

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Д.И. Кузьменко, Т.К. Климентьева

ИНТЕГРАТИВНАЯ БИОХИМИЯ. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

Курс лекций

ТОМСК
Издательство СибГМУ
2017

УДК 577.12(075.8)
ББК 52.57я73
К 893

К 893 **Кузьменко, Д.И.** Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма : курс лекций / Д.И. Кузьменко, Т.К. Климентьева. – Томск : Издательство СибГМУ, 2017. – 210 с.

Курс лекций «Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма» содержит изложение современных представлений о ведущих стратегиях интеграции метаболических процессов на уровне клетки, ткани (органа) и организма, а также основы учения о биосигнализации, которая обеспечивает передачу внешних регуляторных сигналов по внутриклеточному пространству к исполнительным биомолекулам. Изменения функциональной активности этих биомолекул обеспечивает интегрированный и адекватный ответ клетки, органа, организма на действие внешних факторов. Рассмотрены молекулярные механизмы эффектов ведущих анаболических и катаболических гормонов, сигнальные пути циклического АМФ и фосфоинозитоловой системы вторичных мессенджеров, а также сигнальные пути митоген-активируемой протеинкиназы и другие пути передачи митогенных сигналов.

Курс лекций подготовлен в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования для студентов медико-биологического факультета, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам – программам специалитета по специальности 30.05.01 – «Медицинская биохимия». Курс лекций может представлять интерес также для студентов и аспирантов медицинских и биологических специальностей различных вузов, а также специалистов в области молекулярной эндокринологии, нормальной и патологической физиологии.

УДК 577.12(075.8)
ББК 52.57я73

Рецензент:

Т.А. Замощина – доктор биол. наук, профессор базовой кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Утверждено и рекомендовано к печати Центральным методическим советом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 29 ноября 2016 г.).

© Издательство СибГМУ, 2017
© Кузьменко Д.И., Климентьева Т.К., 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ЛЕКЦИЯ 1. Принципы интеграции обмена веществ.....	9
ЛЕКЦИЯ 2. Клеточная мембрана – важнейший элемент интеграции метаболических процессов.....	32
ЛЕКЦИЯ 3. Основные стратегии регуляции метаболических процессов.....	55
ЛЕКЦИЯ 4. Строение, свойства и классификация ферментов. Энергетика и механизмы биокатализа.....	68
ЛЕКЦИЯ 5. Законы ферментативной кинетики. Уравнение и график Михаэлиса — Ментен. Ингибиторы и активаторы ферментов.....	95
ЛЕКЦИЯ 6. Особенности строения и кинетики аллостерических ферментов.....	121
ЛЕКЦИЯ 7. Система первичных и вторичных мессенджеров. Строение, функционирование и классификация рецепторов, опосредующих регуляцию метаболизма.....	140
ЛЕКЦИЯ 8. Сигнальные пути циклического аденозинмоно- фосфата и фосфоинозитоловой системы вторичных мессенджеров.....	173
ЛЕКЦИЯ 9. Сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы. Сигнальные пути инсулина.....	190
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	207
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	209

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозин-5'-дифосфат
АКТГ	– адренокортикотропный гормон
АМФ	– аденозин-5'-монофосфат
АНФ	– артериальный натрийуретический фактор
Асп	– аспарагин
АТФ	– аденозин-5'-трифосфат
АЦ	– аденилатциклаза
БФБ	– бифункциональный белок
ГДФ	– гуанозин-5'-дифосфат
Гис	– гистидин
Глу	– глутамин
ГЛЮТ2, 4	– глюкозный транспортер 2, 4
ГТФ	– гуанозин-5'-трифосфат
ГФИ	– гликозилфосфатидилинозитол
ГЦ	– гунилатциклаза
ДАГ	– 1,2-диацилглицерол
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФЗ	– инозитол-1,4,5-трисфосфат
каспаза	– caspase (cysteine-dependent aspartate specific protease)
КоА	– коэнзим А
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
Лиз	– лизин
МАП2К	– киназа МАП-киназы
МАП3К	– киназа киназы МАП-киназы
МАПК	– митоген-активируемые протеинкиназы
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
НАД⁺	– никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ⁺	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат окисленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
НЭЖК	– неэстерифицированные жирные кислоты, синоним – свободные жирные кислоты (СЖК)
ПКГ	– протеинкиназа G
ПКА	– протеинкиназа A, цАМФ-зависимая протеинкиназа A
ПКВ	– протеинкиназа B, альтернативное обозначение – Akt
ПКС	– протеинкиназа C
ПНЖК	– полиненасыщенные жирные кислоты
СаМ	– кальмодулин
Сер	– серин
СЖК	– свободные жирные кислоты, синоним – неэстерифицирован-

	ные жирные кислоты (НЭЖК)
СМ	– сфингомиелин
СМаза	– сфингомиелиназа
ТАГ	– триацилглицерол
Тир	– тирозин
ТТГ	– тиреотропный гормон
УТФ	– уридин-5'-трифосфат
Ф-2,6-бисФ	– фруктозо-2,6-бисфосфат
ФАД	– флавинадениндинуклеотид окисленный
ФАДН₂	– флавинадениндинуклеотид восстановленный
Ф-бисФ-аза	– фруктозобисфосфатаза
ФИ	– фосфатидилинозитол
ФИ-3К	– фосфатидилинозитол-3-киназа
ФИФ	– фосфатидилинозитол-4-фосфат
ФИФ2	– фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
ФИФ3	– фосфатидилинозитол-3,4,5-бисфосфат
ФЛ	– фосфолипид
ФЛаза С	– фосфолипаза С
ФНО-α	– фактор некроза опухоли-альфа
ФС	– фосфатидилсерин
ФФК-1	– фосфофруктокиназа-1
ФФК-2	– фосфофруктокиназа-2
ФХ	– фосфатидилхолин
ФЭА	– фосфатидилэтаноламин
цАМФ	– циклический 3'5'-аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический 3'5'-гуанозинмонофосфат
Цис	– цистеин
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса, цикл лимонной кислоты
ЦТФ	– цитидин-5'-трифосфат
ЩУК	– щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)
ЭФР	– эпидермальный фактор роста
АКАР	– A-kinase anchor proteins, или белки, заякоривающие ПКА
Akt	– альтернативное обозначение протеинкиназы В
cAMP-response elements	– цАМФ-чувствительные элементы
caspase	– cysteine-dependent aspartate specific protease, или цистеин-зависимая специфичная к аспартату протеаза, или каспаза
CREB	– cAMP response element-binding protein, или белок, связывающий цАМФ-чувствительные элементы
DAG	– 1,2-диацилглицерол
Elk1	– транскрипционный фактор
ERK	– Extracellular Signal-Regulated Kinase, или киназа, регулируемая внеклеточным сигналом. Альтернативное обозначение:

	MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), или МАПК (Митоген-Активируемая ПротеинКиназа
FOXO1	– forkhead box protein O1, или инсулин-респонсивный транскрипционный фактор
GAP	– GTPase-activating protein, или белок, активирующий ГТФазу
GEF	– guanine nucleotide exchange factor, или фактор, обменивающий гуаниновые нуклеотиды. Альтернативное обозначение – SOS
GLUT4	– glucose transporter 4, или ГЛЮТ4
GM 1	– ганглиозид 1
GPCR	– G protein-coupled receptor, или рецептор, сопряженный с G-белком
GPI	– glycosylphosphatidylinositol, или гликозилированный фосфатидилинозитол
Grb2	– Growth factor receptor-bound protein 2, или белок, связывающийся с рецептором фактора роста
GSK3	– glycogen synthase kinase 3, или киназа-3-гликогенсинтазы
HRE	– hormone response element, или гормон-респонсивный элемент
IκB	– ингибитор транскрипционного фактора <i>κB</i> (каппа В)
IKK / IκB kinase	– киназа ингибитора транскрипционного фактора <i>κB</i>
IRS-1	– insulin receptor substrate 1, или субстрат рецептора инсулина-1
JAK	– Janus kinase, или Янус-киназа
K_i	– константа ингибирования
K_M	– константа Михаэлиса
K_s	– субстратная константа, или константа диссоциации фермент-субстратного комплекса (ES)
Leu	– лейцин
MAPK	– Mitogen-Activated Protein Kinase, или митоген-активируемая протеинкиназа. Альтернативное обозначение – ERK.
MEK	– Mitogen Extracellular Signal-Regulated Kinase, или киназа, регулируемая внеклеточным митогенным сигналом
NFκB	– nuclear factor kappa B, или ядерный транскрипционный фактор <i>κB</i>
NO	– оксид азота
NOS	– NO-синтаза
PDK1	– 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1, или 3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1
PH-домены	– plextrin homology domain, или домен плекстриновой гомологии
PIP₂	– phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, или фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
PIP₃	– phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, или фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат
PP1	– phosphoprotein phosphatase 1, или фосфопротеинфосфатаза-1
Raf	– Rapidly accelerated fibrosarcoma, или быстро растущая фибросаркома. Является серин-треониновой протеинкиназой.

Ras	– Rat sarcoma, белок-активатор протеинкиназы Raf
RTK	– receptor tyrosine kinase, или рецепторные тирозиновые киназы
Ser	– серин
SH2-домен	– Src homology domain 2, или домен сарк-гомологии-2
SH3-домен	– Src homology domain 3, или домен сарк-гомологии-3
SH-KoA	– коэнзим А
SOS	– Son of Sevenless (альтернативное обозначение GEF). Термин произошёл от названия мутации белка GEF у дрозофил.
Src	– тирозиновая нерецепторная протеинкиназа (произносится «сарк» – от «саркома»)
SRF	– serum response factor, или сывороточный фактор ответа
STAT	– signal transducer and activator transcription, или проводник сигнала и активатор транскрипции
Thy	– тирозин
Thy-1	– thymocyte differentiation antigen 1, или антиген-1 дифференциации тимоцитов. Альтернативное обозначение – CD 90.
Tre	– треонин

ВВЕДЕНИЕ

В интеграции клеточного метаболизма ведущая роль принадлежит взаимодействию внеклеточного стимула (первичного мессенджера) с поверхностным или внутриклеточным рецептором клетки, что порождает сложный процесс передачи (трансдукции) информации, доставляемой внешним сигналом, к внутриклеточным исполнительным (эффекторным) молекулам-мишеням. Изучение биохимических механизмов передачи и усиления изначально сравнительно слабых сигналов, доставляемых первичными мессенджерами, является одной из актуальных задач современной клеточной биологии и биохимии. Их знание необходимо для понимания механизмов формирования функционального ответа клеток, как в норме, так и для его регуляции и коррекции при патологических состояниях.

Внутриклеточная сигнализация (сигнальная трансдукция), которая является неотъемлемой частью множественных механизмов, участвующих в интеграции метаболизма белков, липидов и углеводов, – наука сравнительно молодая. Она возникла в начале 80-х годов XX века, что связано с открытиями участия фосфоинозитидов, G-белков и протеинкиназы C в системах передачи регуляторных сигналов от рецепторов к внутриклеточным эффекторным молекулам.

Дисциплина «Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма» входит в раздел С.3. Профессиональный цикл. Базовая часть ООП. Индекс дисциплины Б1.В.ОД.9. Направление подготовки: 30.05.01 «Медицинская биохимия». Материалы лекций соответствуют содержанию учебного курса, требованиям Федерального государственного образовательного стандарта, высшего образования.

Целью изучения дисциплины «Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма» является получение студентами фундаментальных знаний и современных представлений о механизмах управления клеточными функциями и о принципах и стратегиях интеграции метаболизма белков, липидов и углеводов.

Основными задачами дисциплины являются изучение систем внутриклеточной сигнализации, обеспечивающих передачу сигналов при рецептор-зависимой активации клеточных функций (пролиферация, дифференцировка и секреция), а также ведущих стратегий регуляции активности ключевых ферментов метаболических путей как главных исполнительных механизмов интеграции обмена. В курсе лекций изложены основные пути передачи регуляторных сигналов с рецепторов на внутриклеточные эффекторные молекулы, включая механизмы усиления этих сигналов. Описаны классы рецепторов, их молекулярное строение и механизмы активации, а также основные типы специфических внутриклеточных белков-посредников, которые, наряду с вторичными мессенджерами, активно участвуют в процессах интеграции метаболических путей.

Дисциплина «Интегративная биохимия. Регуляция метаболизма» тесно сочетается с такими разделами, как «Общая биохимия», «Энзимология», «Гормональная регуляция обмена веществ» и «Цитология». В изучении курса студентами большое значение имеет самостоятельная работа, для чего предусмотрены практические работы и семинары, подготовка которых будет способствовать формированию системных знаний в рамках изучаемой дисциплины.

ЛЕКЦИЯ 1

ТЕМА: ПРИНЦИПЫ ИНТЕГРАЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

План лекции:

1. Общие сведения о метаболизме и его функции. Представление о свободной энергии.
2. Ключевые метаболиты и их роль.
3. Характеристика и функции катаболических и анаболических процессов.
4. Три формы аккумуляции свободной энергии.
5. Интеграция метаболизма. Принципы интеграции метаболических путей.
6. Ключевая роль печени в интеграции обмена углеводов, липидов и белков.
7. Пять стратегий регуляции метаболизма.
8. Роль инсулина, глюкагона и адреналина в интеграции углеводного, липидного и белкового обменов на уровне целостного организма.
9. Согласованная регуляция синтеза и расщепления гликогена в печени и мышцах.
10. Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза.
11. Согласованная регуляция синтеза и окисления жирных кислот.
12. Взаимосвязи метаболизма белков, липидов и углеводов.

Заключение

Общие представления о метаболизме

Обмен веществ (метаболизм) – всё многообразие химических реакций, катализируемых ферментами, которые протекают в живых организмах и составляют основу его жизнедеятельности. Метаболизм представляет собой высокоинтегрированный и целенаправленный процесс, реализующийся в форме последовательных мультиферментных реакций. Участвующие в обмене веществ химические соединения называются **метаболитами**. Метаболические реакции обеспечивают обмен веществом, энергией и информацией между живым организмом и средой его обитания. По этой причине живые организмы относят к **открытым системам**.

Современная медико-биологическая наука под **информацией** подразумевает сложный комплекс сведений, получаемых клеткой из окружающей среды, которые необходимы для своевременного приспособления клетки к постоянно меняющимся условиям её существования. Для одноклеточных организмов – приспособление к условиям среды обитания. Для многоклеточных организмов – с одной стороны, это приспособление определенного типа клетки к изменению функциональных свойств её ближайшего окружения, с другой стороны, для организма как единого целого – его приспособление к новым условиям среды обитания.

Живые организмы (системы) нуждаются в постоянном притоке **свободной энергии** для обеспечения своей жизнедеятельности. **Свободная энергия** – часть общей энергии соединения, которая доступна для выполнения того или иного вида работы при постоянной температуре и постоянном давлении.

Свободную энергию поставляют в основном реакции гидролитического отщепления концевой фосфатной группы молекулы АТФ. Фриц Липман, установивший в 1941 году центральную роль, которую играет молекула АТФ в переносе энергии, предложил термин «высокоэнергетическая фосфатная связь», или «макроэргическая связь» для обозначения двух фосфоангидридных связей в молекуле АТФ (рис. 1):

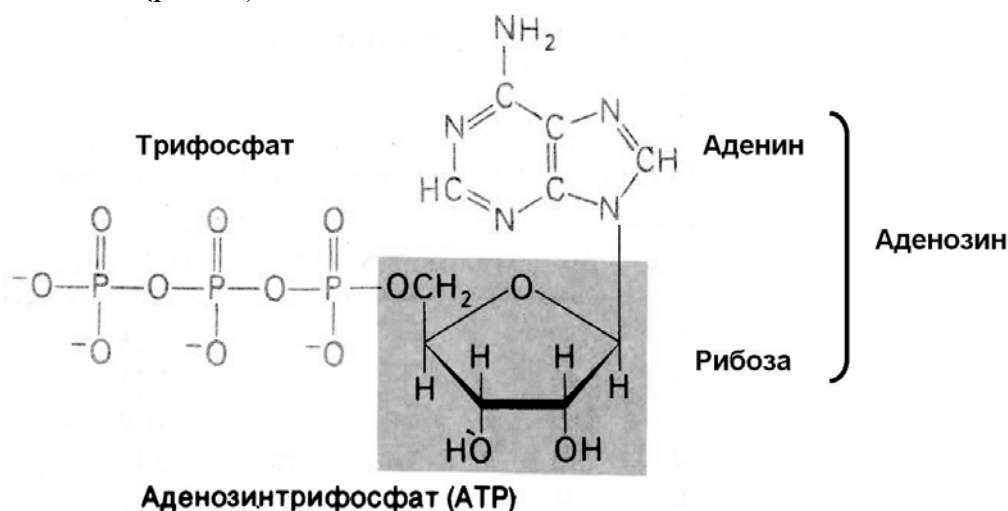


Рис. 1. Молекула АТФ (аденозин-5'-трифосфата) и её структурные элементы

Реакцию «классического» гидролиза АТФ (ортофосфатное расщепление) можно описать уравнением:



Из приведенного уравнения следует, что происходит разрыв фосфоангидридной связи, которой присоединена концевая фосфатная группа к трифосфату молекулы АТФ. Это основной, хотя и не единственный источник свободной энергии. Ниже будут представлены все формы аккумуляции энергии, которая извлекается в реакциях катаболизма.

Количество свободной энергии гидролиза макроэргической связи в молекуле АТФ (как и любой другой химической связи) измеряется величиной, которая называется **изменение свободной энергии, ΔG** (кал/моль). Она вычисляется по формуле:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_{eq},$$

где: ΔG – изменение свободной энергии;

ΔG° – изменение стандартной свободной энергии (константа для данной реакции);

R – газовая постоянная;

T – абсолютная температура (шкала Кельвина);

ln – натуральный логарифм;

Keq – константа равновесия, учитывает соотношение концентраций субстратов и продуктов реакции, согласно **закону действующих масс**.

Следует пояснить, что ΔG^0 – величина изменения **стандартной свободной энергии** гидролиза связи, измеренная в **стандартных условиях**: $pH = 7,0$; $t = +37\text{ }^{\circ}\text{C}$; концентрации субстратов и продуктов реакции = 1 моль/л; давление (P) = 1 атм. В живой клетке pH составляет величину 7,35–7,4, а концентрации реагирующих молекул постоянно меняются и никогда не достигают величины 1 моль/л. Так, для реакции гидролиза АТФ это миллимолярные внутриклеточные концентрации АТФ, АДФ, АМФ и неорганического фосфата. Эти реальные условия и учитывает член приведенного выше уравнения ($RT\ln Keq$), который фактически выступает в качестве «поправочного коэффициента», позволяющего точно вычислять значение ΔG с учетом реальных (а не стандартных) условий протекания данной реакции в данном типе клетки. В качестве примера можно представить величину ΔG гидролиза макроэргической связи молекулы АТФ в эритроцитах человека, которая составляет $-12,4$ ккал/моль. Она значительно превышает величину ΔG^0 ($-7,3$ ккал/моль). Значения ΔG и ΔG^0 имеют знак «минус» (отрицательное значение), что характерно для спонтанно протекающих химических превращений: в продуктах реакции содержится меньше свободной энергии, чем в исходных соединениях (субстратах). Именно благодаря этому закону при спонтанно протекающих химических реакциях равновесие будет смещено в сторону образования продуктов, поскольку все реакции стремятся идти в направлении, соответствующем уменьшению свободной энергии системы.

Регенерация АТФ происходит благодаря функционированию **цикла АТФ-АДФ**, в ходе которого происходит ресинтез АТФ за счет использования свободной энергии, извлекаемой в реакциях катаболизма (рис. 2):

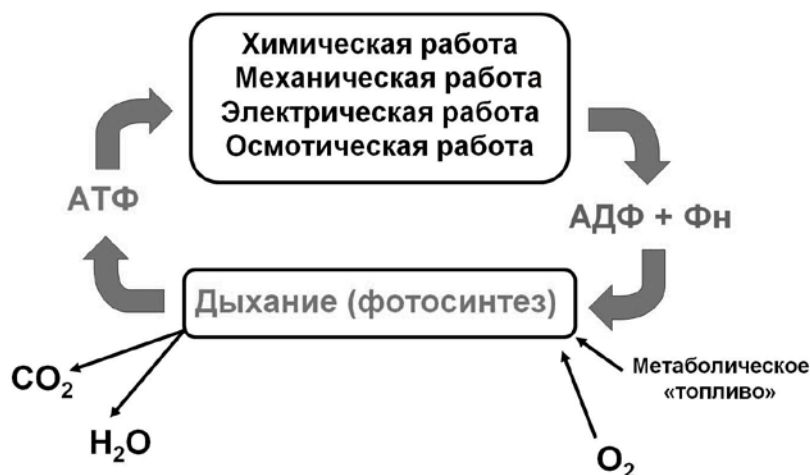


Рис. 2. Схема функционирования цикла АТФ-АДФ

Процессы обмена веществ (метаболизм) лежат в основе жизнедеятельности клеток, органов и организма. Обмен веществ выполняет следующие специфические функции:

1. Извлечение свободной энергии путём расщепления пищевых веществ, поступающих в организм извне (для хемотрофных организмов), либо путем преобразования энергии квантов улавливаемого солнечного света (фотосинтез) – для фототрофных организмов.

2. Превращение сложных по строению молекул, входящих в состав пищевых веществ, в сравнительно простые молекулы – «строительные блоки» (реакции катаболизма), которые далее используются для синтеза биомакромолекул.

3. Синтез белков, липидов, полисахаридов, нуклеиновых кислот и других биомолекул из вышеупомянутых «строительных блоков» (реакции анаболизма).

4. Синтез и деградация отдельных категорий биомолекул, которые выполняют специфические функции в данном типе клеток.

