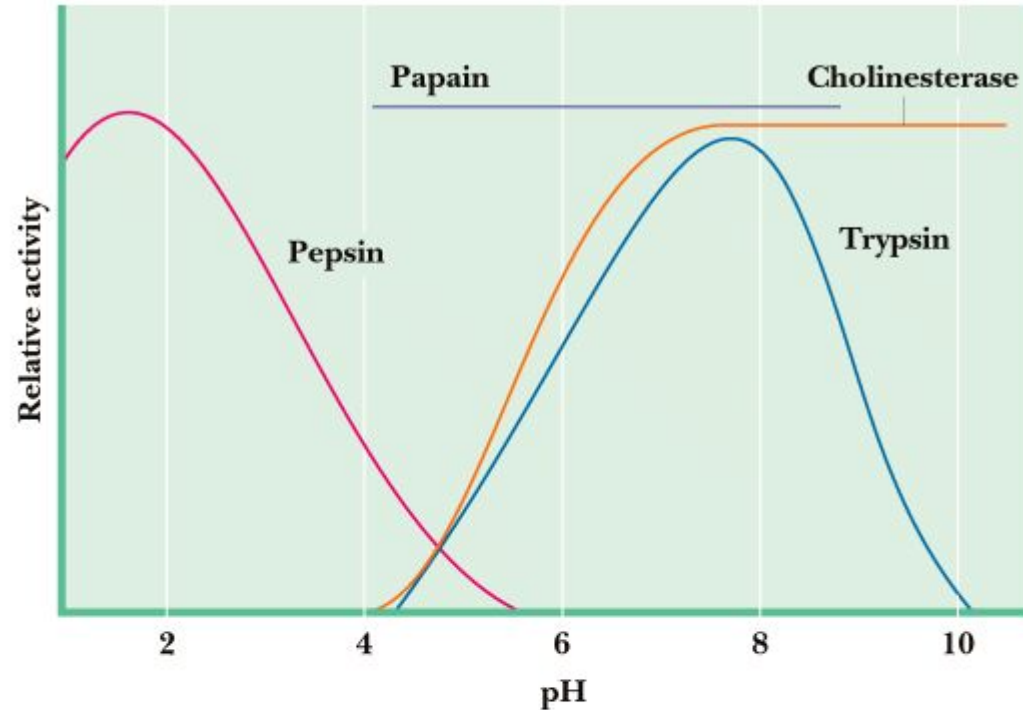


Інгібіювання та регуляція ензимів

Вплив рН на активність ензимів

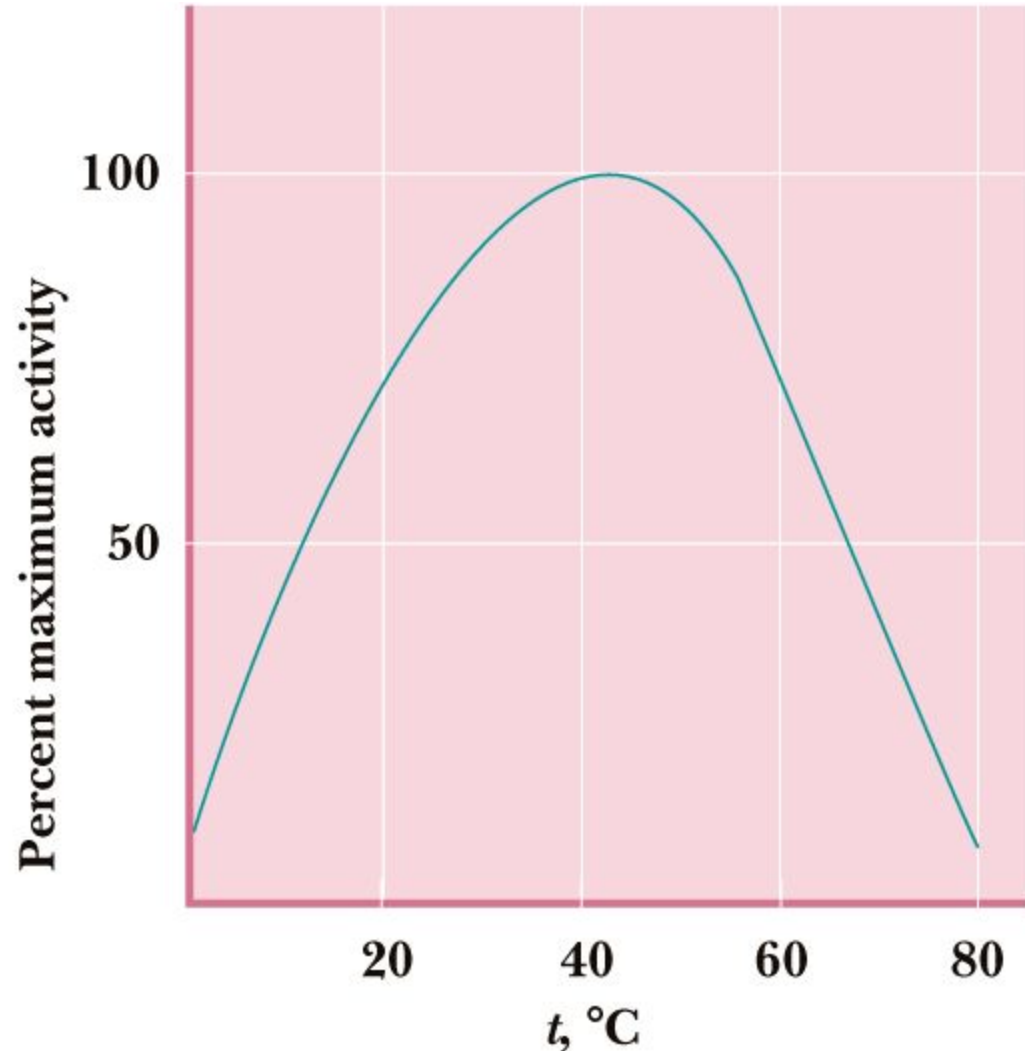
- Оптимальне рН визначається оточуючим середовищем, в якому функціонує ензим
- Більшість ензимів характеризується оптимальним рН, близьким до нейтрального, але існують важливі виключення
- Втрата активності може бути обумовлена
 - розгортання глобули при дуже високих або низьких значеннях рН
 - зміною стану протонування ключових амінокислотних залишків, що беруть участь у каталізі



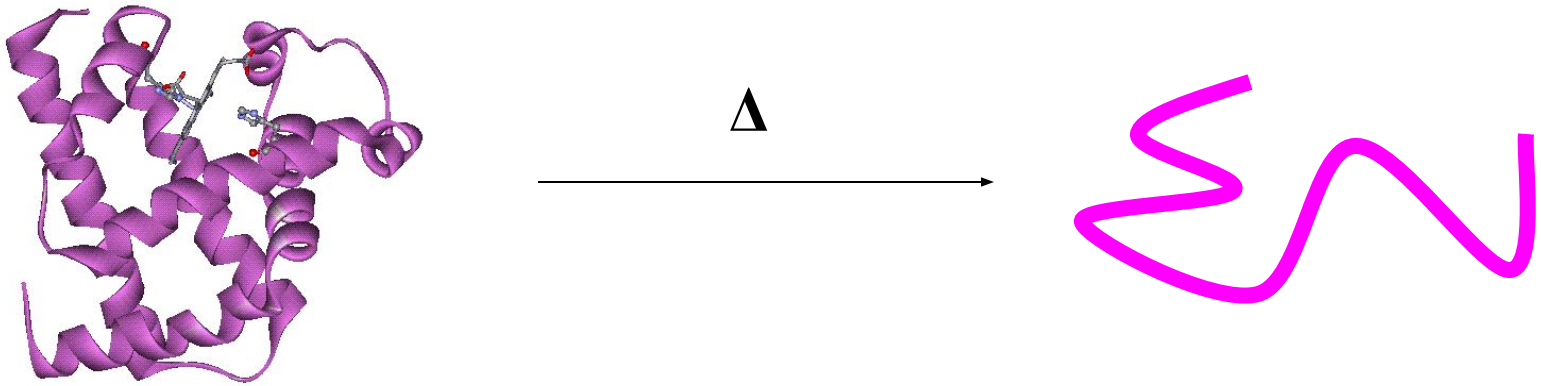
| Ензим | Оптимальний рН |
|----------|----------------|
| Пепсин | 1.5 |
| Каталаза | 7.6 |
| Аргіназа | 9.7 |

