні конкурентні інгібітори характеризуються структурною схожістю із субстратом ферменту. В алостеричного ферменту, для якого характерна позитивна кооперативність із субстратом, конкурентний інгібітор може займати активний центр, і надавати ефект позитивної кооперативності властивий субстрату. За цих умов, низька концентрація конкурентного інгібітору збільшує здібність ферменту до скріплення молекул субстрату й реально збільшує швидкість ферментативної реакції. При вищій концентрації конкурентний інгібітор блокує доступ субстрату до активного центру й гальмує реакцію. Таким чином, ефект конкурентних інгібіторів на алостеричні ферменти двофазний. У низькій концентрації вони активують фермент, діють як субстрати, у високій концентрації – інгібують активність за механізму звичайних конкурентних інгібіторів.

### **Особливість дії денатуруючих агентів**

Денатурація - це втрата ферментом тривимірної структури. Збереження тривимірної структури неодмінна умова прояву ферментативної активності. Денатурація може бути викликана дією безлічі чинників: температура, зміна параметрів рН хімічні реагенти що денатурують. При м'якій дії денатуруючих агентів Алостеричні ферменти можуть втрачати алостеричні властивості – кооперативність до субстрату, але залишати здатність до каталізу. Цей факт показує, що тривимірна структура

а) надзвичайно важлива в механізмі алостерії

б) тривимірна структура алостеричного ферменту – це щось більше ніж просто умова збереження структури активного центру, необхідного для каталізу.

### **Кооперативність**

Чверткова структура важлива для реалізації механізму алостерії. Алостеричний фермент міститиме як мінімум стільки активних центрів, скільки в нього суб'єдинць Прояв кооперативності по відношенню до субстрату – це, перш за все віддзеркалення взаємодії між активними центрами. Так, у типовому алостеричному ферменті, скріплення молекули субстрату в одному активному центрі змінює конформацію інших активних центром таким чином, що вони ефективніше зв'язують субстрат, ніж той, який зв'язав перші молекули субстрату. Це і є прояв позитивної кооперації субстратом.

Субодиниці ферментів можуть легко, як з'єднуватися один з одним, так і дисоціювати та існувати самостійно. Таким чином, алостеричний фермент може існувати в рівновазі між повним ензимом, індивідуальними



субодиницями декількома об'єднаними субодиницями число яких менше ніж у повному ферменті. Окрема субодиниця каталітично неактивна. *Мінімальну структуру, що володіє каталітичною активністю, називають промотор.* Дуже часто наявність лігандів (субстрат, продукти або ефектори) змінює положення рівноваги в системі: повний фермент - субодиниці - асоціації субодиниць.

**Переваги алостеричних ферментів з позитивною кооперативністю в регуляції метаболічних шляхів в клітині.**

Ефект кооперації неодмінно присутній у ферментів, які розташовані на перетині метаболічних шляхів. Це пояснюється тими перевагами, які забезпечує їх позитивна кооперативність із субстратом у регуляції метаболізму. Алостеричні ферменти чутливіші до змін концентрації субстрату, позитивна кооперативність забезпечує досягнення максимальної швидкості при низьких концентраціях субстрату. В умовах функціонування клітини алостеричні ферменти забезпечують підтримку нормального метаболізму в умовах різкої зміни рівня субстрату, наприклад, глюкози.