Следует подчеркнуть, что только живые системы (организмы) обладают способностью использовать энергию, поступающую извне, для поддержания собственной структурной организации. Напротив, неживые системы в результате поглощения внешней энергии часто переходят в состояние с меньшей степенью упорядоченности, то есть разрушаются (рис. 3):

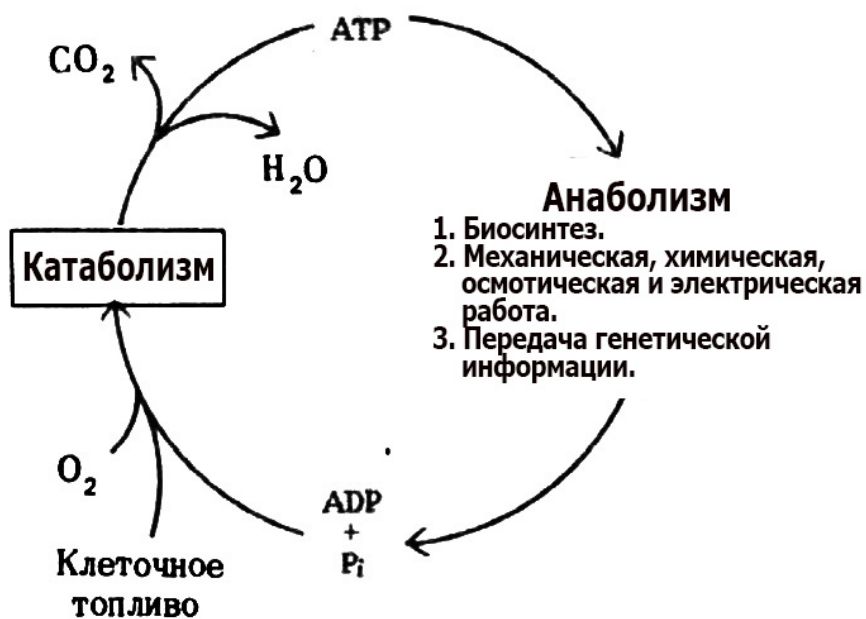


Рис. 3. Общая схема процессов жизнедеятельности

Процессы жизнедеятельности требуют затрат **свободной энергии**. Передача генетической информации обеспечивает точное самовоспроизведение организма. Это уникальное свойство живых систем, квинтэссенция состояния, которое мы называем «жизнь». Самовоспроизведение можно охарактеризовать как способность живых систем к воспроизводству на протяжении многих поколений форм, идентичных по массе, размеру и структурной организации.

В ходе жизнедеятельности живыми системами выполняются следующие виды работ:

1. Механическая работа. Организм и/или его части движутся, преодолевая сопротивление среды.

2. Химическая работа. Синтез биоорганических молекул: разрыв одних химических связей и образование других (катаболические и анаболические реакции соответственно).

3. Осмотическая работа. Создание и поддержание разности концентраций ионов и молекул-метаболитов.

4. Электрическая работа. Создание и поддержание разности электрических потенциалов на различных биомембранах.

В более узком и точном биохимическом смысле термином «метаболизм» принято обозначать **промежуточный обмен** – превращение веществ внутри клеток с момента их транспорта через цитоплазматическую мембрану до образования конечных продуктов.

Метаболизм структурно организован и реализуется в виде множества отдельных последовательностей химических реакций, катализируемых **мультиферментными системами**. Мультиферментные системы могут включать в себя от 2 до 20 и более ферментов, которые действуют в строго определенной последовательности, совместно и согласованно. Эти условия обеспечивают участие продукта реакции, катализируемой первым ферментом, в качестве субстрата следующей реакции, катализируемой вторым ферментом. Метаболические пути могут быть **линейными** либо организованными в форме **циклов**.

Активность любого метаболического пути находится под контролем нескольких **регуляторных** или **ключевых ферментов**. Эти ферменты по своей природе являются аллостерическими ферментами и катализируют **необратимые биохимические реакции**. Именно эти реакции **определяют направление биохимических превращений**. Обычно регуляторные ферменты катализируют реакции, лежащие в начале метаболических путей или в точках их разветвления. Для гликолиза это: *гексокиназа, фосфофруктокиназа и фосфоенолпируваткиназа*. Для глюконеогенеза: *фосфоенолпируваткарбоксилаза*. Для пентозофосфатного пути: *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа*. Для β -окисления жирных кислот: *ацил-КоА-карнитинтрансфераза*. Для биосинтеза жирных кислот: *ацетил-КоА- карбоксилаза*. Для ЦТК: *цитратсинтаза*.

Необратимость – общее свойство метаболических путей. Таким образом, одна из принципиальных особенностей метаболизма состоит в том, что **скорости составляющих его реакций определяются активностью ключевых (регуляторных) ферментов**, но не законом действующих масс, согласно которому накапливающиеся продукты реакций могут легко превращаться в исходные молекулы (субстраты).

В различных точках метаболических путей находятся **ключевые метаболиты**. Они обеспечивают «переключение» обмена с одного метаболического пути на другой в зависимости от потребностей организма. Главными ключевыми метаболитами являются:

1. Глюкозо-6-фосфат. Обеспечивает «перекрёст» путей: синтеза и распада гликогена; пентозофосфатного пути (синтез рибозы и НАДФН); аэробного окисления глюкозы (гликолиза), участвующего в производстве энергии (рис. 4):

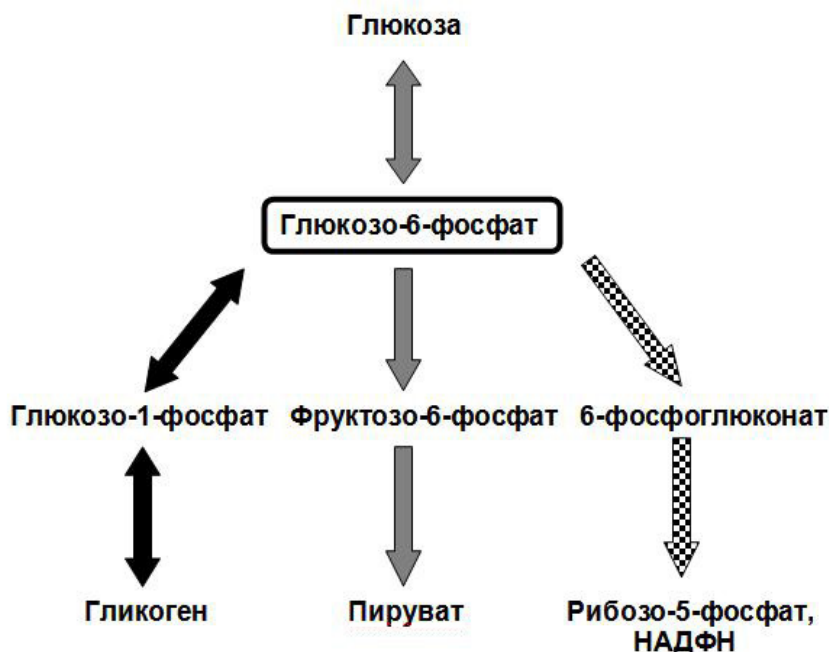


Рис. 4. Три пути использования глюкозо-6-фосфата

Слева направо: синтез и распад гликогена, гликолиз (окисление до пирувата) и пентозофосфатный путь.

2. Пировиноградная кислота (пируват). Начинает общий для углеводов, липидов и белков путь катаболизма, открывает для них «вход» в ЦТК (рис. 5). Метаболическая судьба пирувата многообразна:

2.1. Пируват восстанавливается в **лактат** в реакции, катализируемой **лактатдегидрогеназой**, что сопровождается накоплением НАД⁺. Это позволяет гликолизу протекать в анаэробных условиях. Избыток лактата, образующийся в интенсивно работающих мышцах, выходит в кровоток, откуда поступает в печень, где лактат окисляется до пирувата. Таким образом, часть «отходов метаболизма» из мышц перемещается в печень для утилизации.

2.2. Пируват в цитоплазме благодаря обратимой реакции **переаминирования (трансаминирования)** превращается в аминокислоту **аланин**. Эта реакция, с одной стороны, является путем включения некоторых аминокислот в основные пути обмена и, с другой стороны, возможностью образования некоторых аминокислот из углеводных предшественников. Иными словами, **трансаминирование** – основная реакция, связывающая метаболизм углеводов и аминокислот.

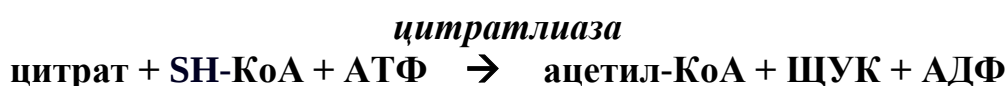
2.3. Пируват внутри митохондрий с участием **пируваткарбоксилазы** превращается в **щавелевоуксусную кислоту (ЩУК или оксалоацетат)**. Положительным модулятором активности **пируваткарбоксилазы** является **ацетил-КоА**. Концентрация **ЩУК** определяет скорость синтеза цитрата (лимонной кислоты) и скорость ЦТК в целом: чем выше концентрация ЩУК, тем активнее

цикл. Таким образом, в условиях дефицита энергии, то есть при уменьшении отношения АТФ/АДФ, АДФ начинает стимулировать активность *изоцитрат-дегидрогеназы*, а **ацетил-КоА** одновременно повышает активность *пируват-карбоксилазы*. В итоге скорость работы ЦТК увеличивается. Наоборот, когда АТФ находится в избытке, **ЩУК** перенаправляется в глюконеогенез и избыточного стимулирования ЦТК не происходит.

Кроме того, дальнейшее превращение **ЩУК** в **фосфоенолпируват** идет в обход последней, необратимой стадии гликолиза. С этой же реакции начинается путь глюконеогенеза (синтез глюкозы из пирувата).

2.4. Пируват внутри митохондрий подвергается окислительному декарбоксилированию до **ацетил-КоА**. Реакцию катализирует *мультиферментный пируватдегидрогеназный комплекс*. Это **необратимая реакция**, с её помощью углеродный скелет молекул углеводов направляется для **окисления в ЦТК** и для **биосинтеза липидов**. В условиях, когда клетка нуждается в АТФ, пируват превращается в **ацетил-КоА** с большой скоростью.

3. Ацетил-КоА. «Включает» углеводы, жирные кислоты и белки в ЦТК. Основными источниками **ацетил-КоА** являются: **окислительное декарбоксилирование пирувата** (см. выше п. 2.4.) и **β-окисление жирных кислот**. Дополнительный источник – **кетогенные аминокислоты**. Первая реакция ЦТК – реакция конденсации **ацетил-КоА** и **ЩУК**, которую катализирует *цитратсинтаза* (рис. 5). Благодаря этой реакции **ацетил-КоА** превращается в **цитрат**. Последний, в условиях его интенсивного образования, диффундирует через мембрану митохондрий и выходит в цитоплазму. В цитоплазме, в реакции, катализируемой *цитратлиазой*, происходит обратное превращение **цитрата** в **ацетил-КоА**, который далее участвует в синтезе жирных кислот:



Следует помнить о том, что благодаря необратимости реакций, катализируемых *пируватдегидрогеназой* и *цитратсинтазой*, обратное превращение ацетил-КоА в пировиноградную кислоту никогда не происходит. В этом состоит причина того, что в организме человека невозможно превращение жирных кислот в глюкозу.

Наконец, из трех молекул **ацетил-КоА** образуется **3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА**, который является прекурсором для синтеза **холестерола** и **кетонových тел** (рис. 5).

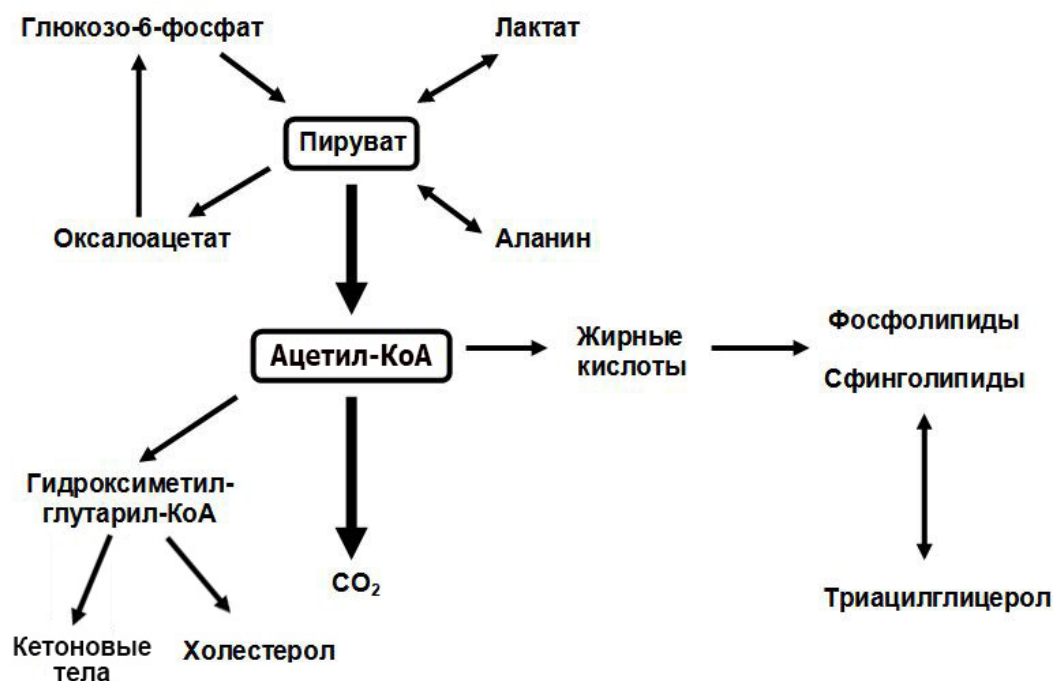


Рис. 5. Пути использования пирувата и ацетил-КоА

Обмен веществ как единство катаболических и анаболических реакций

Метаболизм объединяет противоположно направленные процессы: **катаболизм** (процессы распада) и **анаболизм** (процессы синтеза).

Катаболизм – ферментативное расщепление сложных, полимерных молекул (жиров, полисахаридов, белков и др.) на простые компоненты (лактат, ацетат, аммиак, мочевины и CO_2). Иными словами, катаболические пути **сходятся**, образуя через промежуточный продукт пируват, по сути, один конечный продукт – **ацетил-КоА** (рис. 6).

Процессы катаболизма в основном представлены реакциями окисления. На определенных стадиях процесс сопровождается выделением **свободной энергии**. Извлечение свободной энергии из окисляемых молекул происходит поэтапно, малыми «порциями». Это позволяет извлечь энергию с минимальными потерями в виде тепла, которое безвозвратно рассеивается в окружающем пространстве, поскольку живые системы лишены способности использовать тепловую энергию. Большая часть свободной энергии аккумулируется в форме энергии фосфоангидридных связей молекулы АТФ – главного высокоэнергетического соединения, которое называют также «энергетической валютой» клетки. Меньшая часть извлеченной свободной энергии аккумулируется в форме обладающих повышенной энергией атомов водорода в молекулах НАДН, НАДФН и ФАДН₂. **Катаболические процессы ведут к увеличению энтропии.**

Анаболизм – ферментативный синтез полимерных молекул из сравнительно простых по химическому строению предшественников (прекурсоров). Анаболические пути **расходятся**, образуя в результате биосинтеза множество различных сложных по химической структуре продуктов (из относительно не-

большого числа простых по строению предшественников) (рис. 6). **Анаболические процессы ведут к уменьшению энтропии.**

Как всякий синтез, анаболизм потребляет свободную энергию, которая поставляется молекулами АТФ и НАДФН. Вновь синтезированные биомолекулы необходимы для обновления структурно-функциональных элементов клеток и тканей. Анаболические процессы в основном представлены реакциями восстановления, протекающими с участием НАДФН (рис. 6).

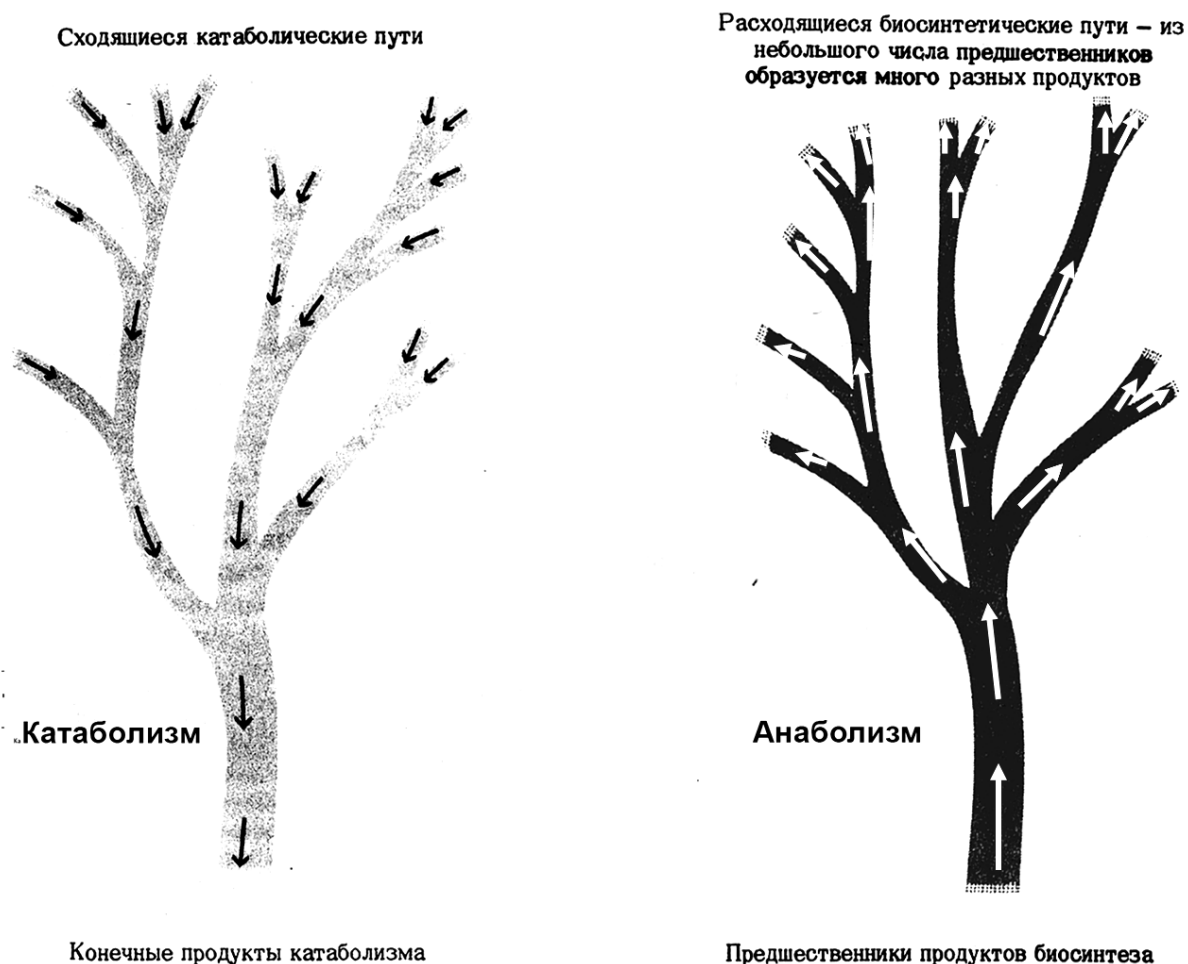


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая конвергенцию (схождение, слияние) процессов катаболизма и дивергенцию (разветвление) процессов анаболизма

Катаболические пути сходятся (конвергенция), образуя небольшое число конечных продуктов. Ацетил-КоА является общим конечным продуктом катаболизма липидов, полисахаридов и белков, поступивших в организм извне в составе пищи. Далее ацетильная группа ацетил-КоА поступает в ЦТК, который является общим конечным путем окисления всех видов клеточного «топлива» с образованием CO_2 , H_2O (в дыхательной цепи митохондрий) и аммиака. Анаболические (биосинтетические) пути расходятся (дивергенция), образуя множество разнообразных и сложных по химической структуре продуктов – биомакромолекул – из сравнительно небольшого числа простых по химическому строению молекул-предшественников (прекурсоров).

Каким образом соотносятся между собой катаболические и анаболические процессы?

Во-первых, анаболические и катаболические процессы **протекают в клетках одновременно**. Это возможно благодаря тому, что реакции распада и синтеза **пространственно разделены (разобщены) между собой** благодаря их **компарментализации**. Иными словами, конкретные мультиферментные системы и их коферменты, составляющие метаболический путь, локализованы в строго определенных компартментах (отсеках) клетки: цитоплазма, внутреннее пространство митохондрий (матрикс митохондрий), поверхность мембран эндоплазматического ретикулума и др. Благодаря компартментализации **скорости реакций катаболизма и анаболизма регулируются независимо**.

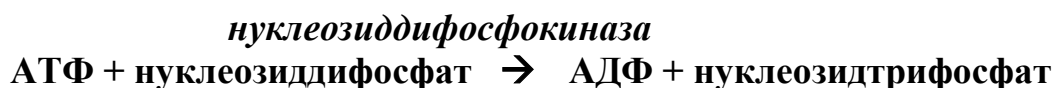
Во-вторых, анаболические и катаболические процессы **взаимно сопряжены**. Главные роли в их сопряжении играют АТФ и НАДФН. Без преувеличения можно утверждать, что АТФ – основной химический посредник, связывающий процессы, идущие с выделением и с потреблением энергии. АТФ циклически рефосфорилируется из АДФ (цикл АТФ-АДФ), НАДФН восстанавливается из НАДФ⁺.

В-третьих, активности процессов анаболизма и катаболизма находятся в организме в состоянии **динамического равновесия** либо **преобладания одного из них над другим** в зависимости от функционального состояния организма. Регулирование этого баланса осуществляют ЦНС, эндокринная система и ключевые (регуляторные) ферменты.