Вплив температури на активність ензимів

- **Зниження** температури призводить до уповільнення всіх реакцій
- **Підвищення** температури **збільшує** швидкість реакцій, але до певної межі
- Вище оптимальної температури ензими починають розкручуватися – відбувається термічна денатурація
- Оптимальна температура є величиною відносною:
 - мезофіли ~ 20-55°C
 - термофіли > 70°C
 - екстремофіли > 100°C



Термічна денатурація ензимів



T_m для мезофілів, як правило, $\leq 55^\circ \text{C}$
Для термофілів, як правило, $> 90^\circ \text{C}$

Інгібіювання ензимів

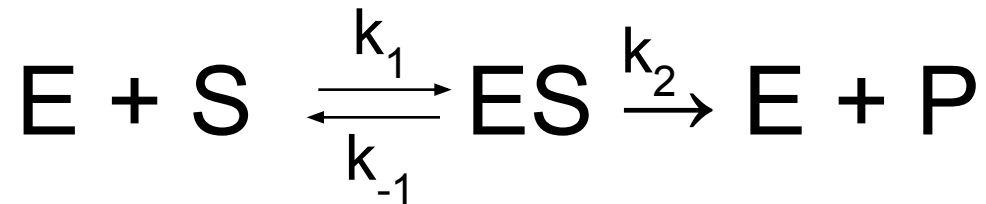
Оборотні інгібітори:

- взаємодіють з ензимами шляхом утворення нековалентних зв'язків
- інгібіювання можна подолати розведенням або діалізом з метою видалення інгібітору

Необоротні інгібітори:

- взаємодіють з ензимами шляхом утворення ковалентних зв'язків
- інгібіювання не можна подолати розведенням або діалізом
- приклади: пеніцилін, зарин, інгібітори ВІЛ-протеази

Типи оборотних інгібіторів



- **Конкурентні інгібітори** – зв'язуються з E, але не з ES
- **Неконкурентні інгібітори** - зв'язуються або з E, або/та з ES
- Їх можна відрізнити шляхом порівнювання графіків Лайнуівера-Берка у присутності різних інгібіторів

Конкурентне інгібування



+

|

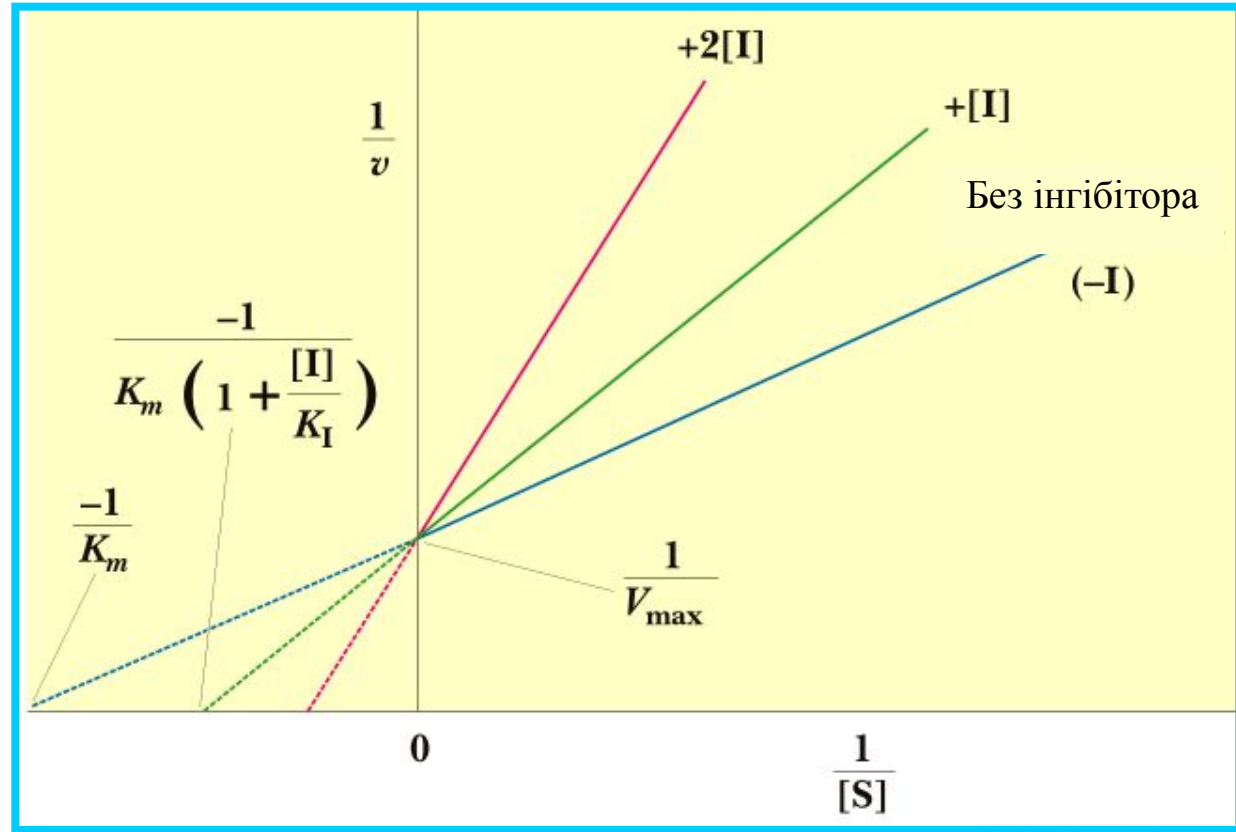
↕

EI

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

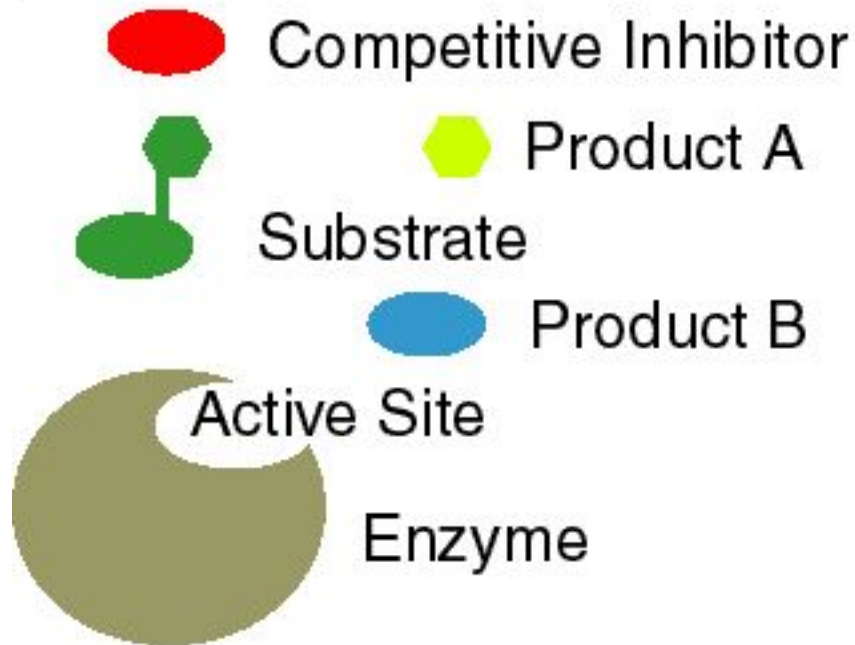
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(1 + [I]/K_i) K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{(1 + [I]/K_i) K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

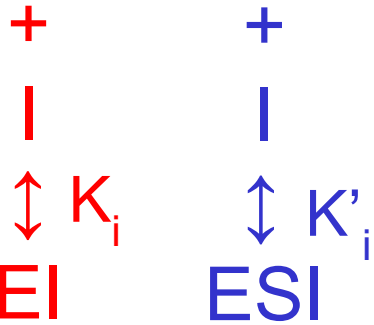


- Конкурентні інгібітори часто структурно подібні до субстрату і зв'язуються у тому ж самому центрі ензиму
- Інгібування можна подолати шляхом збільшення $[S]$
- Конкурентні інгібітори збільшують K_m , але не впливають на V_{\max}
- K_i = концентрації інгібітору, при якій K_m збільшується вдвічі