Извлеченная в реакциях катаболизма свободная энергия аккумулируется в **трёх формах**:

1. Макроэргические связи АТФ. АТФ постоянно образуется и потребляется клеткой. Регуляция реакций, поставляющих АТФ, настолько совершенна и оперативна, что в каждый момент времени синтезируется ровно столько АТФ, сколько требуется клетке в её данном функциональном состоянии. Именно поэтому используется термин **«аккумуляция» свободной энергии**, а не «запасание». **АТФ никогда не запасается** (подобно глюкозе в форме гликогена и крахмала или жирным кислотам в форме триацилглицерола). АТФ – главный непосредственно используемый донор свободной энергии в биосистемах, **«универсальная энергетическая валюта»** клетки.

В строго определенные биосинтетические пути энергию поставляют другие нуклеозидтрифосфаты: гуанозин-, уридин- и цитидинтрифосфат (ГТФ, УТФ и ЦТФ). Эти молекулы образуются в результате реакций, катализируемых **нуклеозиддифосфокиназами**. В общем виде уравнение можно представить как:



Нуклеозидтрифосфаты содержатся в клетках в значительно меньших количествах, чем АТФ, но имеют такую же величину **изменения стандартной свободной энергии гидролиза (ΔG°)**. Необходимо подчеркнуть, что в реакциях образования нуклеозидтрифосфатов **ключевая роль принадлежит АТФ**. Без

участия АТФ нуклеозидтрифосфаты не могут быть синтезированы, поскольку свои концевые фосфатные группы они получают только от АТФ.

2. Пиридиновые и флавиновые нуклеотиды: НАДН, ФАДН₂ и НАДФН. Эти молекулы – переносчики атомов Н, которые в катаболических реакциях отщепляются от окисляемых субстратов (жирных кислот, глюкозы и аминокислот) с участием специализированных ферментов – **дегидрогеназ**. Отщепленные атомы Н обладают повышенным запасом свободной энергии, что позволяет им служить **восстановителями**. В частности:

а) НАДН и ФАДН₂ – специфические переносчики Н от окисляемых «топливных» молекул в дыхательную цепь митохондрий, где синтезируется более 95 % общего количества АТФ клетки;

б) НАДФН – главный донор богатых энергией атомов Н для путей биосинтеза. Часто некоторые интермедиаты биосинтетических реакций оказываются более окислены по сравнению с продуктами, что может накладывать серьёзные термодинамические ограничения на ход биохимических превращений. Поэтому, помимо энергии АТФ, для успешного биосинтеза требуются восстановительные эквиваленты. Их и поставляют молекулы НАДФН – отсюда термин **«восстановительный биосинтез»**.

3. Трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода (Н⁺) на внутренней мембране митохондрий, создаваемый дыхательной цепью. Согласно хемиосмотической теории сопряжения дыхания и фосфорилирования Питера Митчелла, сформулированной им в 1961 г., энергия, заключенная в этом градиенте, используется для синтеза АТФ из АДФ и Фн с участием АТФ-синтетазы (V комплекс дыхательной цепи).

В отдельную категорию выделяют **амфиболические пути**, которые объединяют пути синтеза и распада. Классическими примерами амфиболических путей являются **пентозофосфатный путь** и **цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)**, или **цикл Кребса**. Так, ЦТК является последней фазой катаболизма и одновременно первой фазой анаболизма.

Принципы интеграции метаболических путей

Предположительно около 1 млрд лет эволюции потребовалось для объединения одноклеточных организмов с уже вполне сложившимся метаболизмом в их многоклеточное сообщество. Для того чтобы многоклеточный организм мог возникнуть и затем успешно существовать, исходно одноклеточные организмы должны были научиться взаимодействовать друг с другом так, чтобы их метаболизм, пролиферация и гибель, локализация в том или ином органе или ткани, прочие их функции и характеристики подчинялись прежде всего интересам всего клеточного сообщества. В итоге в здоровом многоклеточном организме наблюдается гармония между его членами, в частности, существует определенное равновесие между процессами пролиферации клеток и их естественной гибелью – апоптозом.

В широком смысле термин **интеграция** (от лат. *integratio* – «соединение») обозначает целесообразное объединение отдельных составных частей в единое

целое. В биологии понятие интеграции ввёл английский ученый Г. Спенсер в 1857 году, рассматривая явления дифференциации тканей в ходе эволюции.

Жизнедеятельность организма определяется, с одной стороны, внешней средой, в которой он существует, и, с другой стороны, состоянием его внутренней среды. Функционирование организма находится в постоянной зависимости от окружающей среды, которая активно влияет на его состояние. По этой причине организму постоянно требуется **координировать (согласовывать)** общие метаболические потребности с потребностями отдельных клеток, органов и тканей, из которых он состоит. Такое согласование (**интеграция**) метаболизма достигается путем распределения между органами и тканями молекул, поступающих из окружающей среды, и перераспределения между органами и тканями молекул, синтезируемых в организме.

Под **интеграцией метаболизма (метаболических путей)** подразумевают скоординированность (согласованность) всех реакций обмена, которая обеспечивает максимальное удовлетворение потребностей целостного организма, что позволяет ему функционировать оптимальным образом. Благодаря интеграции реакций обмена многоклеточный организм способен адекватно и своевременно реагировать на постоянно меняющиеся условия окружающей среды и адаптироваться к ним.

В обеспечении жизнедеятельности организма интеграция метаболических путей решает две фундаментальные задачи:

1. Согласует биохимические реакции внутри клетки и/или целого организма, что оптимизирует производство (извлечение) метаболически доступной энергии.
2. Обеспечивает адекватность реакций обмена по отношению к внешней среде, то есть к тем потокам вещества, энергии и информации, которые поступают в организм извне. Этим достигается оптимизация биосинтеза макромолекул, необходимых для обновления клеточных структур (ключевых метаболитов и коферментов).

Ключевая роль печени в интеграции обмена углеводов, липидов и белков, а также в стабилизации метаболического гомеостаза организма

Печень осуществляет взаимодействие реакций обмена углеводов, жиров и белков. Выполнению этой роли печенью способствует её уникальное анатомическое расположение. Все питательные вещества после всасывания в тонком кишечнике, **за исключением длинноцепочечных жирных кислот**, попадают в воротную вену, а по ней – в печень. Другие продукты гидролиза липидов: длинноцепочечные жирные кислоты, 2-моноацилглицеролы, холестерол, а также соли жёлчных кислот – образуют в просвете кишечника структуры – смешанные мицеллы. Мицеллы сближаются с щёточной каймой клеток слизистой оболочки тонкого кишечника (энтероцитов), и липидные компоненты мицелл диффундируют через их мембраны внутрь энтероцитов. В цитоплазме энтероцитов вышеуказанные липиды включаются в ресинтез липидов – фосфолипидов и эфиров холестерина, специфичных для данного вида организма. Эти липиды «упаковываются» в экзоцитируемые транспортные частицы – **хиломик-**

роны. Состав хиломикронов: 83–84 % триацилглицерола, 8 % холестерина, его эфиры и 7 % фосфолипидов. Остальную долю – около 2 % – составляют особые белки – апопротеины: апо-В-48 и апо-В-100, которые не только формируют структуру хиломикронов и обеспечивают растворимость хиломикронов в водной среде организма, но также определяют их взаимодействие с рецепторами на поверхности гепатоцитов – рецепторами **ремнантных хиломикронов** (*remnant* (англ.) – остаток, пережиток). Ремнантные (остаточные) формы хиломикронов получили свое название по причине того, что синтезированные в энтероцитах хиломикроны сначала отдают часть переносимых ТАГ периферическим тканям (в основном мышцам), превращаясь в свои ремнантные формы, которые в конечном итоге поглощаются из кровотока печенью посредством связывания с вышеупомянутыми рецепторами гепатоцитов. Важно помнить, что из энтероцитов хиломикроны попадают в лимфу и далее в грудной лимфатический проток, впадающий в верхнюю полую вену. Таким образом, значительная доля липидов пищи доставляется в печень через печеночную артерию. Всасывание жирных кислот с короткой и средней длиной цепи (образующихся, например, при переваривании липидов молока) происходит без участия смешанных мицелл. Такие жирные кислоты из энтероцитов тонкого кишечника попадают непосредственно в кровь, где образуют комплекс с альбумином, и в его составе доставляются в печень.

Важное значение имеет также и то, что метаболическая пластичность печени весьма значительна. Так, оборот ферментов печени (синтез-распад) в 5–10 раз выше, чем таковой в других тканях (даже по сравнению со скелетными мышцами).

Для понимания последующего материала необходимо помнить **пять стратегий регуляции метаболизма:**

I стратегия: Гормональная регуляция. Гормоны (**первичные мессенджеры**) действуют на клеточный метаболизм посредством высокоаффинного связывания с рецепторами, локализованными на клеточной поверхности или внутри клетки. Под влиянием ряда гормонов активированные рецепторы стимулируют ферменты, синтезирующие **вторичные мессенджеры**. Последние влияют на активность внутриклеточных ферментов-мишеней и/или других белков.

II стратегия: Компартиментализация катаболических и анаболических процессов. Примеры:

матрикс митохондрий: ЦТК, синтез кетоновых тел и β -окисление жирных кислот;

цитоплазма: гликолиз, синтез липидов, пуринов и пиримидинов и пентозо-фосфатный путь;

отчасти в митохондриях и отчасти в цитоплазме: глюконеогенез и синтез мочевины.

III стратегия: Обеспечивает быстрое (оперативное) изменение каталитической активности регуляторных (ключевых) ферментов, а следовательно, всего метаболического пути. Ключевые ферменты аллостерические по своей природе. Их активность меняется под влиянием аллостерических ре-

гуляторов: активаторов/ингибиторов, набор которых весьма разнообразен. Очень низкие концентрации высокоспецифичных аллостерических регуляторов кратно меняют скорость метаболического пути при одной и той же концентрации субстрата.

IV стратегия: Ковалентная модификация ферментов. Действует параллельно с аллостерической регуляцией и реализуется так же быстро. Активность ключевых ферментов регулируется **фосфорилированием (протеинкиназы) – дефосфорилированием (протеинфосфатазы)**. III и IV стратегии дополняют друг друга.

V стратегия: Изменение количества фермента – усиление его биосинтеза либо деградация уже имеющихся молекул фермента. Тип медленной регуляции, для её реализации требуются часы.

Одним из основных проявлений интеграции метаболических превращений углеводов, липидов и белков является существование **общих предшественников и общих промежуточных продуктов** их обмена. Это, прежде всего, **общий фонд атомов углерода и общий промежуточный продукт метаболизма – ацетил-КоА**. Важнейшими конечными этапами превращений, связующих метаболические процессы на различных этапах, являются **цикл лимонной кислоты, или цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательная цепь митохондрий**. В частности, ЦТК – главный источник атомов углерода для последующих реакций глюконеогенеза, синтеза жирных кислот и мочевины.

В курсе частной биохимии подробно рассматривались вопросы регуляции обмена углеводов, липидов и белков **посредством изменения активностей ключевых (регуляторных) ферментов** этих метаболических путей. В связи с этим в настоящей лекции мы рассмотрим **вопросы интеграции углеводного, липидного и белкового обменов на уровне целостного организма, которая обеспечивается работой эндокринной системы**. Следует помнить, что все элементы эндокринной системы организма в той или иной степени активно участвуют в интеграции метаболизма. Вместе с тем ведущие роли в интеграции обмена играют гормоны **инсулин, глюкагон и адреналин**.

Инсулин. Гормон синтезируется и секретируется β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Инсулин оказывает плеiotропный (многожественный) эффект на клеточный метаболизм, не ограничивающийся обеспечением транспорта глюкозы из крови в цитоплазму инсулин-зависимых клеток. Эффекты инсулина способствуют аккумуляции энергии, гормон стимулирует гликогенез (синтез гликогена), липогенез и синтез белка.

Функционально инсулин является антагонистом глюкагона. **Глюкагон** синтезируется и секретируется α -клетками островков Лангерганса. Регуляция секреции этой пары гормонов организована так, что в условиях стимуляции секреции одного гормона секреция второго гормона подавляется. Физиологическим фактором, вызывающим секрецию инсулина и повышение его концентрации в крови, является прием пищи, обеспечивающий транзиторную гипергликемию. Усиление секреции глюкагона и повышение его концентрации в крови происходит при голодании, которое сопровождается падением концентрации

глюкозы в крови. Биохимические детали сигнальных каскадов глюкагона и инсулина будут рассмотрены в лекциях 8 и 9.

Инсулин в регуляции углеводного обмена

Трансмембранный перенос глюкозы. Клетки скелетных мышц (**миоциты**) и жировой ткани (**адипоциты**) относятся к категории **инсулинозависимых**, поскольку транспорт глюкозы из крови в их цитоплазму обеспечивает глюкозный транспортер **ГЛЮТ4**. В неактивированных инсулином клетках **ГЛЮТ4** содержится не в цитоплазматической мембране, а хранится в составе специализированных цитоплазматических везикул. Повышение концентрации инсулина в крови и связывание его с рецептором запускают специализированный внутриклеточный сигнальный путь (подробно будет рассмотрен в лекции 9), благодаря которому происходит рекрутирование везикул, содержащих **ГЛЮТ4**, из цитоплазмы в клеточную мембрану. В итоге **ГЛЮТ4** встраиваются в мембрану и обеспечивают поступление глюкозы из крови внутрь миоцитов и адипоцитов путем облегченной диффузии (вдоль градиента её концентрации).

Клетки паренхимы печени – **гепатоциты** – относятся к категории **инсулинонезависимых**. В клеточной мембране гепатоцитов постоянно присутствует другой представитель семейства глюкозных транспортеров – **ГЛЮТ2**. Он обеспечивает **облегченную трансмембранную диффузию** глюкозы вдоль градиента её концентрации независимо от его направления: из крови в гепатоцит (адсорбтивная фаза пищеварения) или из гепатоцита в кровь (на первой стадии голодания, когда в печени активируется расщепление гликогена).

Во время **адсорбтивной фазы пищеварения** инсулин в печени стимулирует синтез фермента **глюкокиназы**. В результате этого мощность системы внутриклеточного фосфорилирования поглощенной глюкозы (глюкоза → глюкозо-6-фосфат) увеличивается, тем самым способствуя поддержанию максимального градиента концентрации свободной (нефосфорилированной) глюкозы между кровью и цитоплазмой гепатоцитов. Следует помнить, что только свободная глюкоза подлежит трансмембранному переносу. Фосфорилированные формы глюкозы не могут покидать цитоплазму клеток.

При **голодании** мобилизация глюкозы, запасенной в форме гликогена, происходит под влиянием гормона **глюкагона**. В результате активации глюкагоном фосфоролитического расщепления гликогена (гликогенолиза) освобождается глюкозо-1-фосфат, который с помощью **фосфоглюкомутазы** трансформируется в глюкозо-6-фосфат. Благодаря присутствующей в гепатоцитах **глюкозо-6-фосфатазе** из глюкозо-6-фосфата образуется свободная глюкоза, которая транспортируется из гепатоцитов в кровь вдоль градиента концентрации с помощью **ГЛЮТ2**. У человека это обеспечивает стабилизацию нормальной концентрации глюкозы в крови в течение первых 18–24 часов голодания. Запасов гликогена в печени хватает на этот период времени. Если же голодание продолжается, то «эстафету» по стабилизации концентрации глюкозы в крови подхватывает глюконеогенез, львиная доля ферментов которого локализована в печени. Незначительный вклад вносят почки, активность глюконеогенеза которых едва составляет 10 % от печеночного процесса.

В мышцах нет фермента **глюкозо-6-фосфатазы**, катализирующего образование свободной глюкозы, которая способна покидать клетку и выходить в кровоток. Поэтому глюкозо-6-фосфат, образовавшийся из глюкозо-1-фосфата (продукта гликогенолиза, активированного **адреналином**), полностью включается в окислительные процессы, обеспечивая **срочный приток энергии для интенсивной мышечной работы** (реакция «борись или убегай»).

Окислительный распад глюкозы (гликолиз) в печени. Инсулин стимулирует синтез *de novo* ключевых ферментов гликолиза: **гексокиназы**, **фосфофруктокиназы-1** и **пируваткиназы** путем активации соответствующих **транскрипционных факторов**. Количество ключевых ферментов гликолиза увеличивается. Так под влиянием **инсулина** происходит усиление окисления глюкозы.

Согласованная регуляция синтеза и расщепления гликогена в печени и мышцах

Синтез гликогена. Ключевой фермент синтеза гликогена – **гликогенсинтаза**. Фермент существует в двух формах: активной – **гликогенсинтаза а** (нефосфорилирована) – и неактивной – **гликогенсинтаза b** (фосфорилирована). В переходе фермента в неактивную *b*-форму ведущую роль играет **киназа-3-гликогенсинтазы (GSK3 – glycogen synthase kinase 3)**. **GSK3** фосфорилирует три остатка серина в составе C-конца молекулы синтазы, что вызывает полную потерю активности **гликогенсинтазы** (рис. 7, левая половина).

Инсулин, запуская свой сигнальный каскад, активирует **протеинкиназу B (ПКВ)**, субстратом которой является **GSK3**. **GSK3** в результате своего фосфорилирования под влиянием **ПКВ** теряет активность. Благодаря тому, что **GSK3** лишается активности, **гликогенсинтаза а** перестаёт подвергаться фосфорилированию и остаётся в нефосфорилированной, то есть активной форме *a* – синтез гликогена продолжается. Одновременно с этим **инсулин** активирует **фосфопротеинфосфатазу 1 (PP1 – phosphoprotein phosphatase-1)**, которая благодаря **гликоген-связывающему** белку ассоциирована с гранулами гликогена. Под влиянием активированной **PP1** начинается дефосфорилирование той части молекул **гликогенсинтазы**, которые были ранее фосфорилированы и находились в **неактивной форме b**. В этом процессе важная роль принадлежит **глюкозо-6-фосфату** – аллостерическому активатору процесса превращения **гликогенсинтазы b** в **гликогенсинтазу а**. **Глюкозо-6-фосфат** связывается с аллостерическим центром в молекуле **гликогенсинтазы b**, чем существенно усиливает дефосфорилирующее действие **PP1**. В мышцах функции, аналогичные **PP1**, могут выполнять другие фосфатазы.

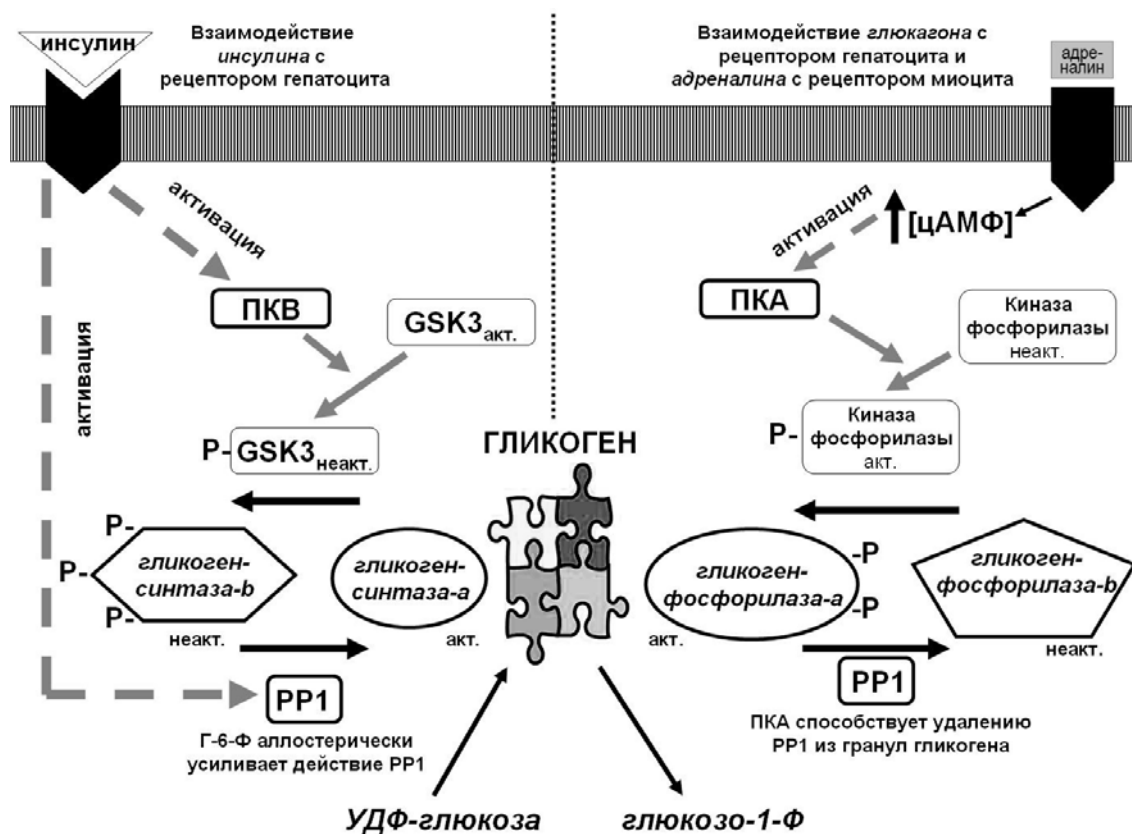


Рис. 7. Схема согласованной регуляции синтеза и расщепления гликогена в печени и скелетных мышцах

Иными словами, **инсулин активирует синтез гликогена в печени и скелетных мышцах**, реализуя два **параллельных синергичных регуляторных механизма**. С одной стороны, благодаря «выключению» **GSK3** и, с другой стороны, благодаря активации **PP1**. В итоге в клетках образуется максимальное количество молекул **гликогенсинтазы**, находящихся в активной, нефосфорилированной форме **а**.

Кроме того, в скелетных мышцах **инсулин** также посредством активации **PKB** стимулирует движение **ГЛЮТ4** в составе везикул из цитоплазмы и встраивание их в плазматическую мембрану: глюкоза из крови начинает поступать в миоциты.

Расщепление гликогена. Реакцию катализирует **гликогенфосфорилаза**, которая, подобно **гликогенсинтазе**, существует в двух формах – активной (форма **а**) и неактивной (форма **б**). Однако в отличие от **гликогенсинтазы** активная форма **гликогенфосфорилазы** фосфорилирована, а неактивная форма нефосфорилирована. Фосфоролитическое расщепление гликогена стимулируется под влиянием **глюкагона** (орган-мишень – печень) и **адреналина** (орган-мишень – скелетные мышцы) (рис. 7, правая половина).

Адреналин и глюкагон повышают внутриклеточную концентрацию **цАМФ**, которая активирует **цАМФ-зависимую протеинкиназу А (PKA)**. **PKA** фосфорилирует и этим активирует **киназу гликогенфосфорилазы б**. Эта киназа фосфорилирует остатки серина – по одному в каждой из двух субъединиц неак-

тивной **гликогенфосфорилазы b**, которая в результате этого переходит в активную форму – **гликогенфосфорилазу a. ПКА**, помимо упомянутого выше, фосфорилирует также **гликоген-связывающий белок**, который связывает **PP1** с гранулами гликогена. В результате фосфорилирования этот белок теряет способность удерживать **PP1**, которая покидает гранулы: физически устраняется фактор, способный негативно повлиять на активную форму **гликогенфосфорилазы**.

В печени и мышцах параллельно с гормональной регуляцией расщепления гликогена действуют дополнительные регуляторные факторы.

В **печени** действует **аллостерический механизм** регуляции **гликогенфосфорилазы**. В результате усиления мобилизации глюкозы из гликогена под влиянием глюкагона концентрация глюкозы в крови повышается. Далее глюкоза из крови проникает с помощью **ГЛЮТ2** в цитоплазму гепатоцитов и связывается с аллостерическим ингибиторным центром в составе **гликогенфосфорилазы a**. Это вызывает конформационные перестройки молекулы активного фермента, что делает доступными фосфорилированные остатки серина для действия **фосфопротеинфосфатазы PP1**. Под действием **PP1** активная **гликогенфосфорилаза a** дефосфорилируется и теряет активность (переход в форму **гликогенфосфорилазы b**).

В **мышцах** действуют два регуляторных фактора. Во-первых, повышение концентрации **ионов Ca^{2+}** . В результате мышечного сокращения в цитоплазме клеток повышается концентрация **Ca^{2+}** , под влиянием которого активируется белок **кальмодулин** (образуется комплекс **Ca^{2+} -кальмодулин**). Этот комплекс связывается с Δ -субъединицей **киназы гликогенфосфорилазы b** и активирует её, тем самым способствуя образованию активной **гликогенфосфорилазы a** (фосфорилированной). Во-вторых, повышение концентрации **АМФ** в результате активного потребления АТФ работающими мышцами. АМФ – аллостерический активатор **гликогенфосфорилазы**, действующий дополнительно и синергично с механизмом фосфорилирования. Высокие концентрации АТФ отменяют эффект АМФ: АТФ вытесняет АМФ из аллостерического центра **гликогенфосфорилазы**.

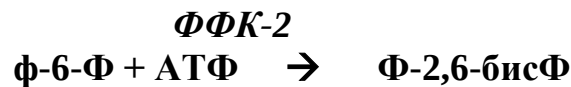
Подводя итог сказанному, следует подчеркнуть, что представленные выше механизмы регуляции обеспечивают выполнение принципа: при активации синтеза гликогена одновременно подавляется его распад и наоборот. Активности **гликогенсинтазы** и **гликогенфосфорилазы** регулируются путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Поглощаемая пища (гипергликемия) стимулирует секрецию **инсулина** и повышает его концентрацию в крови. Инсулин поддерживает **гликогенсинтазу** в активной нефосфорилированной форме, что запускает синтез гликогена. В этой ситуации концентрации глюкагона и **адреналина** в крови минимальны, что не позволяет срабатывать их механизмам активации расщепления гликогена. Наоборот, в условиях голодания (гипогликемия) или при стрессе в крови повышаются соответственно концентрации **глюкагона** и **адреналина**. В обоих случаях концентрация **инсулина** в крови будет минимальна. Благодаря такому эндокринному статусу преимущество получают регуляторные сигналы глюкагона и адреналина, что запускает расщепление за-

пасов гликогена в мышцах и гепатоцитах на фоне «выключенного» синтеза гликогена.

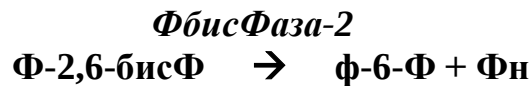
Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза

Ключевая роль в согласованной регуляции активностей гликолиза и глюконеогенеза принадлежит метаболиту **фруктозо-2,6-бисфосфату (Ф-2,6-бисФ)** (рис. 8). Этот метаболит синтезируется с участием изофермента *фосфофруктокиназы*, обозначаемого как *фосфофруктокиназа-2 (ФФК-2)*. Следует помнить, что **ФФК-1** – фермент гликолиза, катализирующий синтез **фруктозо-1,6-дифосфата**.

Синтез **фруктозо-2,6-бисфосфата** происходит в реакции:



Распад **фруктозо-2,6-бисфосфата** катализирует **Ф-2,6-бисФаза-2 (ФбисФаза-2)**:



Эти ферменты образуют единый, **бифункциональный белок (БФБ)**.

Ф-2,6-бисФ является **мощным аллостерическим регулятором**. Он **активатор** для **ФФК-1** (гликолиз) и **ингибитор** для **ФбисФазы-1** (глюконеогенез). Иными словами, этот метаболит **стимулирует гликолиз** и **тормозит глюконеогенез**. Стационарная концентрация **Ф-2,6-бисФ** определяется соотношением скоростей его синтеза и распада, которые регулируются **глюкагоном** и **инсулином**.

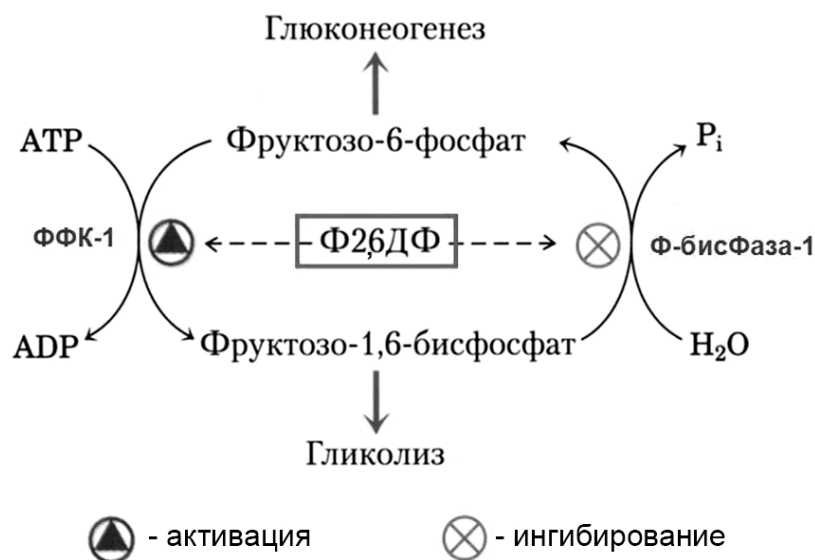


Рис. 8. Фруктозо-2,6-бисфосфат как аллостерический регулятор активности ключевых ферментов гликолиза (*ФФК-1*) и глюконеогенеза (*Ф-бисФ-азы*) [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Под влиянием **инсулина** происходит активация **PP1**, которая дефосфорилирует **БФБ**, что приводит к активации **ФФК-2**. Концентрация **Ф-2,6-бисФ** повышается и **гликолиз** активизируется благодаря стимуляции активности **ФФК-1** (рис. 9, правая половина рисунка):

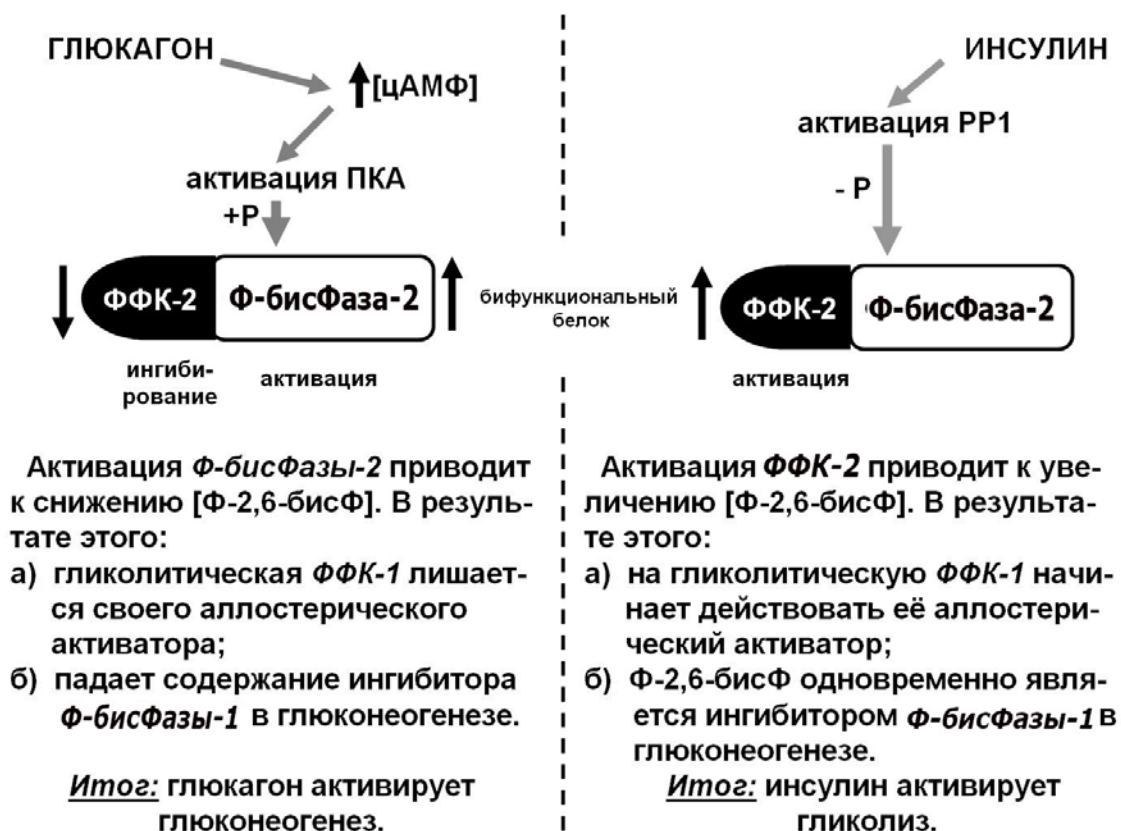


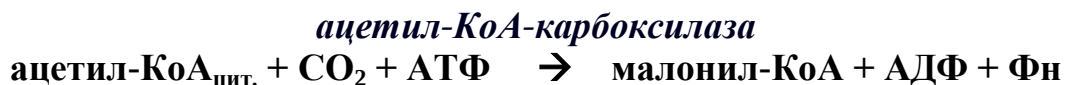
Рис. 9. Схема эндокринной регуляции активностей гликолиза и глюконеогенеза посредством изменения концентрации **Ф-2,6-бисФ**

Под влиянием **глюкагона** в клетке увеличивается концентрация **цАМФ**, которая активирует **PKA**. **PKA** фосфорилирует **БФБ**, в результате чего активируется **ФбисФаза-2** и ингибируется **ФФК-2**. В итоге концентрация **Ф-2,6-бисФ** падает, поскольку преимуществу получает реакция его распада. Благодаря этим событиям, повышение концентрации глюкагона в крови **подавляет активность гликолиза** (падает содержание активатора **ФФК-1**) и **стимулирует глюконеогенез** (рис. 9, левая половина рисунка).

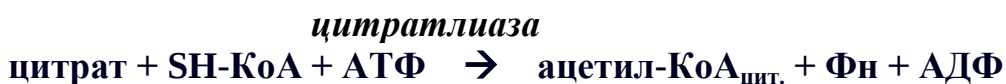
Согласованная регуляция синтеза и окисления жирных кислот

Если в результате приема пищи в печень поступает избыток глюкозы, который уже не используется для синтеза гликогена, то глюкоза направляется для **синтеза жирных кислот** и далее – **триацилглицерола (ТАГ)** и **холестерола**. В этих условиях **окисление жирных кислот (β-окисление)** тормозится. В координации метаболизма жирных кислот ключевую роль играют два фермента: **ацетил-КоА-карбоксилаза** и **карнитинацилтрансфераза I**.

Ацетил-КоА-карбоксилаза – первый и лимитирующий фермент синтеза жирных кислот, катализирует реакцию образования ключевого метаболита процесса – **малонил-КоА**:



Реакция протекает в цитоплазме. Цитоплазматический **ацетил-КоА** (**ацетил-КоА_{цит.}**) образуется из внутримитохондриального **ацетил-КоА**. В условиях избыточного окисления глюкозы и поступления **ацетил-КоА** в ЦТК образуется эквимольное количество **цитрата**. Избыточный **цитрат** проникает через мембрану митохондрий в цитоплазму, где снова превращается в **ацетил-КоА_{цит.}** с помощью реакции, катализируемой **цитратлиазой**:



Образуемый таким образом **ацетил-КоА_{цит.}** участвует далее в синтезе **малонил-КоА**.

Карнитинацилтрансфераза I – фермент, лимитирующий транспорт длинноцепочечных жирных кислот (С-атомов > 10) в матрикс митохондрий для β-окисления. Фермент локализован на наружной стороне внутренней мембраны органелл:



КоА-эфиры длинноцепочечных жирных кислот, для которых мембрана митохондрий непроницаема, превращаются в **эфиры карнитина (ацилкарнитины)**, легко преодолевающие этот барьер путем диффузии. Внутри митохондрий **ацилкарнитины** снова превращаются в **ацил-КоА** с участием **карнитинацилтрансферазы II** (расположена на внутренней поверхности внутренней мембраны) и включаются в β-окисление.

Пища с высоким содержанием углеводов обуславливает гипергликемию, которая стимулирует секрецию инсулина и повышает его концентрацию в крови. Под влиянием сигнала инсулина внутри клетки активируется специфическая **фосфатаза**, которая дефосфорилирует **ацетил-КоА-карбоксилазу**, чем **активирует** фермент. В результате начинается синтез малонил-КоА, его концентрация внутри клетки увеличивается, что приводит к ингибированию **карнитинацилтрансферазы I**, поскольку **малонил-КоА** является **аллостерическим ингибитором** фермента. Итогом является подавление транспорта жирных кислот внутрь митохондрий и их окисления.

При голодании концентрация глюкозы в крови уменьшается, что вызывает повышение секреции **глюкагона**. Под влиянием **глюкагона** внутри клетки увеличивается концентрация **цАМФ**, которая активирует **цАМФ-зависимую протеинкиназу А (ПКА)**. **ПКА** фосфорилирует **ацетил-КоА-карбоксилазу**, в

результате чего фермент **инактивируется**. В итоге падает концентрация **малонил-КоА**, и ингибирование транспорта жирных кислот в митохондрии отменяется. Жирные кислоты включаются в **β -окисление**, обеспечивая клетку энергией.

Взаимосвязи метаболизма белков, липидов и углеводов

Интеграцию метаболизма белков, липидов и углеводов наиболее полно можно охарактеризовать на примере взаимопревращений аминокислот, жирных кислот и глюкозы (рис. 10).

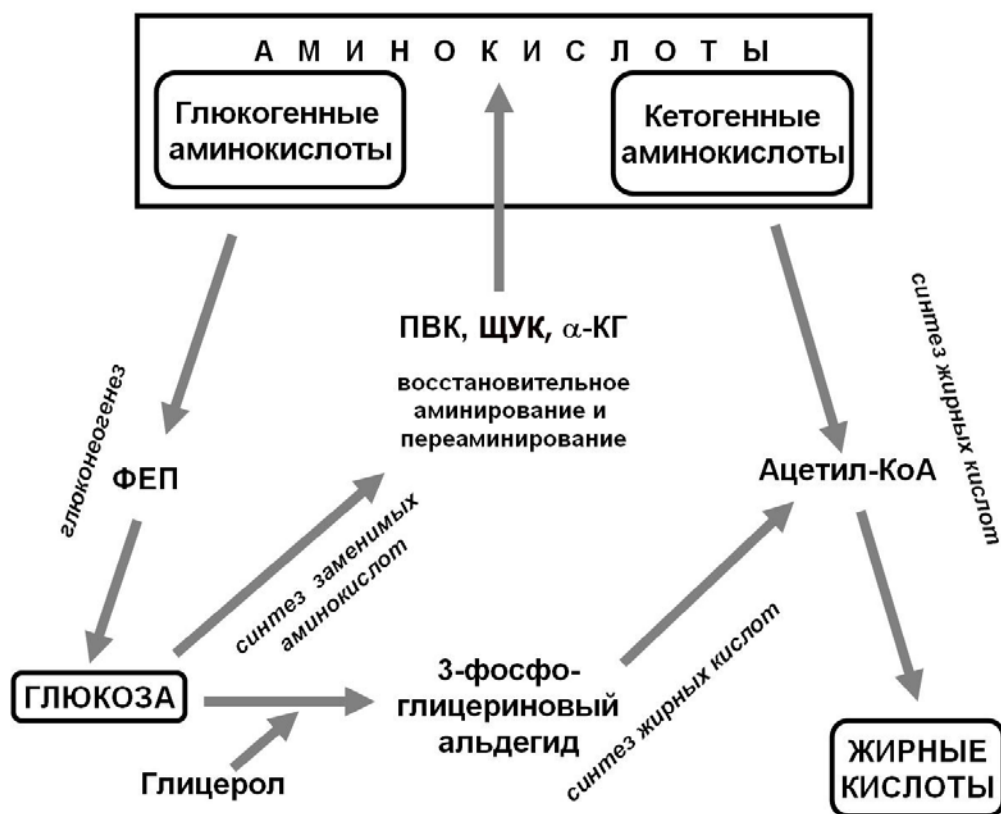


Рис. 10. Схема интеграции обмена аминокислот, глюкозы и жирных кислот

ФЕП – фосфоенолпируват, **ПВК** – пировиноградная кислота, **ЩУК** – щавелевоуксусная кислота, **α -КГ** – α -кетоглутаровая кислота.

1. **Глюконеогенез** – синтез глюкозы из аминокислот происходит через стадию образования **фосфоенолпирувата**. В процессе участвуют глюкогенные аминокислоты: **арг, асп, цис, глу, глн, гли, гис, мет, про, сер, тре, три, вал**.

2. **Синтез жирных кислот** протекает через стадию образования **ацетил-КоА**. Существуют два типа субстратов для этого пути:

а) Синтез из кетогенных аминокислот: **лей, лиз, фен, тир**.

б) Синтез из глюкозы и глицерола через стадию образования **3-фосфоглицеринового альдегида** и далее через **ацетил-КоА**.

3. Синтез заменимых аминокислот. Происходит путем восстановительного аминирования и трансаминирования с участием трех кетокислот: **пирувата, ЩУК и α -кетоглутарата.**

Схема на рис. 10 также иллюстрирует факт, согласно которому жирные кислоты практически не превращаются в углеводы и аминокислоты.

Заключение

Метаболизм – это всё многообразие химических реакций, которые протекают в живых организмах и составляют основу его жизнедеятельности. Это высокоинтегрированный и целенаправленный процесс, реализующийся в форме последовательных мультиферментных реакций. Метаболические процессы – единство катаболических (деградация молекул) и анаболических (синтез) реакций. Катаболические реакции служат для извлечения метаболически доступной энергии (свободной энергии). Её большая часть аккумулируется в форме макроэргических связей молекулы АТФ. Свободная энергия расходуется в анаболических процессах для биосинтеза биомакромолекул. Анаболические и катаболические процессы протекают в клетках одновременно. Это возможно благодаря пространственному разделению (компартиментализации) этих процессов между собой. Благодаря компартиментализации скорости реакций катаболизма и анаболизма регулируются независимо.

Под интеграцией метаболизма подразумевают скоординированность и согласованность всех реакций обмена, которые обеспечивают максимальное удовлетворение потребностей целостного организма, что позволяет ему функционировать оптимальным образом. Благодаря интеграции реакций обмена организм адекватно и своевременно реагирует на постоянно меняющиеся условия окружающей среды и адаптируется к ним.

На организменном уровне ведущая роль в интеграции обмена углеводов, липидов и белков принадлежит эндокринной системе, все элементы которой в той или иной степени активно участвуют в интеграции метаболизма. Ведущие роли в интеграции обмена играют гормоны инсулин, глюкагон и адреналин.

ЛЕКЦИЯ 2

ТЕМА: КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА – ВАЖНЕЙШИЙ ЭЛЕМЕНТ ИНТЕГРАЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

План лекции:

1. Структура и функции цитоплазматической мембраны клеток животных.
2. Жидкостно-мозаичная (fluid mosaic) модель Сингера и Николсона и её дополнения по Симонсу и ван Мееру.
3. Рафты, сигнальные платформы и кавеолы. Их структура и функции.
4. Периферические, интегральные и амфитропные белки цитоплазматической мембраны.
5. Основные свойства систем, опосредующих трансмембранную передачу внешних регуляторных сигналов.
6. Общие представления о мембранных (поверхностных) и внутриклеточных рецепторах и свойства их лигандов.