Конкурентне інгібування



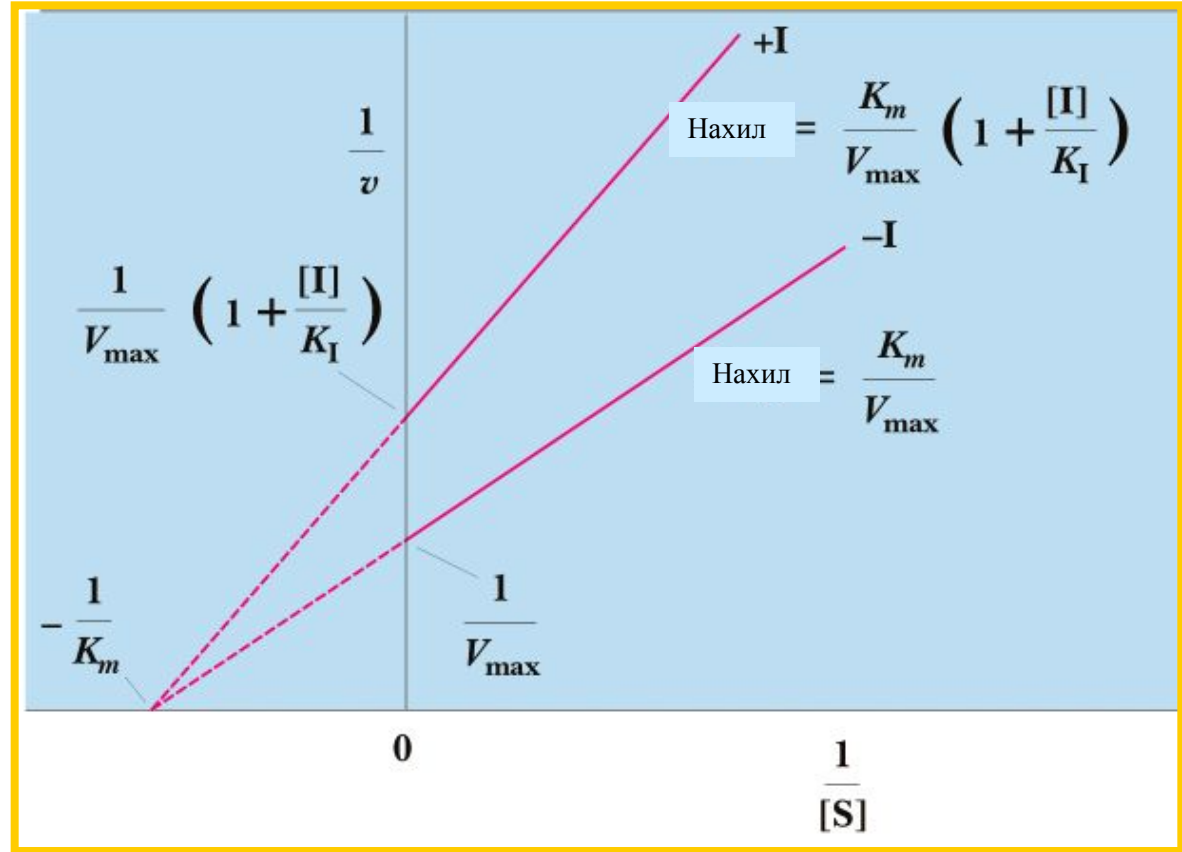
Просте неконкурентне інгібування



$$K_i = K'_i$$

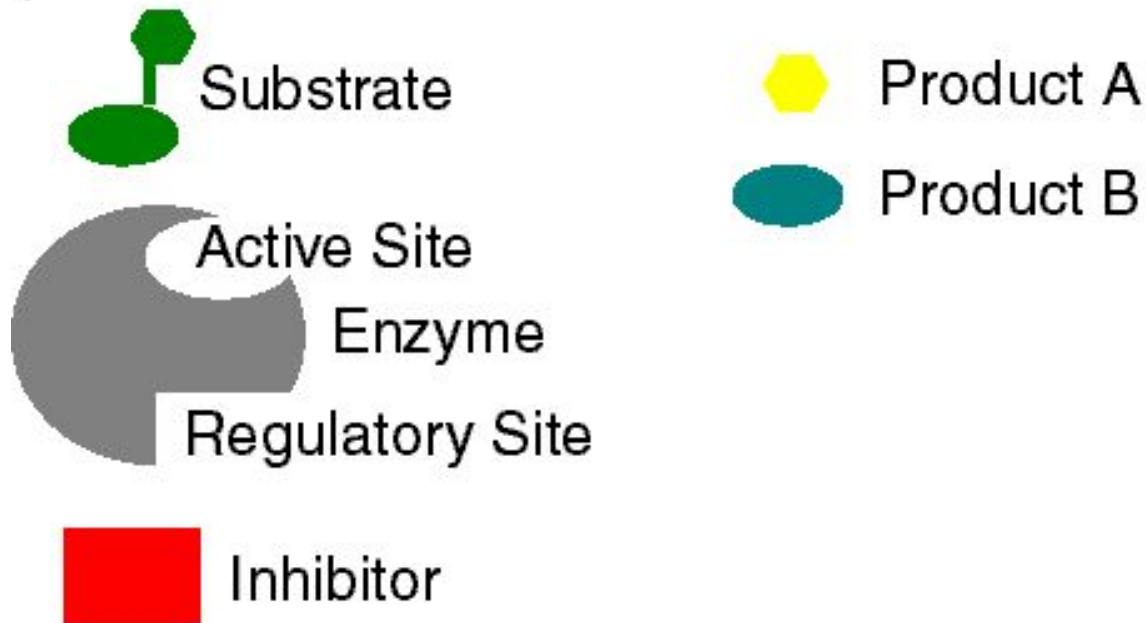
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$V_{\max I} = \frac{V_{\max}}{(1 + [I]/K_i)}$$

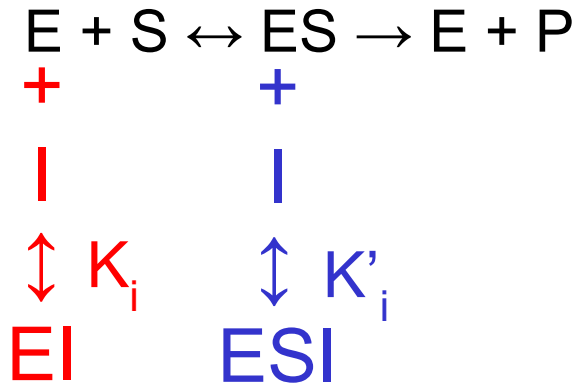


- Неконкурентні інгібітори зв'язуються у іншому центрі, ніж субстрат
- Неконкурентні інгібітори не обов'язково структурно подібні до субстрату
- Неконкурентне інгібування не можна подолати шляхом збільшення $[S]$
- Неконкурентні інгібітори зменшують V_{\max} , але не змінюють K_m
- K_i = концентрації інгібітору, при якій V_{\max} зменшується вдвічі

Неконкурентне інгібування



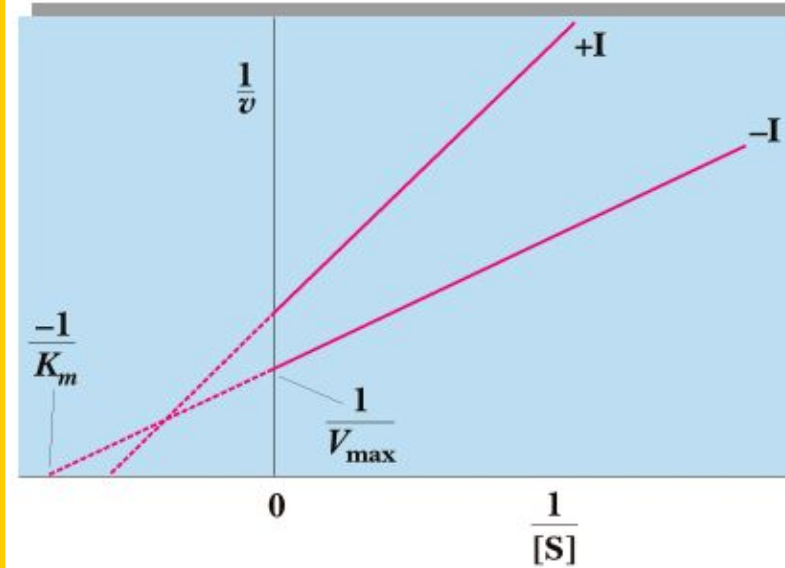
Змішане неконкурентне інгібування



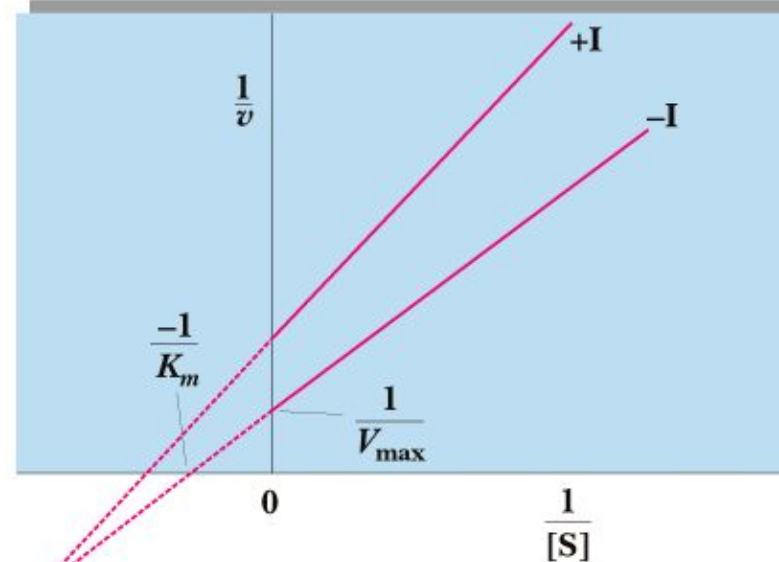
$$K_i \neq K'_i$$

- Центри зв'язування інгібітору і субстрату розташовані близько один від іншого
- Подія, що відбувається на одному центрі, впливає на інший центр
- Це впливає на величини як K_m , так і V_{\max}

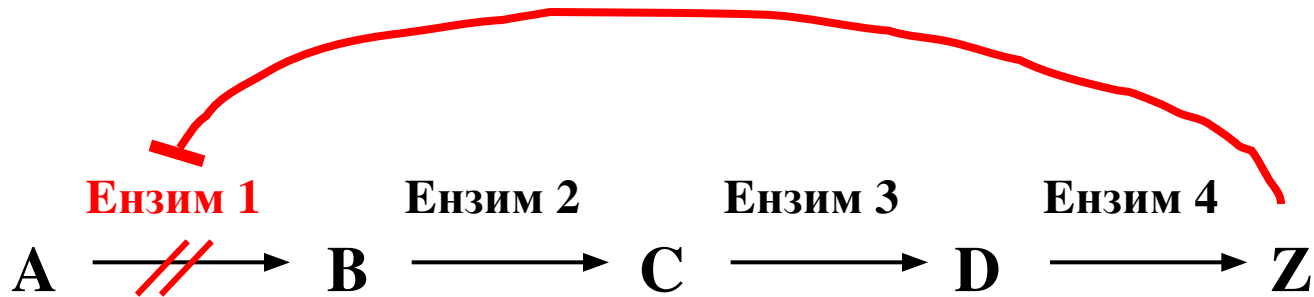
(a) $K_I < K_I'$



(b) $K_I' < K_I$



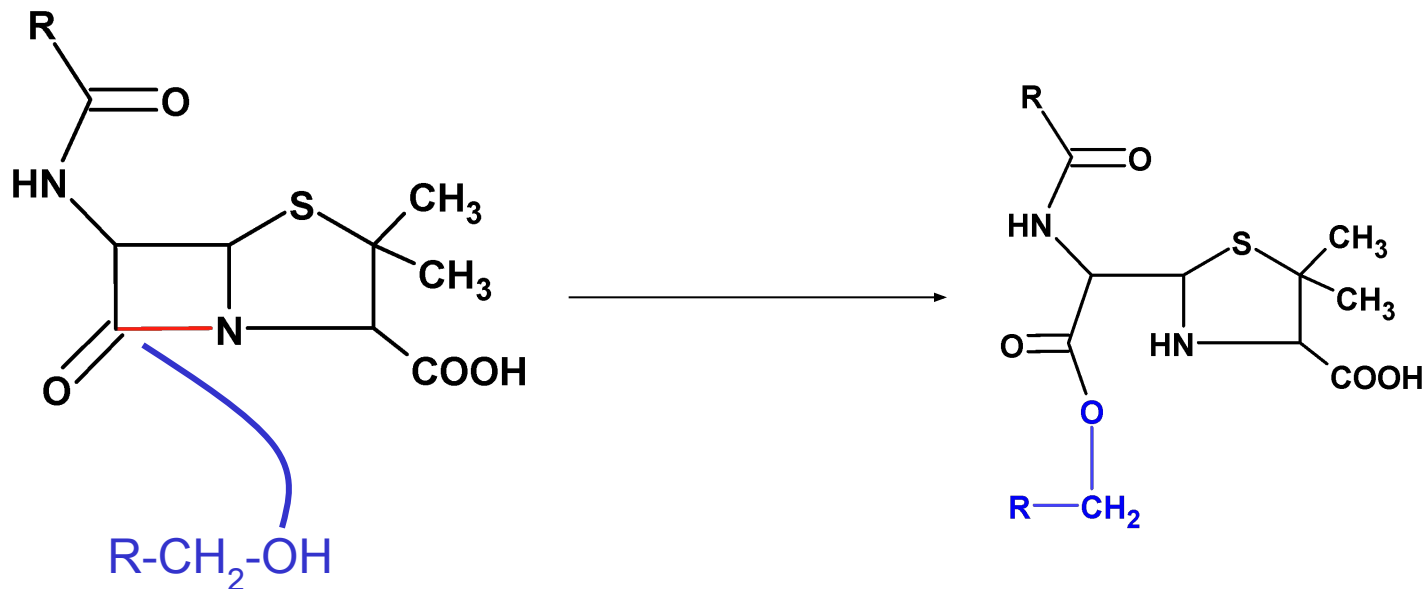
Інгібіювання за принципом негативного зворотного зв'язку