Заключение

Структура и функции цитоплазматической мембраны

Цитоплазматическая мембрана образует физический полупроницаемый барьер, который отграничивает внутриклеточное пространство клетки от внеклеточной среды. Это барьер между двумя водными компартментами: вне- и внутриклеточным. Мембрана обеспечивает сохранение существенного различия между клеточным содержимым и окружающей средой, поддерживает разницу концентраций ионов и молекул по обе её стороны. **Цитоплазмой** называют всё содержимое клетки между внешней мембраной ядра клетки и наружной плазматической мембраной клетки. **Цитозолем** называют водный раствор цитоплазмы между внутриклеточными органеллами.

С цитоплазматической мембраной связаны поверхностные рецепторы для различного рода первичных мессенджеров (гормонов, цитокинов, факторов роста и др.), а также многие ферментные системы, участвующие в обеспечении жизнедеятельности клетки, органа и организма в целом. Иными словами, мембраны участвуют во взаимодействии между компартментами, которые они разделяют, двумя способами:

а) Посредством физического переноса ионов и/или метаболитов через мембрану (внутри компартмента или из него).

б) В форме передачи информации при помощи конформационных изменений, индуцированных в мембранных компонентах (рецепторах).

В связи с этим цитоплазматическая мембрана рассматривается в качестве одного из важных в функциональном отношении компартментов (отсеков) клетки. Вопросы компартментализации метаболизма были детально рассмотрены в лекции 1.

Большое значение в изучении ультраструктуры клеток сыграло изобретение электронного микроскопа, который начали выпускать серийно с 1939 года. Однако только в 1950 году был сконструирован ультрамикротом, позволяющий делать срезы тканей требуемой толщины – 20–200 нм. Благодаря этому удалось, наконец, измерить толщину цитоплазматической мембраны клеток животных. Она составляет в среднем 8 нм (5–10 нм) (рис. 11).

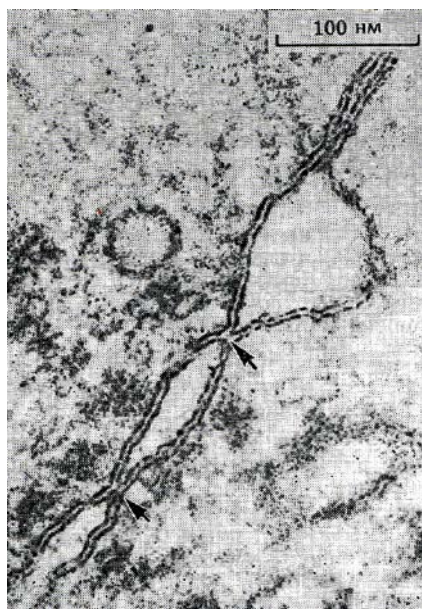


Рис. 11. Электронно-микроскопический снимок гепатоцитов мышцы

Стрелки показывают контакты между клетками.

Функции цитоплазматической мембраны

1. Барьерная функция.
2. Структурная функция – придание определенной формы клеткам в соответствии с выполняемыми функциями.
3. Регуляторная функция – контроль обмена молекулами между внутри- и внеклеточными пространствами.
4. Передача внеклеточного сигнала внутрь клетки посредством рецепторов и активная роль в межклеточной коммуникации.
5. Участие в метаболизме за счет локализованных в мембране различных ферментов.
6. Электрогенная функция – формирование электрического потенциала за счет перераспределения ионов K^+ и Na^+ (мембранный потенциал нервных клеток составляет 90 мВ).
7. Идентификация принадлежности данной клетки данному организму. Генетическое сходство, то есть клетка принадлежит этому же организму, либо эта клетка генетически чужеродная. Идентификация осуществляется благодаря расположенным на её поверхности видоспецифичным гликопротеинам и полисахаридам.

Согласованная работа всех систем цитоплазматической мембраны (рецепторов, ферментов, молекул-переносчиков и др.) абсолютно необходима для **сохранения клеточного гомеостаза**.

Строение цитоплазматической мембраны

По своему строению любые биомембраны (в том числе цитоплазматическая мембрана) являются нековалентными надмолекулярными структурами, представляющими собой **фосфолипидный бислой** (рис. 12). Их главные составляющие: **липиды** и **белки**, которые взаимно удерживаются за счет множества нековалентных взаимодействий, кооперативных по своему характеру. Благодаря нековалентным взаимодействиям между фосфолипидами, липиды и белки мембраны имеют возможность совершать движения в пределах бислоя. Это позволяет всем биомембранам (в определенных пределах) изменять свою форму без потери целостности – быть **пластичными**.

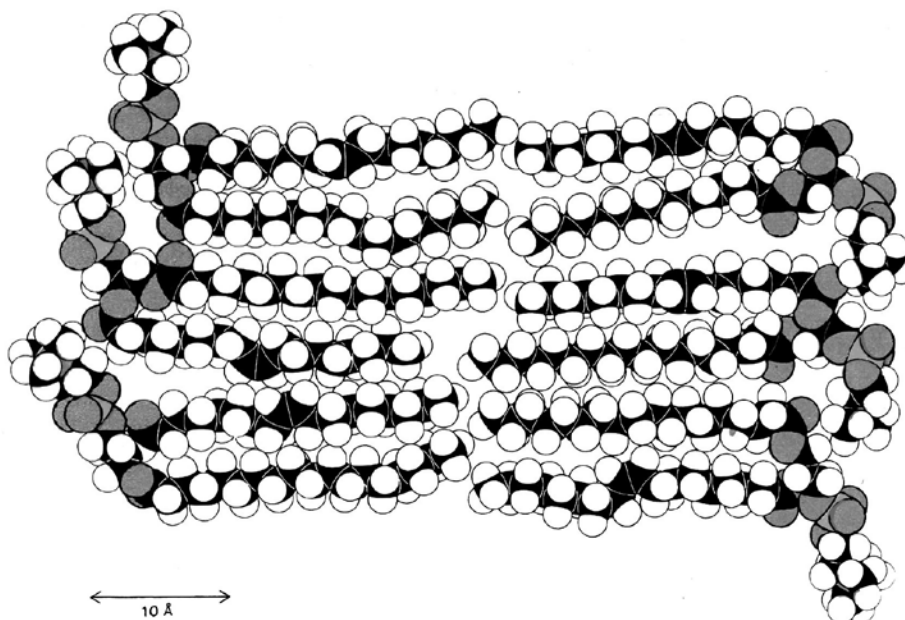


Рис. 12. Модель фосфолипидного бислоя

«Головки» фосфолипидов, несущие электрические заряды, гидрофильны и обращены в водную фазу. Ацильные цепи фосфолипидов образуют внутреннюю гидрофобную область (зону) липидного бислоя. ($10 \text{ \AA} = 1 \text{ нм}$).

Все биомембраны являются стабильными образованиями. Бислойность мембраны определяется гидрофобными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между липидами. Даже когда состояние внешней среды изменится незначительно (ионная сила или pH), бислой имеет значительный «запас прочности» для сохранения цельности и непроницаемости мембраны.

Липидные бислойные мембраны при физиологических условиях **жидкие**, поскольку время оседлой жизни (время, которое молекула проводит вблизи положения равновесия) фосфолипидной молекулы в мембране невелико, всего 10^{-7} – 10^{-8} с. Фосфолипидные молекулы в составе мембраны образуют двойной слой, их гидрофобные ацильные цепи приблизительно параллельны друг другу.

Молекулы фосфолипидов параллельны друг другу и располагаются слоями. При этом их поперечные размеры меньше продольных, то есть они образуют **жидкие кристаллы**. Жидкокристаллические структуры чувствительны к изменению температуры, химического состава, к наличию электрического поля и т.д. Это определяет **динамичность** липидных бислоевых мембран – изменение их структуры при различных, даже небольших изменениях внешних условий или химического состава.

Степень вязкости жидкокристаллической фазы мембраны и возможность её перехода в гелеобразное состояние зависят от липидного состава мембраны, структуры гидрофобных ацильных цепей фосфолипидов и от температуры.

Гидрофобный эффект и ван-дер-ваальсовы взаимодействия вызывают агрегацию неполярных ацильных цепей фосфолипидов. Причем для длинных ацилов с насыщенными $-C-C-$ связями наблюдается максимальная агрегация, приводящая к образованию гелеобразных мембран. Фосфолипиды с более короткими ацильными цепями, у которых гораздо меньшая площадь взаимодействия с соседями, образуют более жидкие бислои. Кроме того, жесткие изгибы жирнокислотных ацилов вследствие наличия ненасыщенных ($-C=C-$) связей приводят к ослаблению ван-дер-ваальсовых связей с соседями (по сравнению с насыщенными аналогами) и, следовательно, к «разжижению» бислоя. Например, добавление ненасыщенной связи в 18-углеводную ацильную цепь стеариновой кислоты (температура плавления $+69,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) приводит к образованию олеиновой кислоты (температура плавления $+13,4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Насыщенные жирные кислоты имеют линейную форму, ненасыщенные жирные кислоты изогнуты в месте локализации двойной связи (цис-конформация), что препятствует плотной упаковке жирнокислотных ацилов молекул фосфолипидов (рис. 13):

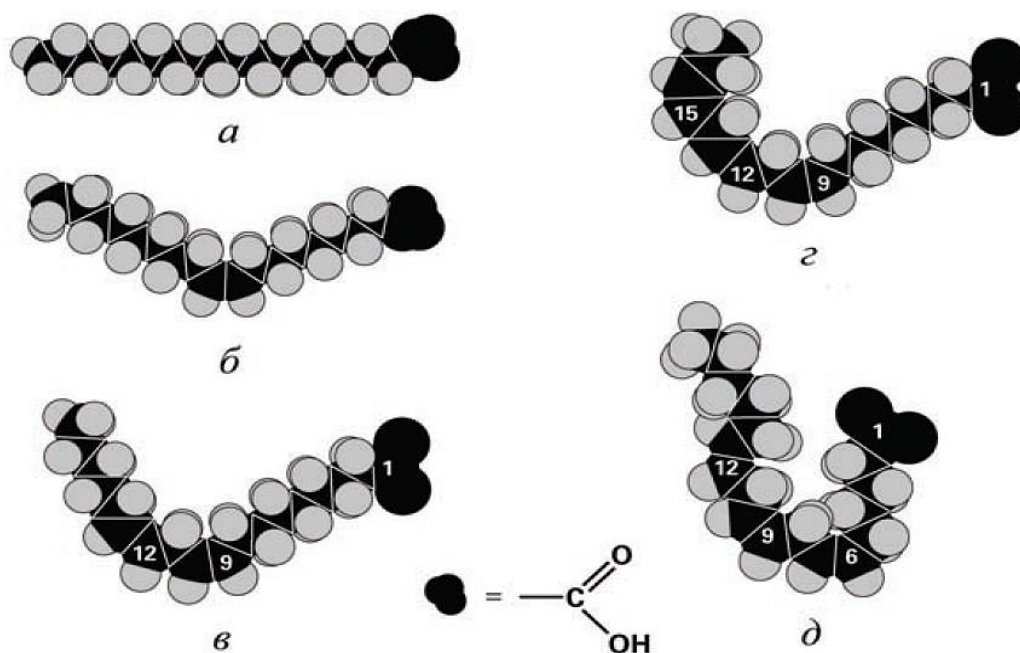


Рис. 13. Структурные формулы жирных кислот
а – стеариновая жирная кислота; **б** – олеиновая жирная кислота;
в – линолевая жирная кислота; **г** – линоленовая жирная кислота;
д – γ -линоленовая жирная кислота.

При температуре **ниже физиологической (норма: +20 – +40 °C)** липидный бислой – полутвердая фаза (**гель**): движения отдельных молекул липидов сильно ограничены (бислой паракристаллический). При температуре **выше физиологической (нагревание)** углеводородные цепи жирных кислот в составе фосфолипидов начинают усиленно двигаться, вращаясь вокруг **-C-C-** связей. Это состояние бислая называют **жидко-разупорядоченным**: происходит переход **гель → жидкий кристалл** (рис. 14).

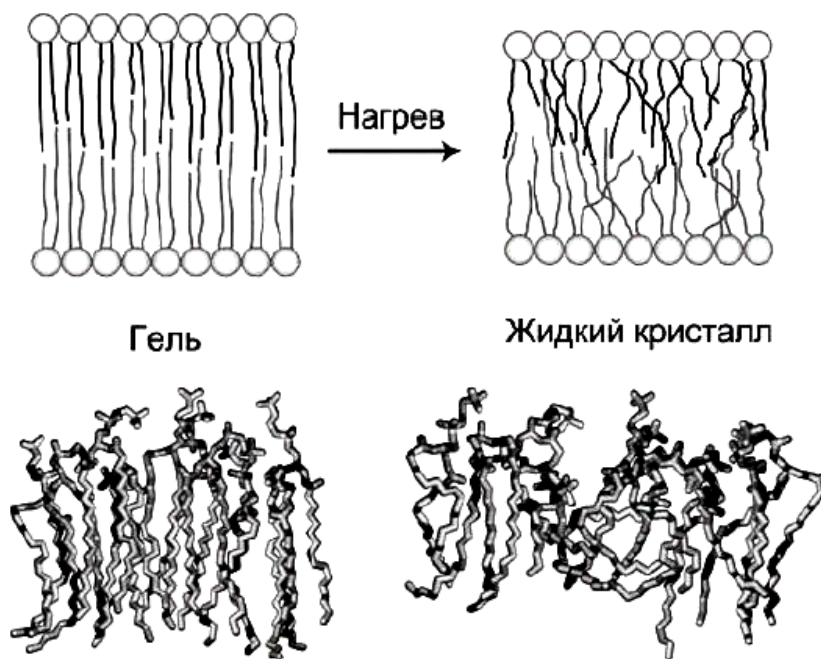


Рис. 14. Фазовый переход гель → жидкий кристалл при нагреве мембран

При физиологических температурах внутренний гидрофобный монослой биомембран, как правило, имеет низкую вязкость и является жидкостью. В состоянии геля молекулы расположены более упорядоченно, чем в жидкокристаллическом. Все гидрофобные углеводородные ацилы фосфолипидных молекул в гель-фазе полностью вытянуты строго параллельно друг другу (имеют транс-конформацию).

При переходе из твердого в жидкокристаллическое состояние объём мембраны увеличивается, поскольку значительно увеличивается площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу (от 0,48 нм² до 0,58 нм²).

Для нормального функционирования мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается адаптационное изменение химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода. Температура фазового перехода понижается при увеличении числа ненасыщенных связей в ацильных цепях. В составе ацила может быть до четырёх ненасыщенных связей. В зависимости от химического состава липидных мембран температура фазового перехода **гель → жидкий кристалл** может меняться от -20 °C (мембраны из насыщенных липидов) до +80 °C (для ненасыщенных липидов).

В связи с этим полагают, что первичный механизм криоповреждений (повреждение от переохлаждения) биомембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биомембраны содержат сравнительно большое количество **холестерола**, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающее фазовый переход. При фазовом переходе из геля в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое могут образовываться сквозные каналы радиусом около 2 нм, по которым через мембрану могут переноситься ионы и некоторые низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода может увеличиваться ионная проницаемость мембраны. Увеличение ионной проницаемости мембран может спасти клетку от криоповреждений за счет увеличения выхода из клетки воды и солей, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки.

Для управления вязкостью мембран клетки используют, прежде всего, **холестерол**. Холестерол, располагаясь между жирными кислотами бислоя, благодаря жесткой и планарной структуре своей молекулы также уменьшает свободу вращательного движения вокруг -С-С- связей в ацильных цепях. Это причина того, что при физиологической температуре холестерол уменьшает текучесть гидрофобной зоны бислоя, способствуя сохранению жидко-упорядоченного состояния его липидной фазы. При снижении содержания холестерина его стероидные кольца способны отсоединяться от липидных ацилов, способствуя диспергированию липидной фазы, что приводит к снижению вязкости биомембран.

Процентное соотношение липиды : белки в различных мембранах клеток животных и человека различно, что определяется их функциональной специализацией. Например, в цитоплазматической мембране соотношение **липиды: белки** составляет **47 : 53**, а во внутренней мембране митохондрий – **21 : 79**.

Жидкостно-мозаичная (fluid mosaic) модель Сингера и Николсона (S. Singer, G. Nicolson, 1972) и её современное дополнение, согласно Симонсу и ван Мееру (K. Simons, G. van Meer, 1988)

Ещё в 1925 году Гортер и Грендел предположили, что липиды в мембране клеток животных образуют бимолекулярный слой (липидный бислой).

Базовые положения жидкостно-мозаичной модели, предложенной Сингером и Николсоном в 1972 году, можно представить следующим образом. Основа структуры плазматической мембраны – липидный бислой, состоящий из фосфолипидов. В бислой «плавают» или «растворены» белковые молекулы, часть из которых относится к гликопротеинам. Все эти компоненты мембраны взаимоудерживаются благодаря нековалентным взаимодействиям и образуют непрерывный двойной слой – замкнутую сферу. Гидрофильные «головки» фосфолипидов (несут электрический заряд) обращены к водной фазе (внутри и снаружи от поверхностей мембраны), а гидрофобные цепи остатков жирных кислот формируют гидрофобную «сердцевину» мембранного бислоя.

Липиды составляют жидкокристаллический каркас, а белки мозаично встроены в него и могут менять свое положение. Латеральная диффузия (движение вдоль бислоя) белков и липидов происходит сравнительно свободно, но

их перемещение между внешним и внутренним слоями (вертикально) ограничено, особенно строго для белков.

Углеводные компоненты гликолипидов и гликопротеинов обращены во внеклеточную среду (наружу).

Каждый тип мембран содержит характерный набор липидов и белков.

Жидкостно-мозаичная (fluid mosaic) модель Сингера и Николсона представлена на рис. 15:

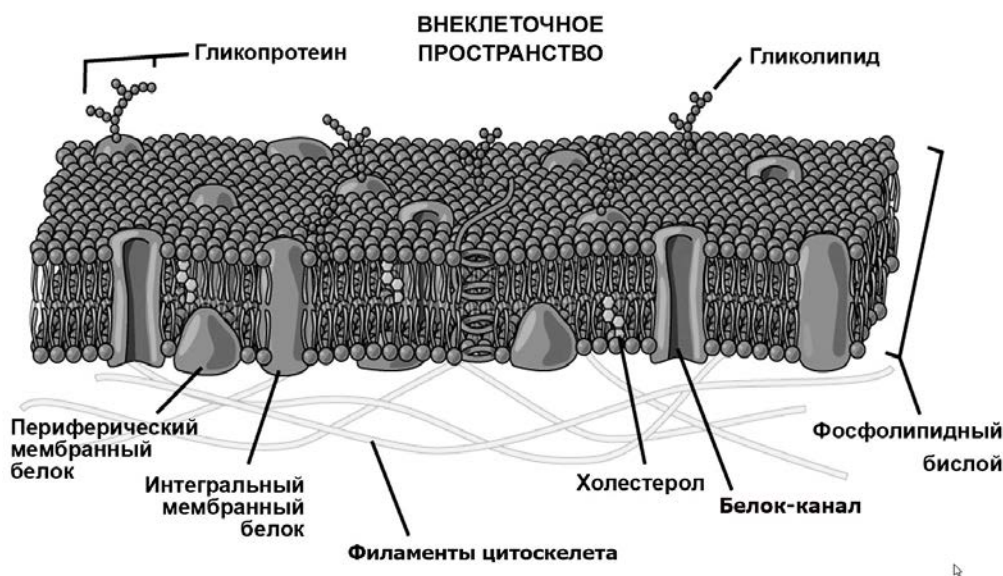


Рис. 15. Схематическое представление жидкостно-мозаичной (fluid mosaic) модели строения цитоплазматической мембраны по Сингеру и Николсону [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Липиды цитоплазматической мембраны

Мембрана содержит три главных типа липидов (рис. 16).

1. Фосфолипиды, которые подразделяются на 2 группы:

а) Глицеро-фосфолипиды – фосфатидилхолин (**ФХ**), фосфатидилсерин (**ФС**), фосфатидилэтаноламин (**ФЭА**) и **инозитол**. Эта группа фосфолипидов построена на основе **фосфатидной кислоты** (остаток фосфорной кислоты + глицерол + 2 остатка жирных кислот). Полярными группами являются: фосфорная кислота + холин (этаноламин, серин, холин и инозитол).

Главные **глицеро-фосфолипиды** мембраны (составляют большую часть мембранных липидов) – это **ФХ**, **ФЭА** и **ФС**. Строение этих фосфолипидов, а также фосфатидилинозитола (**ФИ**) и сфингомиелина (**СМ**), о роли которых будет сказано ниже, представлено на рис. 16.

Минорный глицеро-фосфолипид – фосфатидилинозитол (**ФИ**). Локализован во внутреннем монослое мембраны, количественное соотношение между производными **ФИ** таково:

ФИ – 80 %;

фосфатидилинозитол-4-фосфат (**ФИФ**) – 15 %;

фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (**ФИФ2**) – 5 %.