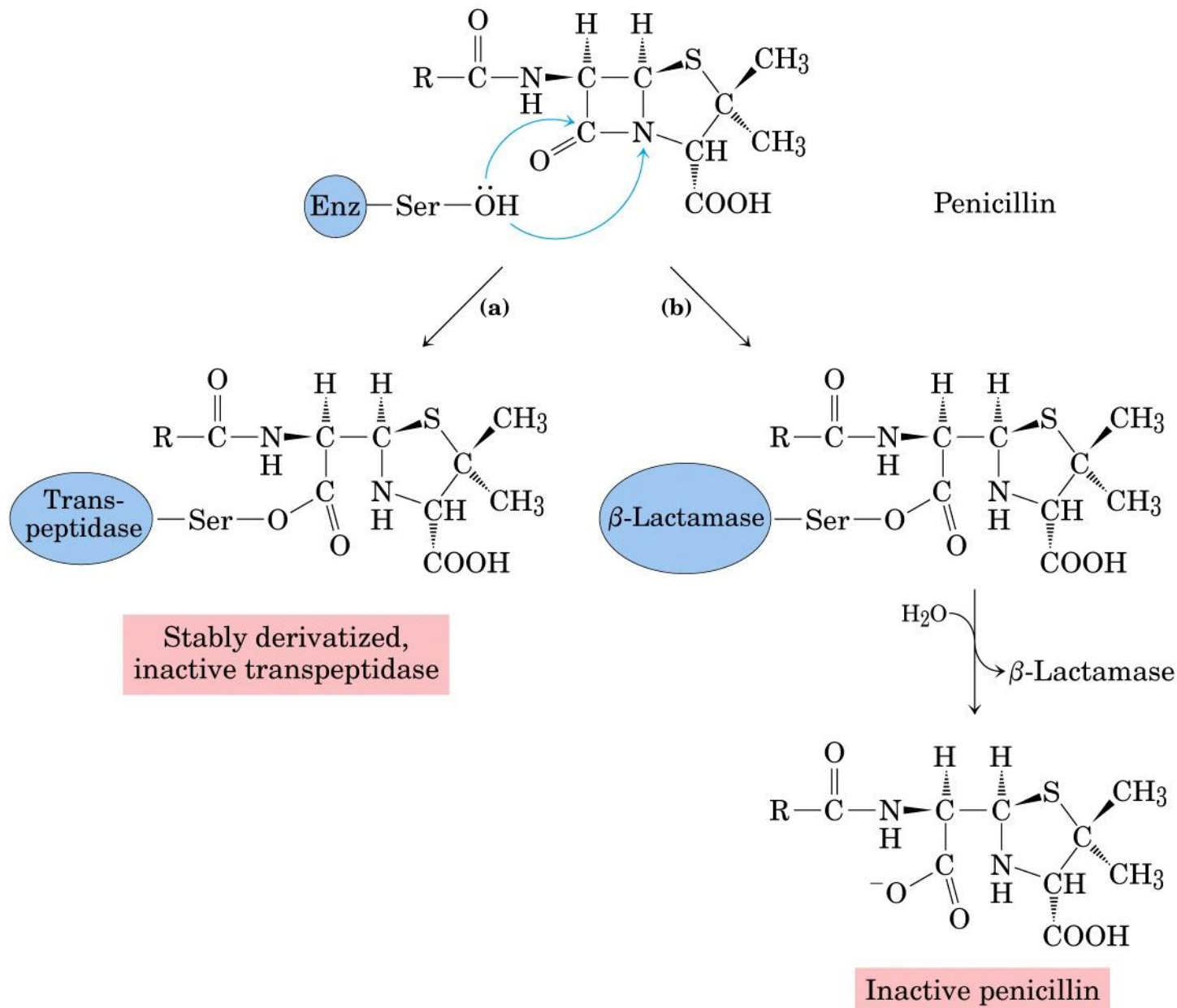


Необоротне інгібування

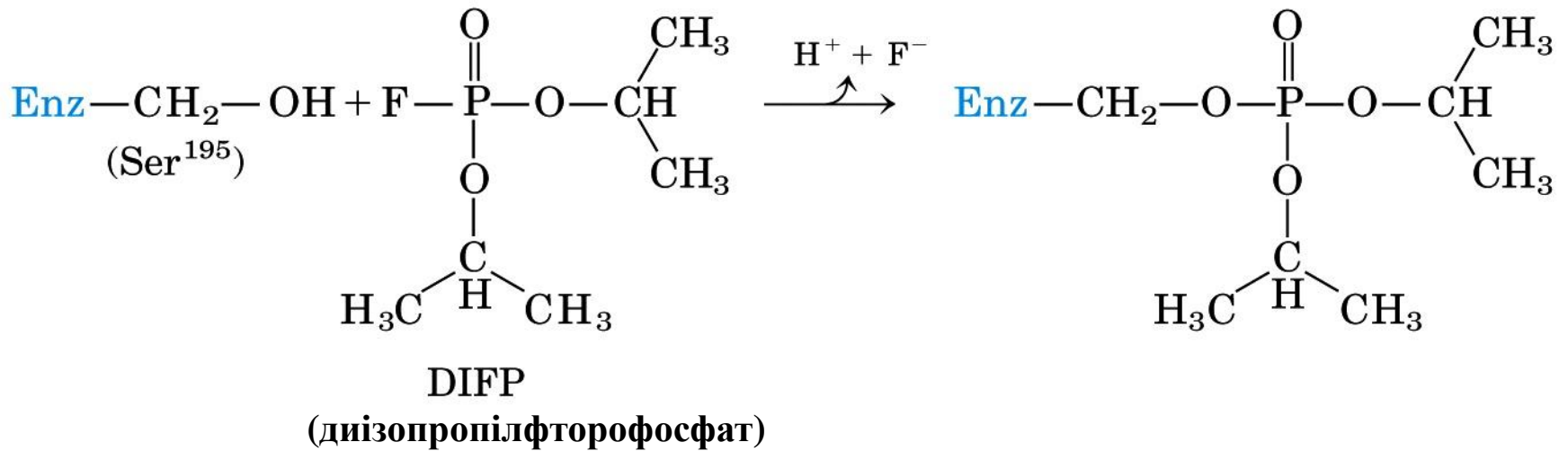
Пеніцилін -

- Продукується грибами як антибактеріальний агент
- Інгібує синтез стінок бактеріальних клітин
- Реагує з **сериновим** залишком активного центру бактеріальної глікопептид транспептидази
- Ампіцилін, карбеніцилін реагують таким самим чином
- Бактеріальна “протизброя”: β -лактамаза





Необоротне інгібування



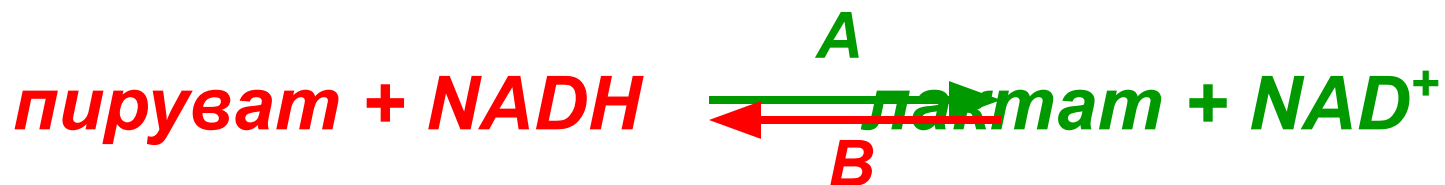
Контроль ензиматичної активності

- Швидкість реакції зменшується при акумулюванні продуктів
- Швидкість реакції залежить від наявності субстрату
- Генетичний контроль – індукція та репресія біосинтезу ензимів
- Структурні модифікації ензимів (ізозими)
- Оборотна ковалентна модифікація ензимів
- Необоротна ковалентна модифікація ензимів (напр., зимогени)
- Зв'язування регуляторних протеїнів (модуляторів) з ензимом
- Алостеричні ефектори

Контроль ензиматичної активності за допомогою ізозимів

- **Ізозими:** різні модифікації того ж самого ензиму
- Продукуються різними генами
- Виявляють гомологічні структури та амінокислотні послідовності (спільне еволюційне походження)
- Виявляють **незначні** відмінності в кінетичних властивостях (напр., K_m , V_{max}), або у стійкості, локалізації у клітині, контролі активності
- Різні ізозими часто використовуються різними типами клітин або тканин
- **Приклади:** NO синтази:
 - **ендотеліальна (eNOS):** знайдена у кров'яних судинах, регулює кров'яний тиск
 - прикріплюється до клітинної мембрани за допомогою мирістоїльного якоря
 - активність контролюється рівнем Ca^{2+} в клітинах
 - **нейрональна (nNOS):** знайдена у клітинах мозку, використовується в нейротрансмісії
 - асоційовані з кальцієвими каналами
 - активність контролюється рівнем Ca^{2+} в клітинах
 - **індуковані (iNOS):** знайдена в макрофагах, знешкоджують паразитів та пухлинні клітини
 - знаходяться у цитозолі
 - активність не залежить від рівня Ca^{2+} в клітинах

Другий приклад ізозимів: лактат дегідрогеназа (LDH)

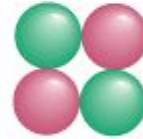


- LDH: два ізотипи A & B, з різними K_m для субстратів
- **A**: сприяє прямому напрямку реакції:
активує м'язи в анаеробних умовах:
домінує регенерація NAD^+ , лактат використовується
 - **B**: сприяє зворотному напрямку реакції:
м'язи серця – аеробні умови
Домінує регенерація пирувату для аеробного метаболізму
 - LDH - **тетрамерна**; різні комбінації субодиниць A і B зустрічаються у різних тканинах у відповідності до їх метаболічної ролі

Чотири ізомери LDH



Печінка, м'язи (A_4)

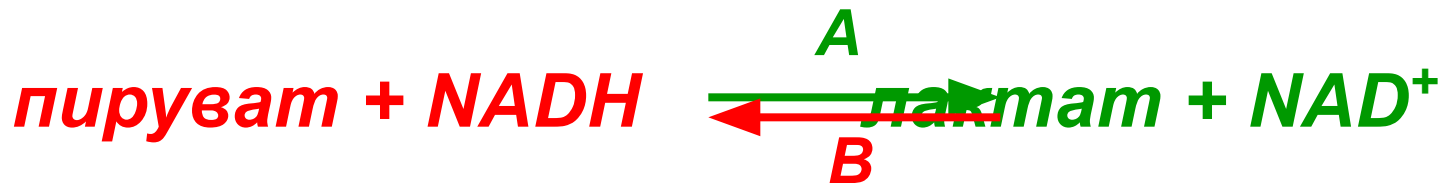


Білі кров'яні клітини
Мозок (A_2B_2)

Червоні кров'яні клітини,
Мозок, нирки (AB_3)



Нирки, серце (B_4)



Контроль ензиматичної активності шляхом **оборотної** ковалентної модифікації: фосфорилювання гідроксильної групи протеїнів



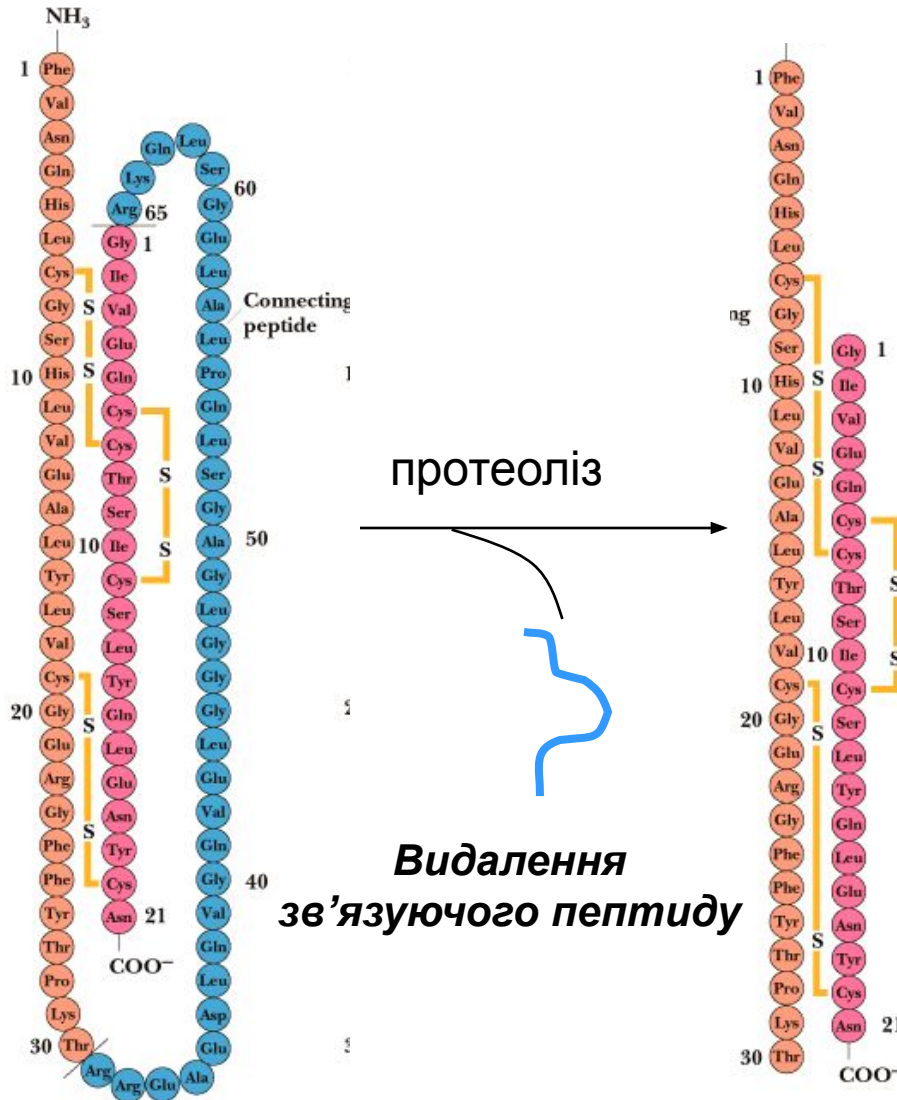
- Здійснюється на **специфічних** гідроксилвмісних залишках (Ser/Thr, Tyr)
напр., послідовність -Arg-Arg-Xxx-Ser-
- Додавання заряду -2 → зміна конформації ензиму
- **Оборотний контроль**

Контроль ензиматичної активності шляхом **необоротної** ковалентної модифікації: протеоліз специфічних пептидних зв'язків

- Спосіб утримання протеїну у неактивному стані:
 - До тих пір, поки він не потрапить до “місця призначення”, де він активується
 - До тих пір, поки його активність не стане потрібною
- **Необоротний контроль**
- Неактивна форма називається **зимогеном**:
 - позначається або *префіксом* “про-”, або *суфіксом* “-оген”
 - напр., **про**каспаза, трипси**ноген**

Зимогени І: інсулін

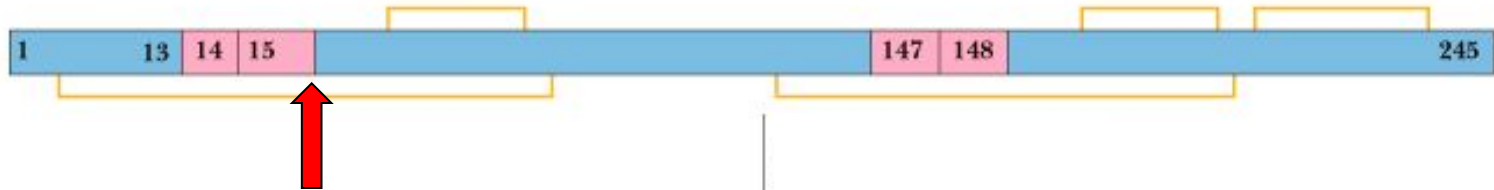
Проінсулін
одиначний
ланцюг
86 аміно-
кислотних
залишків



Активний інсулін
два ланцюга:
В-ланцюг 1-30
А-ланцюг 66-87

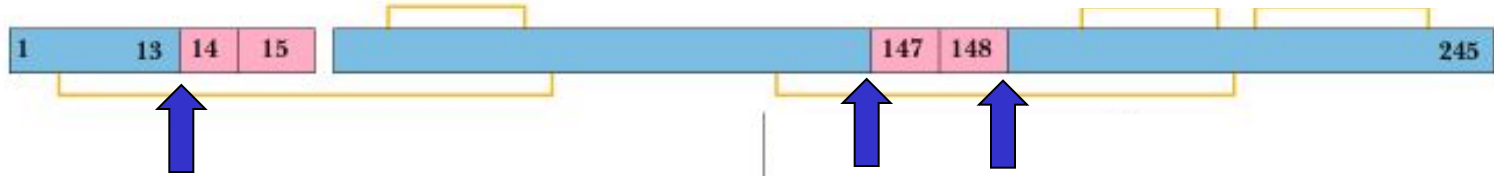
Зимогени II: активація перетравного ензиму хімотрипсину

хімотрипсиноген (неактивний)



Розщеплення по залишку 15 трипсином

π -хімотрипсин (низький рівень активності)

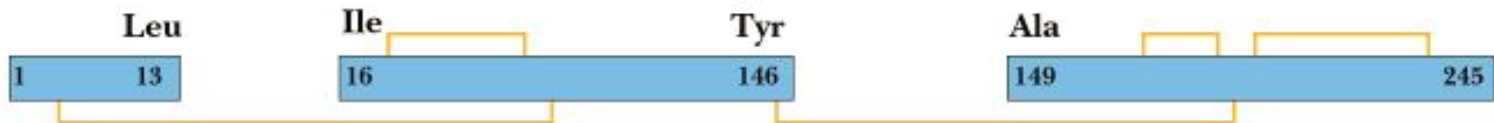


*Самоперетравлення по L13, Y146, N148
 π -хімотрипсином*

14 15
Ser Arg

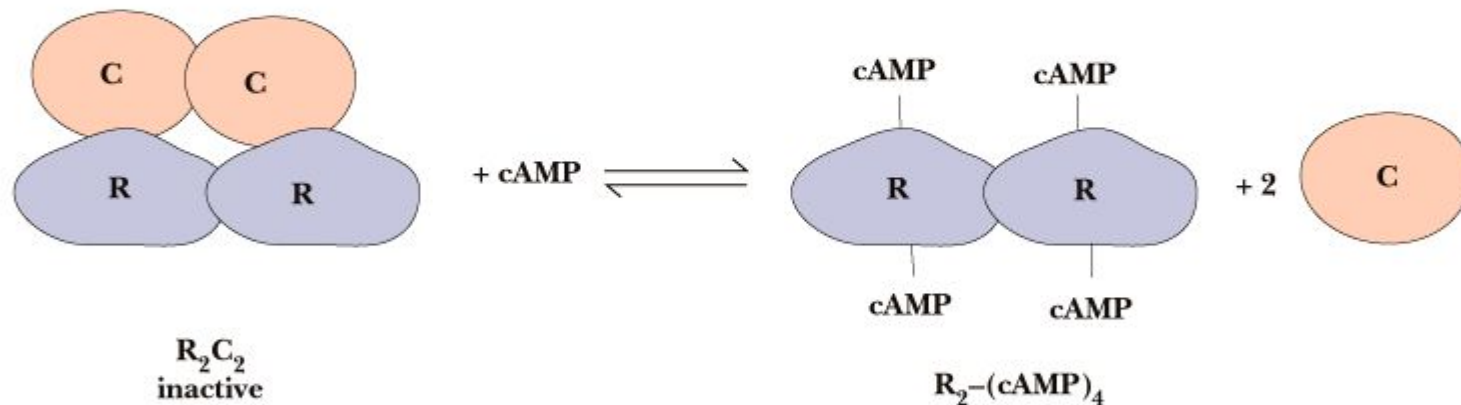
147 148
Thr Asn

α -хімотрипсин (повністю активний)