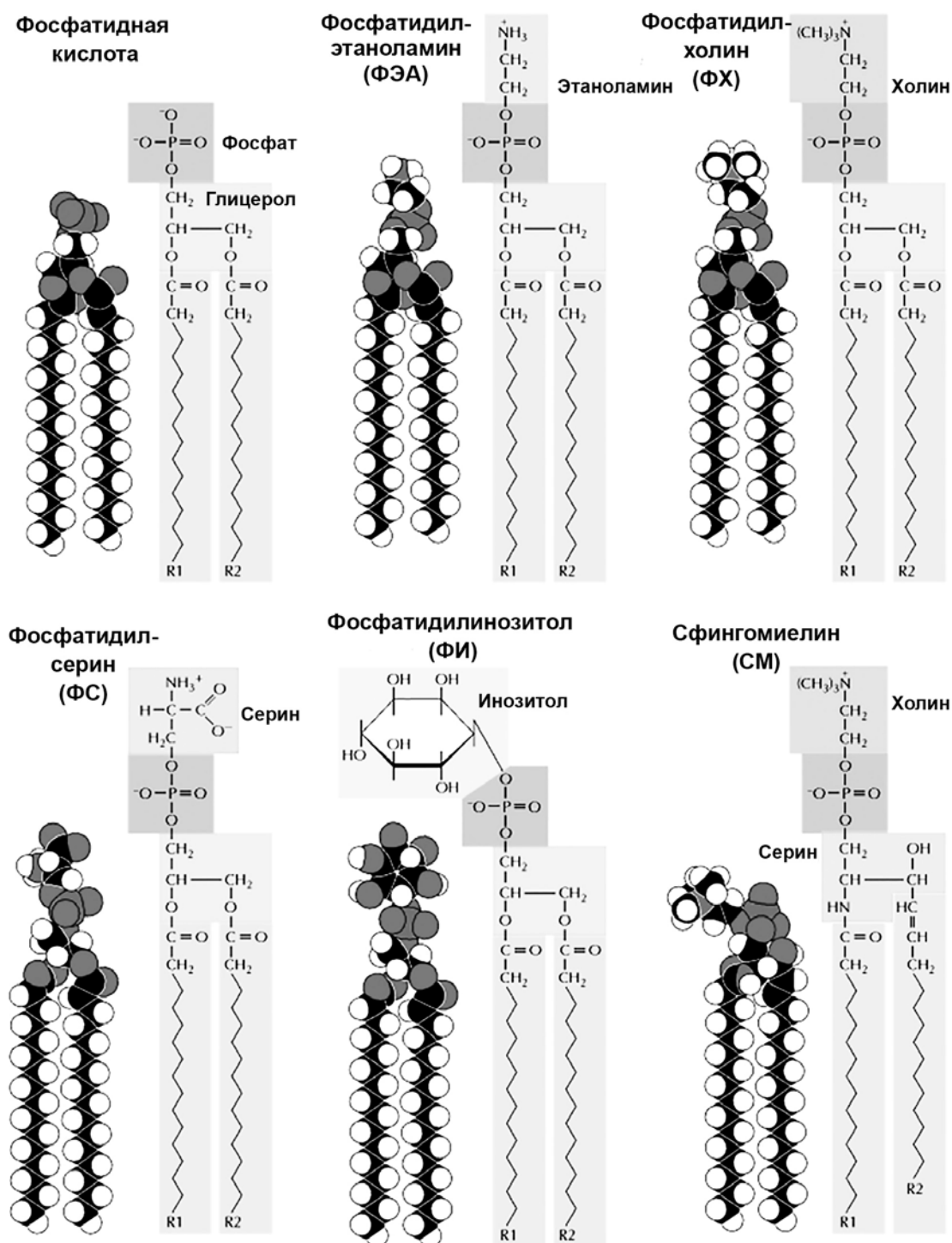


Рис. 16. Строение фосфолипидов цитоплазматической мембраны

ФИ играет важную роль во внутриклеточной сигнализации. Один из его метаболитов – **фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2)** – является непосредственным предшественником двух сигнальных молекул – вторичных мессенджеров: 1,2-диацилглицерола (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трисфосфата (ИФ3). Гидролитическое расщепление **ФИФ2** катализирует **фосфолипаза С**, которая отщепляет головку инозитола, фосфорилированную в позициях 4 и 5 (рис. 17):

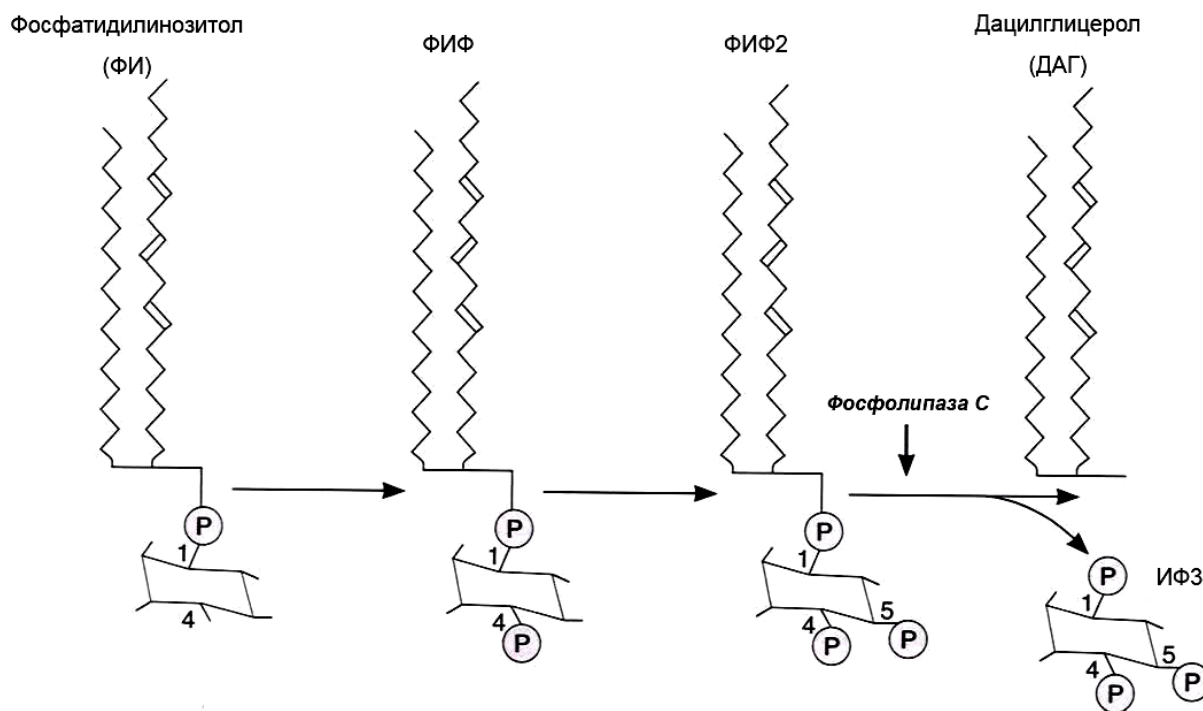


Рис. 17. Строение фосфатидилинозитола (ФИ) и его производных
[Фаллер Д. М., Шилдс Д., 2014]

***ФИФ** – фосфатидилинозитол-4-фосфат;
ФИФ2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат;
ИФ3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат*

б) Сфинго-фосфолипиды построены на основе сфингозина, который представляет собой ацилированный аминокспирт – церамид. Полярные группы: фосфорная кислота + холин (этаноламин и серин). Главный сфинго-фосфолипид – сфингомиелин (**СМ**) (рис. 16).

2. Гликолипиды. Гидрофобная часть их представлена церамидом. Углеводная часть – в **цереброзидах**, это моно- или олигосахаридный остаток; в **ганглиозидах** – разветвленный олигосахарид, содержащий N-ацетилнейраминную кислоту.

3. Холестерол. Состоит из жесткого гидрофобного ядра и единственной гидроксильной группы в положении 3, которая является его «полярной головкой» (рис. 18). В цитоплазматической мембране соотношение ХС : ФЛ = 0,8–0,9. Холестерол уменьшает латеральную подвижность (диффузию) липидов и белков, тем самым влияя на функции мембранных белков. На долю холестерина приходится около 20 % от массы всех липидов мембраны. Холестерол отсутствует у бактерий и растений, это эссенциальный компонент цитоплазматической мембраны животных (у растений имеются фитостеролы, которые выполняют роли, аналогичные холестеролу клеток животных). Холестерол сам по себе не формирует структуру бислоя. Однако, в зависимости от температуры, холестерол влияет на текучесть бислоя: при повышении температуры его текучесть снижается, и проницаемость бислоя для малых молекул уменьшается. При снижении температуры текучесть усиливается.

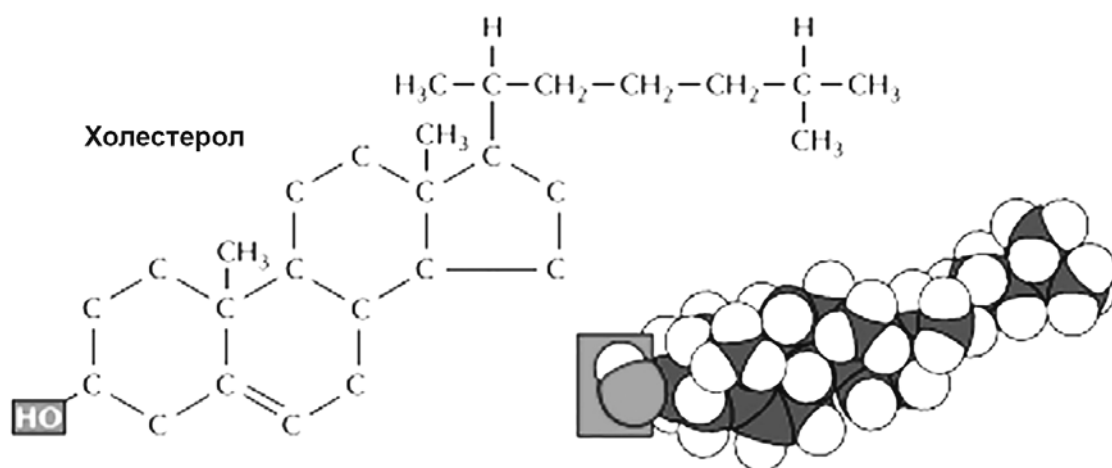


Рис. 18. Структура молекулы холестерина

Прямоугольником очерчена единственная гидроксильная группа в его составе, способная диссоциировать.

На микровязкость липидного бислоя влияет также содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК): чем их больше, тем вязкость меньше. Силуэт ненасыщенной жирной кислоты имеет «излом» – перегиб в месте расположения двойной связи (цис-конформация двойной связи). Это делает упаковку молекул ПНЖК (в пределах гидрофобной зоны бислоя) менее плотной, более «рыхлой». Мембрана становится более «текучей».

Дополнения к жидкостно-мозаичной модели, согласно Симонсу и ван Мееру

Дополнение I: Липидный бислой имеет поперечную асимметрию по липидному составу.

Внешний лепесток бислоя содержит: ФХ и СМ, а также гликолипиды, являющиеся минорными фосфолипидными компонентами бислоя.

Внутренний лепесток бислоя содержит: ФЭА, ФС и ФИ. Гидрофильные головки ФС и ФИ несут отрицательный заряд, что обуславливает отрицательный заряд внутренней (цитоплазматической) поверхности плазматической мембраны.

Холестерол распределен между листками бислоя сравнительно равномерно, и его молекулы располагаются между ацильными цепями жирных кислот фосфолипидов (рис. 19). Асимметрия липидного состава внешнего и внутреннего лепестков мембранного бислоя представлена на схеме (рис. 19):

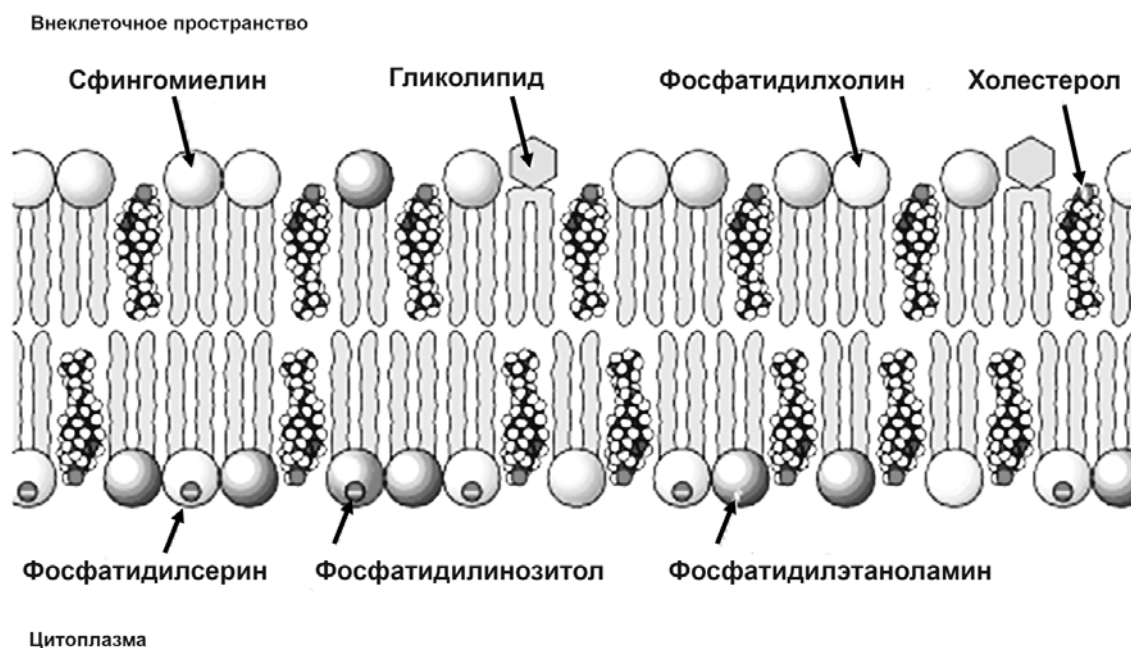


Рис. 19. Асимметрия липидного состава внешнего и внутреннего лепестков бислоя цитоплазматической мембраны

Дополнение II: Липиды бислоя движутся в поперечном направлении.

При физиологической температуре **диффузия** молекул липидов из одного монослоя в другой («флип-флоп») посредством некатализируемой диффузии происходит крайне редко и очень медленно (может длиться сутками). В то же время латеральная некатализируемая диффузия происходит постоянно и очень быстро (до 1 мкм/с). Это доказано наблюдением под микроскопом с использованием флуоресцентно меченых головок фосфолипидов.

Поперечная асимметрия липидного состава бислоя мембран существует благодаря работе **селективных энергозависимых переносчиков липидов**. К их числу относится семейство белков, обладающих способностью облегчать перемещение молекул липидов поперёк бислоя мембраны: флорпаз, флиппаз и скрамблаз.

1. **Флиппазы.** Катализируют перенос ФЭА и ФС из внешнего монослоя во внутренний. Перенос 1 молекулы ФЛ требует затраты 1 молекулы АТФ. По структуре флиппазы родственны транспортным АТФ-азам.

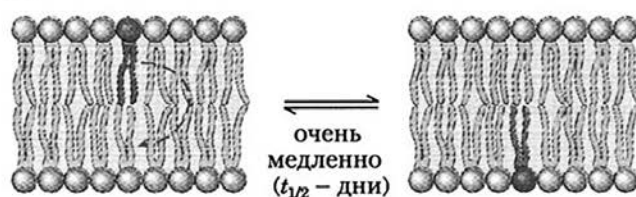
2. **Флорпазы.** Перемещают ФЛ в обратном направлении – из внутреннего монослоя во внешний.

3. **Скрамблазы.** Переносят через липидный бислой любые ФЛ вдоль градиента концентрации, не требуют АТФ, но активируются в присутствии ионов Ca^{2+} (рис. 20).

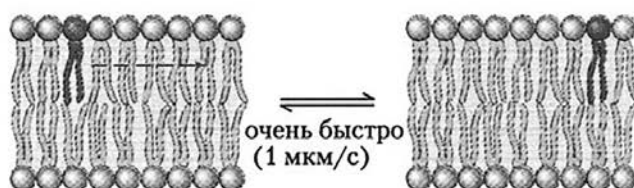
Дополнение III: Липидный бислой содержит рафты, сигнальные платформы и кавеолы.

Рафты и сигнальные платформы. Представления о рафтах в липидной фазе цитоплазматических мембран были сформированы на рубеже 80–90-х годов XX столетия Симонсом, ван Меером и Айконеном.

а Некатализируемая трансбислойная (флип-флоп) диффузия



б Некатализируемая латеральная диффузия



в Катализируемый трансмембранный перенос

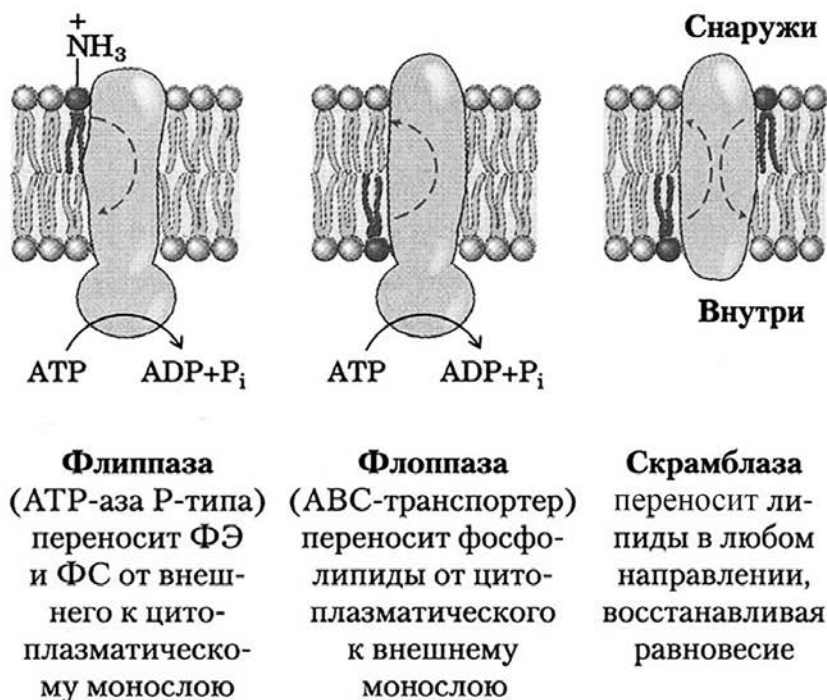


Рис. 20. Схемы латерального и поперечного перемещения липидов в бислое с участием флиппаз, флоппаз и скрамблаз [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Они установили, что в цитоплазматической мембране клеток, неактивированных первичными мессенджерами, присутствуют микродомены, которые в повышенных количествах содержат в своем составе определенные типы липидов: холестерол, гликолипиды и сфингомиелин. Эти относительно небольшие

мембранные микродомены были названы «lipid raft» – липидными рафтами (от англ. «raft» – плот).

Микродомены, сохраняя свой липидный состав в течение определенного времени, «плавают» в глицеро-фосфолипидном «озере» (латеральная диффузия), подобно плотам. Именно представления о рафтах как высокоструктурированных липидных микродоменах дали основание говорить о существовании латеральной (по плоскости) гетерогенности цитоплазматических мембран.

По современным представлениям, липидные рафты – малые (размер от 10 до 200 нм, в среднем – 50 нм), гетерогенные и высокодинамичные домены, богатые холестерином и сфингомиелином, способные изменять свой биохимический состав в ответ на действие внешнего сигнала. Эти микродомены, в зависимости от типа клеток, могут занимать от 20 до 50 % площади поверхности цитоплазматической мембраны.

Рафты (рис. 21) четко отграничены от их глицеро-фосфолипидного окружения в пределах мембранного бислоя и не смешиваются с ним, поскольку имеют высокую степень упорядоченности. Такое отграничение реализуется благодаря:

- существованию водородных связей и ван-дер-ваальсовых гидрофобных взаимодействий между системой стериновых колец в холестероле и сфингомиелином;
- наличию гидрофильных взаимодействий между головками сфингомиелина.

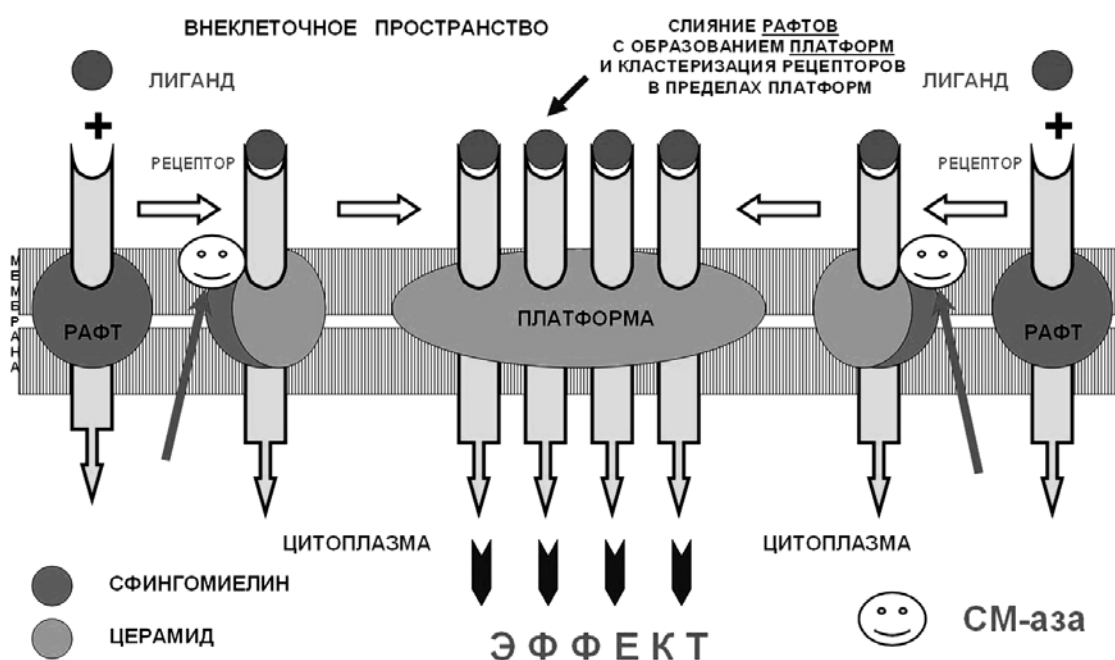


Рис. 21. Схема трансформации биохимического состава рафтов, приводящей к их слиянию и образованию сигнальных платформ, в пределах которых происходит кластеризация рецепторов.
СМ-аза – сфингомиелиназа

Избирательное удаление холестерина из рафтов приводит к их распаду.