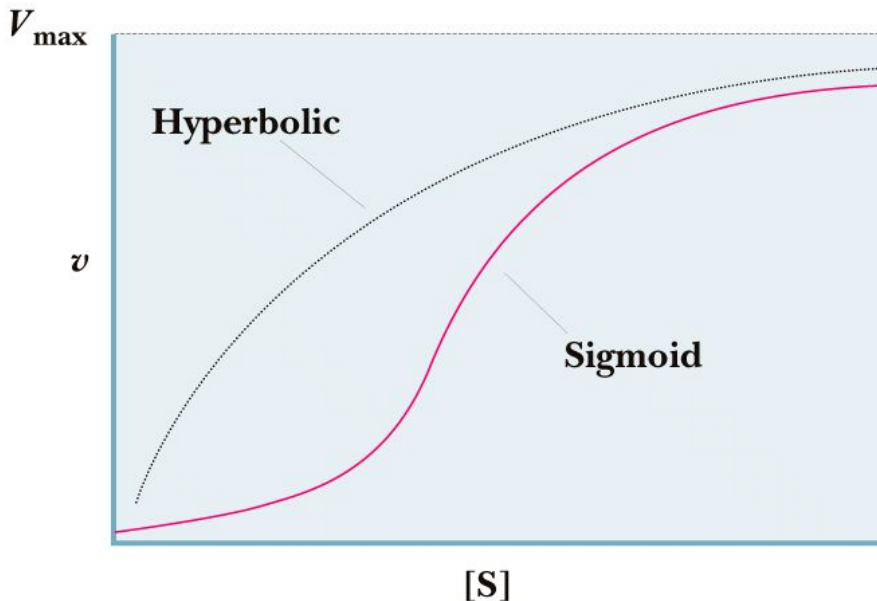
Контроль ензиматичної активності за допомогою модуляторних протеїнів

- Активність ензиму контролюється за допомогою іншого протеїну
- Модифікація регуляторного протеїну (напр., **нековалентне зв'язування активатора**, **фосфорилування**) спричиняють зв'язування з ензимом або виділення ензиму
- Напр., **cAMP-залежний фермент кіназа**, **інгібітор фосфопротеїн фосфатази 1**
- Може також бути необоротним: **протеоліз** регуляторного протеїну



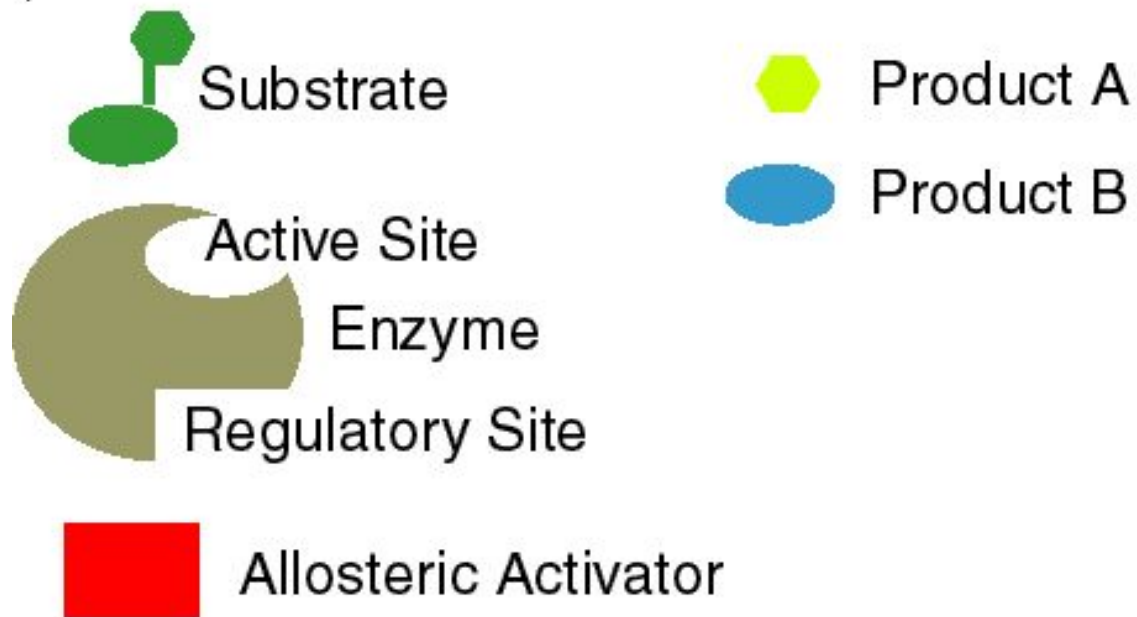
Алостерична регуляція

- Активність ензимів може регулюватися за допомогою **алостеричних** ефекторів (як правило, невеликих молекул або йонів металів)
- Ефектори у більшості випадків продукуються на інших метаболічних шляхах
- Ефектори можуть діяти за принципом негативного або позитивного зворотного зв'язку
- Графік залежності швидкості від $[S]$ має, як правило, сигмоїдальну форму



- Ензим існує у двох станах, з різною спорідненістю до субстрату
- Ензим, як правило, має більше ніж одну субодиницю і, таким чином, більше ніж один центр зв'язування субстрату

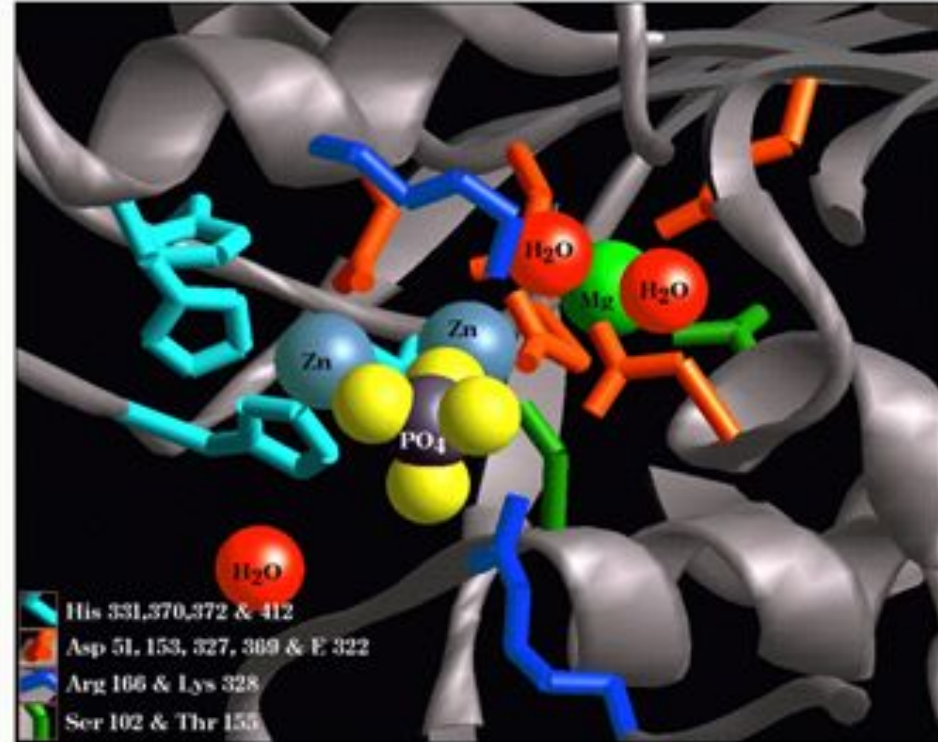
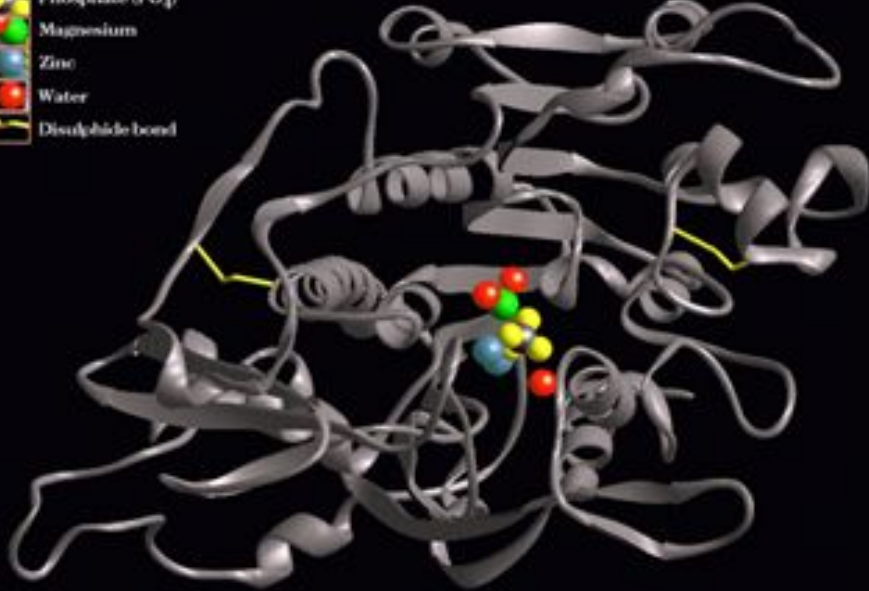
Алостерична регуляція



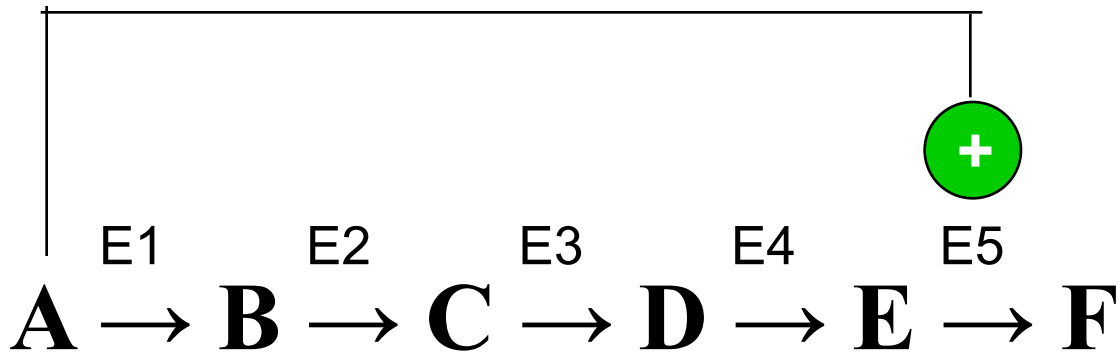
Алостеричний ензим - лужна фосфатаза

Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1)

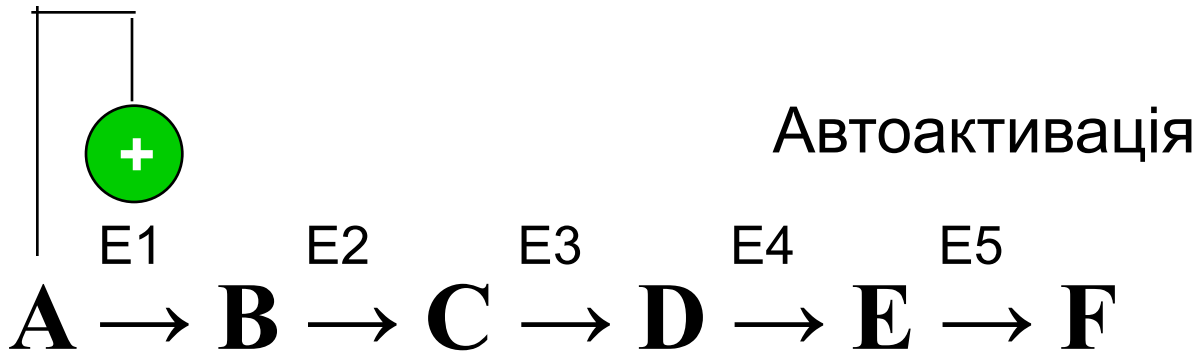
- Phosphate (PO₄)
- Magnesium
- Zinc
- Water
- Disulphide bond



Інші приклади алостеричної регуляції



Активация з позитивним зворотнім зв'язком



Передбачає наявність принаймні 2 центрів зв'язування субстратів:
один на активному центрі
один регуляторний центр

Модель алостеричної регуляції Моно-Ваймана-Шанго (MWC)

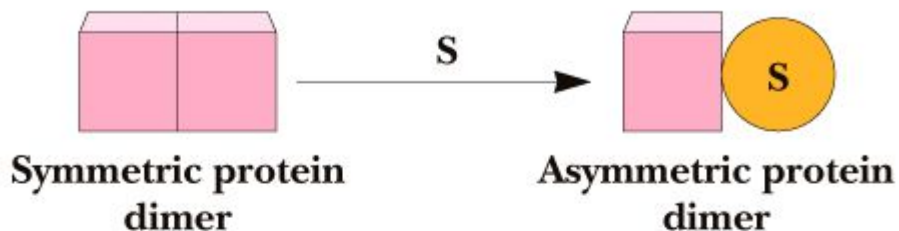
- Алостеричні протеїни можуть існувати в двох станах: **R** (relaxed, релаксований) та **T** (tense, напружений)
- **Усі** субодиниці олігомеру знаходяться у **однаковому** стані
- **T**-стан переважає у відсутності субстрату S
- Субстрат зв'язується більш міцно з **R**, ніж з **T**
- **Кооперативність** досягається завдяки тому, що зв'язування субстрату збільшує заселеність стану **R**, що призводить до збільшення спорідненості до субстрату
- Молекули субстрату є позитивними **гомотропними** ефекторами
- Молекули, які можуть впливати на зв'язування **інших молекул (субстратів)** є **гетеротропними** ефекторами (напр., кінцевий продукт метаболічного шляху може впливати на активність першого ензиму цього шляху)

Інша алостерична модель:
Послідовна модель (KNF)
(Кошлагд, Неметі, Філмер)

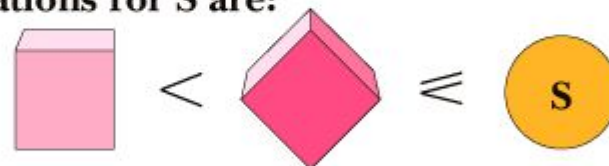
Приєднання S до однієї з
субодиниць
Впливає на спорідненість інших
субодиниць до S

Реальне явище алостерії,
ймовірно, включає елементи
обох моделей MWC та KNF

(a) Binding of S induces a conformational change.

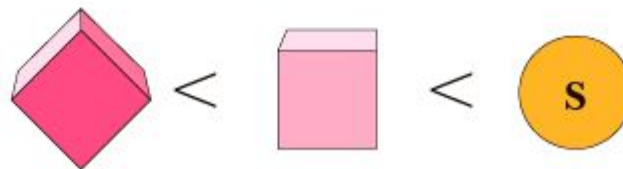


If the relative affinities of the various
conformations for S are:



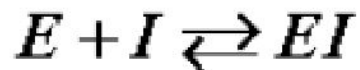
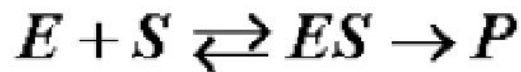
positive homotropic effects ensue.

If the relative affinities of the various
conformations for S are:



negative homotropic effects are seen.

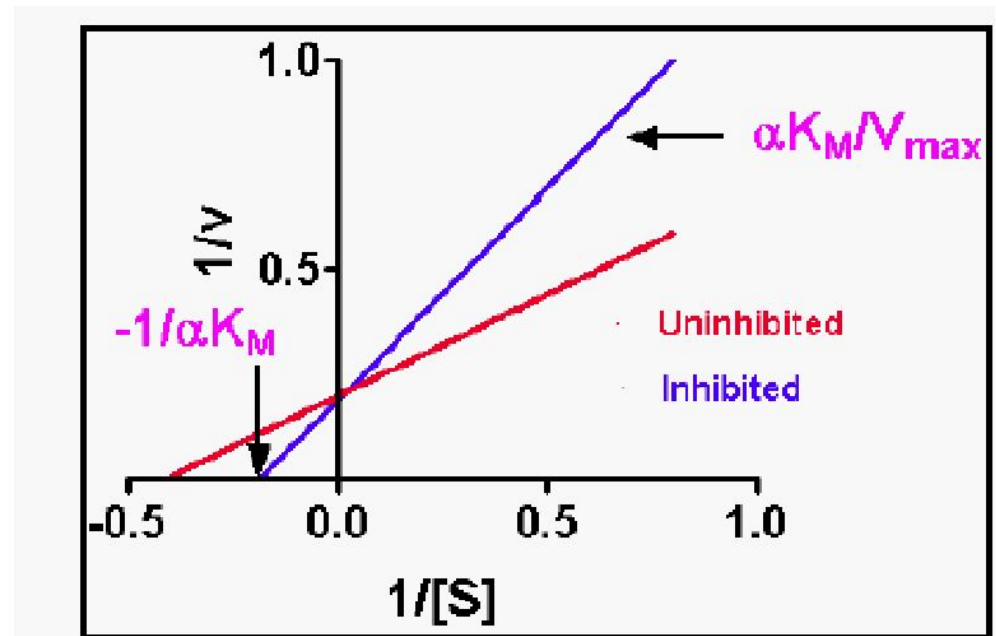
Конкурентне інгібування



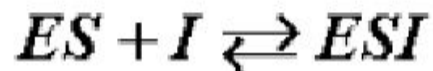
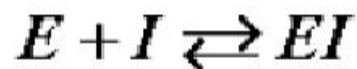
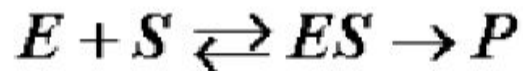
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Чисто неконкурентне інгібування



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

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha}{V_{\max}}$$