В составе рафтов типично присутствие гликозилфосфатидилинозит (GPI) - заякоряющего белка, образующего ковалентные связи с мембранными липидами, и рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью. Эти белки обеспечивают микродоменам их биологические свойства. В составе рафтов содержатся также другие белки: кавеолин и флотиллин.

В результате взаимодействия первичных мессенджеров с поверхностными рецепторами или воздействия на клетку некоторых физических факторов происходит трансформация рафтов в более крупные макродомены – липидные сигнальные «платформы». Эти платформы, помимо относительно больших по сравнению с рафтами размеров, имеют типичные отличия от рафтов в биохимическом составе. В сформированных сигнальных платформах практически нет сфингомиелина (он гидролизован кислой СМазой), но содержится большое количество церамида – одного из двух продуктов гидролиза сфингомиелина. Церамид накапливается благодаря активации кислой СМазы, которая в условиях активации клетки внешним сигналом встраивается в её внешний бислой и гидролизует сфингомиелин, находящийся в составе внешнего монослоя мембраны. Повышение содержания высокогидрофобного церамида является пусковым механизмом для спонтанного слияния рафтов и образования более крупных липидных макродоменов или сигнальных платформ (рис. 21).

Сигнальные платформы активно участвуют в передаче внешнего сигнала внутрь клетки. В пределах образующейся сигнальной платформы в течение нескольких секунд происходит кластеризация рецепторов, что является эффективным способом усиления внешнего регуляторного сигнала и облегчения его проведения внутрь клетки, заставляющего её изменить свой метаболизм. В состав платформы могут входить: β -адренорецептор, G-белок, **аденилатциклаза**, **протеинкиназа A** и специфическая **протеинфосфатаза PP2**. Иными словами, в составе платформы оказываются молекулы, образующие **высокоинтегрированную сигнальную единицу**, которая способна инициировать и завершать ответ на внешний сигнал: увеличивать и поддерживать на определенном отрезке времени нужную концентрацию вторичного мессенджера в строго ограниченном пространстве. Сигнальные платформы участвуют также в реорганизации цитоскелета и в процессе проникновения в клетку некоторых инфекционных агентов.

Кавеолы были описаны в 1955 году и тогда же получили свое название – «*saveolae intracellulare*», или просто «*saveolae*». Это колбообразная инвагинация поверхности цитоплазматической мембраны размером 50–100 нм. Кавеола – необычный рафт: она содержит оба бислоя плазматической мембраны (рис. 22). Отличие биохимического состава кавеол и рафтов состоит в том, что в кавеолах обязательно содержатся специфические белки – **кавеолины** (кавеолин-1 и -2). Они играют важную роль как в образовании инвагинации участка бислоя, так и в функционировании кавеол. Кроме того, в кавеолах содержатся ганглиозид GM 1 (в рафтах – только ганглиозид GM 3) и сравнительно меньше сфинголипидов (рис. 21).

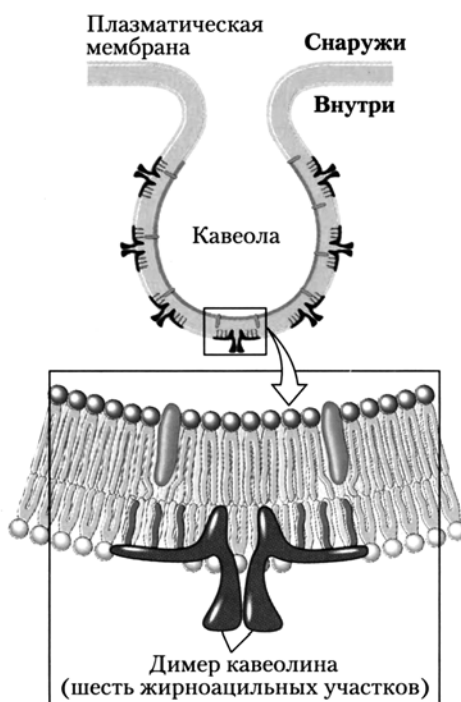


Рис. 22. Схема кавеолы и её строение [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Кавеолы участвуют в транспорте внутрь клетки экзогенного холестерина. В составе цитоплазматической мембраны адипоцитов кавеолы регулируют поток жирных кислот в его цитоплазму. Главный регулятор метаболизма адипоцитов – инсулин, рецепторы которого расположены в кавеолах. Показано также, что в составе кавеол мембран эндотелиоцитов белок кавеолин ассоциирован с NO-синтазой. Фосфорилирование кавеолина вызывает стимуляцию NO-синтазы, что дает начало ремоделированию сосудистого русла.

Белки в составе цитоплазматической мембраны

В большинстве случаев в цитоплазматической мембране на долю липидов и белков приходится около 85 % по массе. На долю углеводных компонентов в составе гликолипидов и гликопротеинов мембраны приходится 5–10 % массы. Поскольку молекулярная масса белков больше, чем у липидов, то в среднем на 1 молекулу белка приходится 50–100 молекул липидов.

Если липиды плазматической мембраны в основном выполняют роль структурного элемента, то мембранные белки ответственны за выполнение разнообразных функций. Функции белков цитоплазматической мембраны:

- 1. Структурная:** в составе цитоскелета участвуют в поддержании формы клетки.
- 2. Транспортная:** формируют различные каналы (для диффузии молекул через мембрану), ионные насосы и специфические переносчики.
- 3. Рецепторная:** образуют рецепторы для различных лигандов – гормонов, цитокинов, факторов роста и других сигнальных молекул.
- 4. Ферментативная:** связанные с мембраной ферменты.
- 5. Антигенная:** гликопротеины клеточной поверхности.
- 6. Адгезивная.**

Периферические, интегральные и амфитропные белки

Согласно Сингеру и Николсону, белки, связанные с мембраной, подразделяются на **периферические** и **интегральные белки**:

1. Периферические (поверхностные) белки обращены во внешнее или внутритрикеточное пространство соответственно. Эти белки связаны с мембраной электростатическими взаимодействиями или за счет водородных связей между гидрофильными доменами белка и полярными «головками» мембранных фосфолипидов и не проникают в гидрофобную внутреннюю область мембраны.

Периферические белки, связанные с внешней стороной мембраны, могут функционировать в качестве рецепторов для различных сигнальных молекул. Есть белки, которые связаны с внешним монослоем мембраны с помощью **гликозилфосфатидилинозитольного якоря (ГФИ-якоря)** (рис. 23).

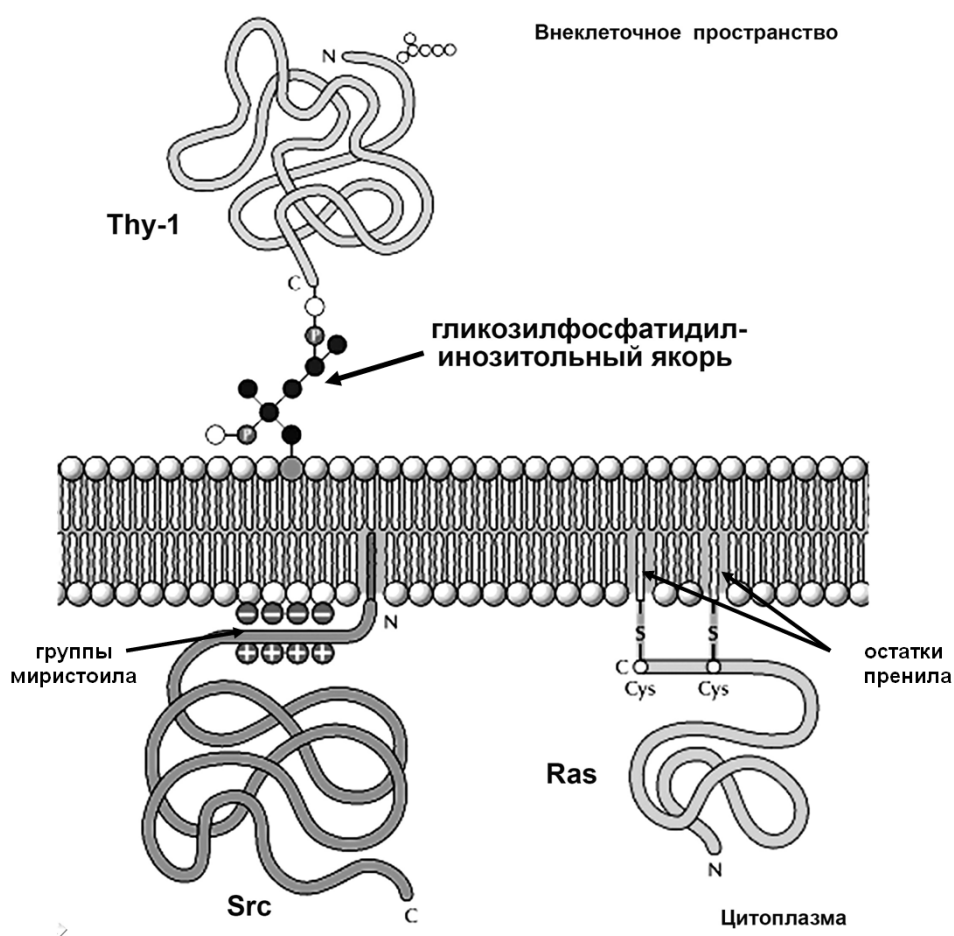


Рис. 23. Периферические (поверхностные) белки цитоплазматической мембраны и способы их прикрепления

ГФИ-якорь связан с С-концевой частью белка. Примером такого белка является лимфоцитарный белок **Thy-1**.

Периферические белки, связанные с внутренней стороной мембраны, часто ассоциированы с цитоскелетом, участвуют в формировании силуэта (формы) клетки. Прикрепление к мембране происходит за счет взаимодействия с поляр-

ными головками на поверхности липидного бислоя, как это имеет место для *протеинкиназы C* – прикреплена к внутренней поверхности бислоя.

Другие примеры периферических белков, связанных со внутренней пластиной бислоя (обращены в сторону цитоплазмы):

а) Белок **Ras** относится к семейству малых ГТФ-связывающих G-белков. Участвует в сопряжении рецепторов фактора роста с внутриклеточными молекулами-мишенями. Так, Ras активирует белок Raf (серин-треониновую *протеинкиназу*), благодаря чему далее происходит активация сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК). Белок **Ras** связан с мембраной через остатки пренила, соединенные с остатками цистеина в составе его С-конца (рис. 24):

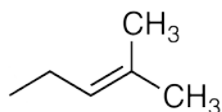


Рис. 24. Структура пренильной группы

Остатки пренила «втиснуты» между остатками пальмитоила внутреннего листка бислоя (рис. 23).

б) Белок **Src** – не связанная с рецептором внутриклеточная тирозиновая *протеинкиназа*. Src активируется при стимуляции рецепторов, сопряженных с G-белком, рецепторов цитокинов, а также рецепторов факторов роста. Эта протеинкиназа способствует выживанию клетки, так как стимулирует пролиферативные процессы, фосфорилируя по тирозину различные внутриклеточные белки. Белок Src «заякорен» на внутреннем листке бислоя мембраны за счет групп миристоила (C-14 жирная кислота), входящих в состав его N-конца. Миристоиловые группы в составе белка Src несут положительный заряд, который взаимопритягивается отрицательно заряженными головками фосфолипидов из внутреннего листка бислоя (рис. 25).

Таким образом, типичными мембранными «якорями» являются ацильные остатки **миристиновой кислоты (C14)** или **изопреноиды** (пренильные остатки фарнезола, C15), а также **гликозилированный фосфатидилинозитол (glycosylphosphatidylinositol, GPI)** (рис. 25).

2. Интегральные (трансмембранные) белки. Такие белки имеют от одного до нескольких трансмембранных доменов, последовательно пересекающих липидный бислой, и прочно связаны с мембраной. Прочная связь интегрального белка с мембраной объясняется наличием гидрофобных взаимодействий между мембранными липидами и гидрофобными доменами белка, которые состоят из неполярных аминокислот.

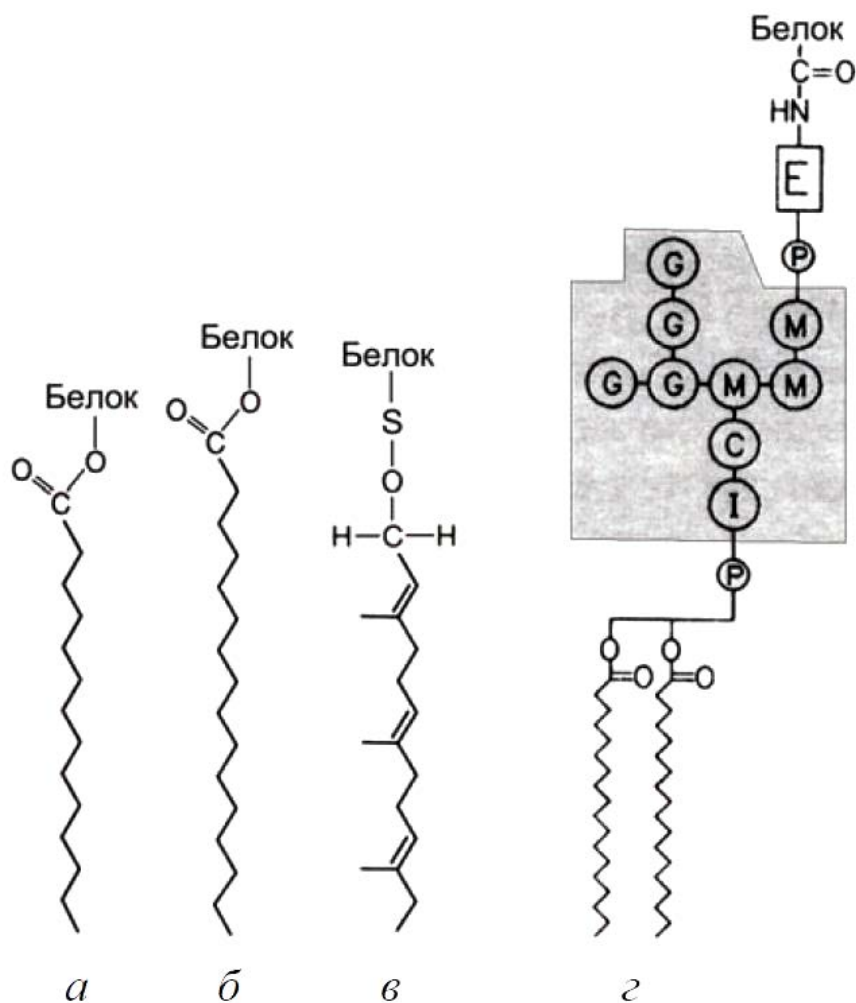


Рис. 25. Липофильные якоря

a – миристиновый; *б* – пальмитиновый; *в* – фарнезольный;
г – GPI-якорь.

I – инозит; **M** – манноза; **C** – N-ацетилглюкозамин; **G** – галактоза;
E – этаноламин.

Одни белки содержат единственную гидрофобную последовательность, в других белках их может быть несколько. Если эта гидрофобная последовательность представлена α -спиралью, то она может быть столь длинной, что неоднократно пронизывает мембрану. Установлено, что цепочка гидрофобных/неполярных аминокислот из 20–25 остатков формирует α -спиральную структуру длиной, достаточной для пронизывания толщи липидного бислоя мембраны.

У других белков, многократно пересекающих мембрану, содержится несколько α -спиральных последовательностей, каждая из которых образует трансмембранные сегменты, связанные между собой неспиральными петлями, выступающими над внешней и внутренней сторонами мембраны (рис. 26).

Типично, что углеводная часть гликопротеинов прикреплена к домену, выступающему над внешней поверхностью клетки, и обращена наружу.

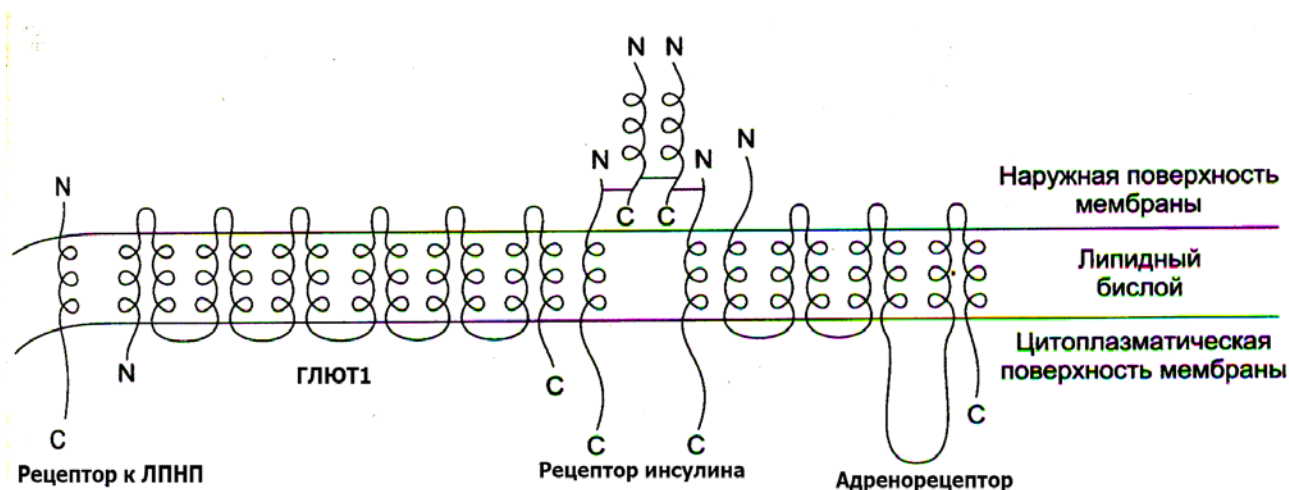


Рис. 26. Поверхностные рецепторы и транспортер ГЛЮТ1 как примеры интегральных белков цитоплазматической мембраны [Пальцев М.А. и др., 2003]

Выделяют также категорию **амфитропных белков**, которые могут находиться в цитоплазме и обратимо связываться с мембраной. В одних случаях связь с мембраной образуется за счет нековалентных взаимодействий с мембранными белками/липидами, **в других случаях** это ковалентная связь между амфитропным белком и липидом мембраны. Обратимое связывание амфитропных белков регулируется фосфорилированием или в результате связывания с ними лиганда, что приводит к конформационным изменениям его структуры, в результате чего «открывается» участок связывания с мембраной.

Латеральная диффузия мембранных белков

Если молекулы фосфолипидов могут перемещаться поперёк мембраны (поперечная диффузия, «флип-флоп» перескок, либо с участием ферментов флиппаз), то белки никогда не перемещаются поперек мембраны, поперечная диффузия у них отсутствует. Белки могут свободно диффундировать только вдоль плоскости мембраны (латеральная диффузия белков). Примером может служить **фосфолипаза A2**. Связавшись с цитоплазматической поверхностью мембраны и перемещаясь вдоль неё, липаза способна гидролизовать несколько тысяч молекул фосфолипидов в минуту.

Латеральная диффузия мембранных белков открыта L. Frye и M. Edidin в 1970 году. Движение белков наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа и применения антител, меченных разными флуоресцентными красителями. Это открытие поддержало жидкостно-мозаичную гипотезу Сингера и Николсона.

Вместе с тем белки мембраны, связанные с цитоскелетом, не могут свободно диффундировать вдоль неё. Например, белок эритроцитарной мембраны (band 3) «заякорен», будучи связанным с белками цитоскелета анкирином и спектрином.

Трансмембранная передача регуляторных сигналов

Основополагающее свойство клетки, которое обеспечивает её полноценное функционирование, – способность получать сигналы из окружающей её среды (за пределами плазматической мембраны), распознавать их и преобразовывать в адекватный клеточный ответ.

С помощью рецепторов клетка воспринимает сигналы из внешней среды, носителями которых являются первичные мессенджеры: гормоны, цитокины, нейромедиаторы, факторы роста.

Основные свойства систем, передающих внешний сигнал

1. Специфичность передачи сигналов. Обеспечивается молекулярной комплементарностью сигнальной молекулы (первичного мессенджера) и рецептора, принадлежащего клетке-мишени. Все клетки организма функционально специализированы. Каждый тип специализированных клеток имеет определенный набор рецепторов, что и позволяет им реагировать на предназначенный для них сигнал и реализовывать специфическую функцию.

2. Высокая чувствительность молекул-посредников в восприятии (трансдукции) сигнала. Она обеспечивается:

а) Высоким сродством рецепторов к сигнальной молекуле (лиганду). Сродство характеризуется константой диссоциации (**K_d**), величина которой свидетельствует о том, что рецептор способен обнаруживать пикомолярные концентрации лиганда.

б) Кооперативностью лиганд-рецепторных взаимодействий. Малые изменения концентрации лиганда приводят к значительной активации рецептора.

в) Усилением сигнала (с помощью различных внутриклеточных каскадов). Каждый активированный лигандом рецептор активирует несколько внутриклеточных ферментов, локализованных «вниз по течению». Каскады реакций способны в течение миллисекунд обеспечить усиление первичного сигнала на несколько порядков.

Существует явление, которое называется **десенситизацией рецептора**. Это снижение или потеря чувствительности рецептора к продолжительно действующей на него сигнальной молекуле. Чувствительность восстанавливается, когда стимул ослабевает (концентрация лиганда опускается ниже порогового значения).

3. Интеграция при передаче сигнала. Живая система получает извне множество различных сигналов, но даёт единый (интегрированный) ответ в четком соответствии с нуждами клетки, органа, организма. Различные сигнальные пути «перекрещиваются» на разных уровнях, порождая множество взаимодействий, которые поддерживают гомеостаз в клетке и организме.

Мембранные (поверхностные) и внутриклеточные рецепторы

Все рецепторы на основании их локализации можно разделить на две группы:

Группа 1: Мембранные или поверхностные рецепторы. Эти рецепторы встроены в цитоплазматическую мембрану клеток-мишеней и являются инте-

гравными белками. Лигандами для таких рецепторов являются гидрофильные, несущие электрический заряд полярные молекулы.

Группа 2: Внутриклеточные рецепторы. Лигандами для этих рецепторов являются небольшие липофильные, неполярные молекулы.

Независимо от своей локализации, рецептор следует рассматривать в качестве посредника, который преобразует внеклеточный химический сигнал, полученный с первичным мессенджером, во внутриклеточный сигнал, в трансдукции которого в том числе могут участвовать вторичные мессенджеры. Итогом трансдукции регуляторного сигнала становится специфический клеточный ответ.

Сигнальная молекула (лиганд, первичный мессенджер) обратимо связывается с рецептором с помощью слабых **нековалентных связей**: водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия. Позже этот комплекс диссоциирует. Эти явления имеют много общего с теми, которые происходят при связывании каталитического центра молекулы фермента с субстратом. Несмотря на **обратимость связывания рецептора с гормоном**, биологические процессы, которые инициируются внутри клетки вследствие образования комплекса лиганд-рецептор, продолжают еще в течение некоторого времени после диссоциации этого комплекса.

После связывания гормона с рецептором **его трехмерная структура (конформация) претерпевает определенные изменения. Именно они приводят к активации эффекторного участка рецептора (активация рецептора)** и запуску цепи биохимических реакций, приводящих к клеточному ответу, характерному для данного первичного мессенджера. Следует помнить, что молекулы первичных мессенджеров не метаболизируют, не дают начало биоактивным интермедиатам и сами по себе не обладают каталитической активностью.

Сигнальные молекулы или первичные мессенджеры, **в соответствии с локализацией их рецепторов**, можно разделить на две группы:

1. Полярные сигнальные молекулы (первичные мессенджеры), которые связываются со специфическими рецепторами плазматической мембраны (поверхностными рецепторами), но не проникают внутрь клетки. К их числу относятся: **белково-пептидные гормоны** (глюкагон, инсулин, паратгормон и др.), **нейромедиаторы** (ацетилхолин, глицин, γ -аминомасляная кислота), **факторы роста и цитокины**.

Через мембрану передаётся **информация**, но не электрические заряды или сами сигнальные молекулы. Единственной функцией сигнальной молекулы является её связывание со своим рецептором, в результате чего происходит **активация рецептора**. Далее сигнал передаётся внутрь клетки, что приводит к **изменению активности внутриклеточного фермента и метаболического пути**.

Клетки-мишени способны сами подвергать деградации сигнальные молекулы, тем самым **своевременно прекращая физиологический ответ, который запускает сигнальная молекула**.

2. Неполярные сигнальные молекулы (первичные мессенджеры), являющиеся небольшими липофильными молекулами. К их числу относятся: **сте-**

роидные и тиреоидные гормоны. Благодаря своей липофильности, они свободно проходят сквозь липидный бислой клеточной мембраны. Сигнальная молекула проникает внутрь клетки, где связывается с **цитоплазматическим рецептором** либо с **рецептором, локализованным на мембране ядра**, и образует активированный гормон-рецепторный комплекс. Далее этот комплекс (гормон-рецептор) взаимодействует с участком транскрипционного контроля молекулы ДНК и «включает» экспрессию специфического гена.

Существует также особая группа **липофильных сигнальных молекул, которые связываются с рецепторами клеточной поверхности.** Это **простагландины (ПГ)** – гормоноподобные липофильные соединения, содержащие в своей структуре цикlopентановое кольцо. ПГ называют гормоноподобными биорегуляторами, так как имеются отличия от классических гормонов. Так, во-первых, **ПГ** синтезируются во всех тканях организма животных и человека, а не в специализированных клетках желез внутренней секреции. Во-вторых, **ПГ** обладают коротким периодом действия – инактивируются в течение нескольких секунд и выполняют функции локальных регуляторов. **ПГ** синтезируются во многих тканях организма из арахидоновой кислоты. Известны 16 разновидностей **ПГ**, оказывающих самые разнообразные биоэффекты. **ПГ** могут воздействовать на рецепторы той клетки, в которой они были только что синтезированы (**аутокринное действие**), либо на соседние клетки, находящиеся на некотором расстоянии от места синтеза (**паракринное действие**).

Заключение

Цитоплазматическая мембрана – важный в функциональном отношении компартмент клетки. Мембрана сохраняет различия биохимического состава между клеточным содержимым и окружающей средой, поддерживая разницу концентраций ионов и молекул по обе её стороны, содержит поверхностные рецепторы и множество ассоциированных с ней ферментных систем.

Основу надмолекулярной структуры цитоплазматической мембраны составляет фосфолипидный бислой. Главные составляющие элементы мембраны: липиды и белки, которые взаимно удерживаются за счет нековалентных взаимодействий, кооперативных по своему характеру. Это обеспечивает важное свойство мембраны – пластичность, то есть способность изменять форму без потери целостности. Фосфатидилинозитол – минорный липидный компонент внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны - является источником двух метаболитов, являющихся вторичными мессенджерами: диацилглицерола (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трисфосфата (ИФ3). Общеизвестная жидкостно-мозаичная модель строения цитоплазматической мембраны Николсона и Сингера дополнена в настоящее время представлениями о таких липидно-белковых структурах, какими являются рафты/сигнальные платформы и кавеолы. Они активно участвуют в проведении внешнего регуляторного сигнала внутрь клетки и в его усилении.

Интегральные белки цитоплазматической мембраны имеют от одного до нескольких трансмембранных доменов, последовательно пересекающих липидный бислой, и прочно связаны с ним. Прочность обусловлена гидрофобными

взаимодействиями между мембранными липидами и гидрофобными доменами белка, которые состоят из неполярных аминокислот, образующих α -спиральные структуры. Периферические белки располагаются на внешней или обращенной к цитоплазме поверхности мембраны и не проникают в её гидрофобную внутреннюю область. Эти белки связаны с мембраной электростатическими взаимодействиями или за счет водородных связей между гидрофильными доменами белка и полярными «головками» фосфолипидов. Амфитропные белки способны находиться в цитоплазме и обратимо связываться с мембраной. Такой тип связывания регулируется фосфорилированием / дефосфорилированием белка или связыванием с белком лиганда, что приводит к конформационным изменениям его структуры, которые «открывают» участок связывания с мембраной.

Внешние регуляторные сигналы, доставляемые первичными мессенджерами, улавливаются, декодируются и передаются на внутриклеточные исполнительные системы посредством мембранных (поверхностных) и внутриклеточных рецепторов. Лигандами мембранных рецепторов являются гидрофильные, несущие электрический заряд, полярные молекулы: белково-пептидные гормоны, нейромедиаторы, факторы роста и цитокины. Лигандами для внутриклеточных рецепторов служат малые липофильные, неполярные молекулы: стероидные и тиреоидные гормоны.

ЛЕКЦИЯ 3

ТЕМА: ОСНОВНЫЕ СТРАТЕГИИ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

План лекции:

1. Живые системы (организмы) и их химический состав. Понятие о биомакромолекулах.
2. I стратегия регуляции метаболизма: быстрое изменение каталитической активности ключевых (регуляторных) ферментов.
3. II стратегия регуляции метаболизма: а) ковалентная модификация ферментов путём фосфорилирования-дефосфорилирования; б) нековалентная модификация ферментов путем ограниченного (лимитированного) протеолиза; в) мультиферментные комплексы.
4. III стратегия регуляции метаболизма: изменение количества фермента – усиление биосинтеза ферментов либо разрушение (деградация) уже имеющихся молекул фермента. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Изоферменты (изоэнзимы).
5. IV стратегия регуляции метаболизма: компартментализация ферментов и метаболических путей.
6. V стратегия регуляции метаболизма: гормональная (эндокринная) регуляция метаболических путей.

Заключение

Все живые системы (объекты) состоят из неживых молекул. Окружающая живые объекты неживая среда состоит из неупорядоченных смесей относительно простых химических соединений.

Живые системы включают в свой состав все химические элементы, которые находятся в окружающей их среде. Наибольшая доля приходится на элементы **С, Н, О** и **Н**. Одно из важнейших отличий химического состава живых систем от неживых состоит в наличии особых органических соединений – биомакромолекул: белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других биополимеров, которые способны синтезировать только живые системы.

Одним из отличительных свойств живых систем (объектов) является их способность извлекать из окружающей среды и преобразовывать энергию, которую они расходуют на построение (синтез) упомянутых выше биомолекул и для поддержания характерной для живого объекта его сложной структурной организации. При этом в качестве «сырья» используются сравнительно простые молекулы. Иными словами, живой объект (организм) по химическому строению представляет собой нечто большее, чем просто сумму его неживых молекул.

Биомакромолекулы сами по себе не являются живыми. Они «оживают» только тогда, когда реализуются два фундаментальных условия:

1. Они располагаются в пространстве клетки в строго определенном порядке. Проявлением чрезвычайно высокого уровня структурной организации живого объекта является компартментализация реакций обмена веществ: ферментные системы, составляющие тот или иной метаболический путь, имеют вполне определенную локализацию.

2. Биомакромолекулы взаимодействуют строго определенным образом. Ферментативный катализ является проявлением высокоэффективной саморегуляции.

Таким образом, живые объекты состоят из множества **специфически взаимодействующих биомолекул**.

Живые системы способны к саморегуляции, самоорганизации и самовоспроизведению. В частности, они обладают свойством **раздражимости**: отвечают специфическими реакциями на определенные внешние воздействия. Адекватный и своевременный ответ клетки, органа, организма на внешнее воздействие возможен только на основе интеграции метаболических процессов. Интеграция проявляется через регуляцию активности ключевых ферментов.

Рассмотрим подробно основные стратегии регуляции метаболизма

Стратегия 1:

Быстрое изменение каталитической активности ключевых (регуляторных) ферментов под влиянием **аллостерических регуляторов**.

Ключевые (регуляторные) ферменты являются представителями категории аллостерических ферментов. Они демонстрируют особую кинетику,

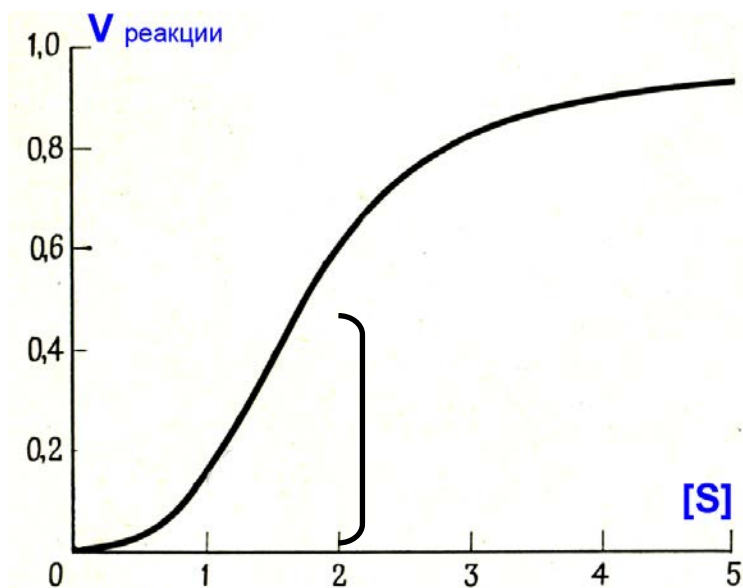


Рис. 27. Сигмовидная (S-образная) кривая зависимости скорости реакции аллостерического фермента от концентрации субстрата $[S]$

Отмеченная скобкой восходящая ветвь кривой графика в наибольшей степени отражает проявление кооперативности во взаимодействии каталитических центров фермента. Из формы этой части кривой следует, что при равномерном приросте концентрации субстрата происходит нелинейный прирост скорости реакции.

отличающуюся от «классической», описываемой уравнением Михаэлиса — Ментен. Для неаллостерических ферментов график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (координаты Михаэлиса — Ментен) представляет собой гиперболическую кривую. Для аллостерических ферментов график имеет форму сигмоидной (S-образной) кривой (рис. 27).

Такая особенность кинетики катализа определяется тем, что аллостерические ферменты имеют субъединичное строение молекулы, что обуславливает наличие нескольких (по числу субъединиц) каталитических центров, а также отдельных центров для специфического связывания с аллостерическими регуляторами (активаторами и ингибиторами). На этой материальной основе (наличие нескольких каталитических центров) реализуется особый тип взаимодействия между каталитическими центрами: **кооперативность** взаимодействия. Кооперативность подразумевает согласованное изменение сродства каталитических центров к субстрату. Для понимания происходящих явлений следует помнить, что несколько каталитических центров аллостерического фермента заполняются субстратами не все одновременно (не мгновенно), а постепенно. Для количественной оценки этого процесса в каждый момент времени используют показатель — **степень насыщения** каталитических центров молекулами субстрата (Y), который ввёл Арчибальд Хилл в начале XX века. Степень насыщения представляет собой отношение числа каталитических центров, связавшихся с субстратом, к числу центров, оставшихся свободными.

Суть кооперативного эффекта состоит в следующем. Когда все каталитические центры фермента свободны ($Y = 0$), сродство к субстрату каждого из них одинаково. После присоединения к любому из центров первой молекулы субстрата сродство оставшихся свободными каталитических центров увеличивается. После присоединения второй молекулы субстрата сродство оставшихся свободными каталитических центров увеличивается в ещё большей степени и так далее до того момента, пока все центры не окажутся заняты субстратом ($Y=1$). Важно помнить, что прирост сродства оставшихся свободными каталитических центров происходит не линейно, а в определенной прогрессии. Именно это обстоятельство определяет сигмовидную форму кривой зависимости скорости реакции аллостерического фермента от концентрации субстрата. Иными словами, эффект прироста скорости катализируемой реакции будет всегда больше, чем просто сумма активностей каждого из каталитических центров, взаимодействующих с молекулой субстрата в данный момент времени.

Аллостерические регуляторы с высокой специфичностью связываются со своими центрами, которые физически отдалены от каталитического центра фермента. Аллостерические регуляторы, действуя в очень малых концентрациях (микро- и наномолярных), вызывают кратное изменение активности аллостерического фермента при одной и той же концентрации субстрата. Аллостерические активаторы усиливают кооперативность во взаимодействии каталитических центров (положительная кооперативность), в то время как аллостерические ингибиторы ослабляют её (отрицательная кооперативность). Только бла-

годаря способности столь существенно изменять свою активность аллостерические ферменты способны влиять на активность всего метаболического пути.



Рис. 28. Влияние аллостерических регуляторов на величину максимальной скорости (V_{max}) регуляторного фермента

По оси абсцисс и ординат – концентрация субстрата и скорость ферментативной реакции в условных единицах соответственно. Кривая «К» – скорость в отсутствие аллостерических регуляторов; кривые 1 и 2 – в присутствии активатора («плюс» в кружке) и ингибитора («минус» в кружке) соответственно. Стрелки на оси абсцисс указывают изменение величины константы Михаэлиса (K_m), характеризующей сродство каталитического центра к субстрату (S).

На рис. 28 представлено влияние аллостерических регуляторов на величину максимальной скорости (V_{max}) регуляторного фермента. V_{max} изменяется в результате влияния регуляторов на сродство каталитических центров к субстрату при его неизменной концентрации.

Стратегия 2.А:

Ковалентная модификация ферментов путём фосфорилирования – дефосфорилирования. Эта модификация **обратима**. Действует параллельно с аллостерической регуляцией и реализуется так же быстро. Это одна из самых распространённых форм обратимой посттрансляционной модификации белков.

Фосфорилирование белков.

Фосфорилирование молекулы белков катализируют ферменты **протеинкиназы**. Протеинкиназы относятся к подклассу ферментов киназ (фосфотрансфераз, относятся ко II классу по классификации ферментов). Протеинкиназы модифицируют белки (не только ферменты) путем фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих высокореакционные гидроксильные группы, – **серина (Ser)**, **треонина (Tre)** и **тирозина (Thy)**. Протеинкиназы отщепляют фосфатную группу от АТФ и ковалентно присоединяют её по гидроксилу в остатке соответствующей аминокислоты (рис. 29).

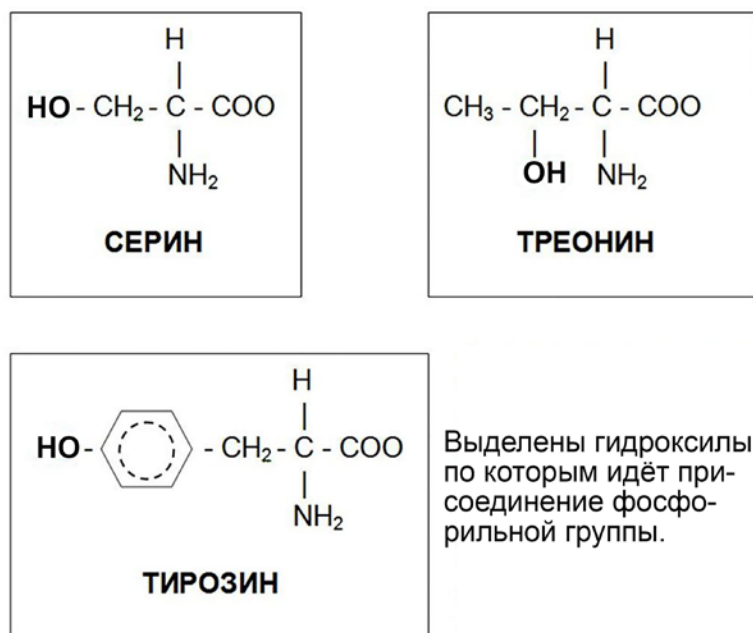


Рис. 29. Аминокислоты серин, треонин и тирозин как мишени для протеинкиназ

Эти аминокислоты содержат незаряженные, но полярные гидроксильные группы. Максимальная полярность у гидроксила в молекуле тирозина. При pH 7,4 гидроксилы не диссоциированы.

Протеинкиназы классифицируют по названию фосфорилируемых ими остатков аминокислот. Важнейшими представителями этого семейства ферментов являются серин-треониновые и тирозиновые протеинкиназы.

I. Серин-треониновые протеинкиназы. К их числу относят:

1. **Протеинкиназа A**, или **цАМФ-зависимая протеинкиназа**. Обладает множественными функциями, участвуя во внутриклеточной трансдукции регуляторного сигнала, опосредуемого вторичным месенджером – цАМФ.

2. **Протеинкиназа B**, или **протеинкиназа Akt**. Это основная протеинкиназа, защищающая клетку от апоптоза, стимулирует рост и выживание клеток.

3. **Протеинкиназа C**. Опосредует фосфатидилинозитол/ Ca^{2+} -сигнальный путь. Ионы Ca^{2+} играют непосредственную роль в процессе подготовки протеинкиназы C к её активации.

4. **Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы**. Образуют обширное семейство. Регулируют активность множества белков. Для активации самого кальмодулина требуется образование комплекса с ионами Ca^{2+} . Это пример косвенного эффекта, оказываемого ионами Ca^{2+} .

5. **МАПК**, или **митоген-активируемые протеинкиназы**. Эти протеинкиназы образуют большое семейство и опосредуют ответ на внешние пролиферативные стимулы. Различные МАПК образуют каскады, в которых киназа, лежащая «вверх по течению», активирует фосфорилированием другую киназу, расположенную «вниз по течению». Подобные протеинкиназные каскады являются одним из примеров усиления регуляторного сигнала при его трансдукции внутри клетки (рис. 30):

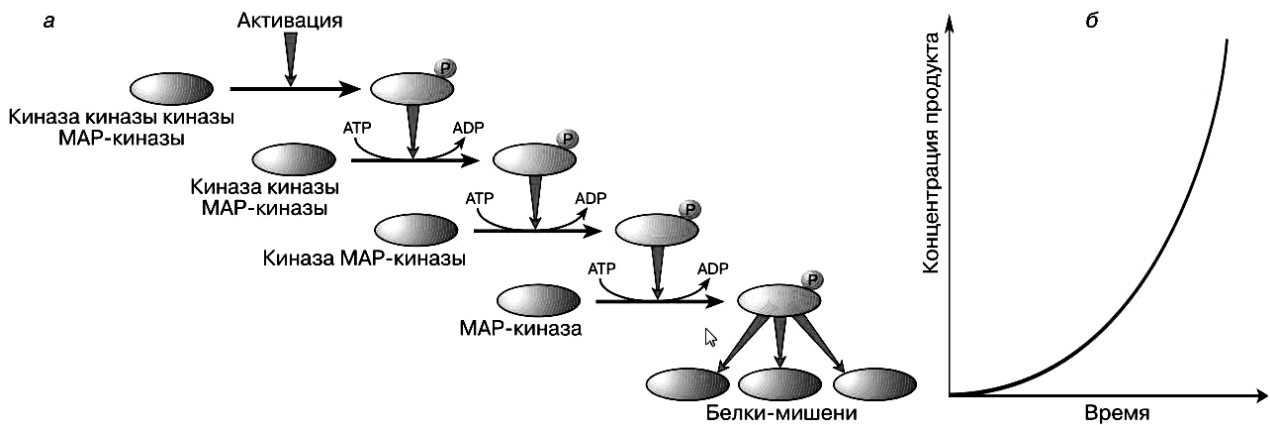


Рис. 30. Схема МАПК-каскада

Название каскада происходит от названия его конечной киназы – МАПК, которая после своей активации непосредственно активирует транскрипционные факторы или другие белки-мишени. В левой части схемы (а) представлен сам каскад киназ, которые последовательно активируют друг друга путем фосфорилирования (как по остаткам тирозина, так и серина и треонина). В правой части схемы (б) – график, иллюстрирующий нарастание биоэффекта (прирост количества фосфорилированных молекул-мишеней, то есть усиление регуляторного сигнала) от времени, прошедшего с момента запуска каскада. Об особенностях номенклатуры киназ, составляющих МАПК-каскад (левая часть схемы), детально будет сказано в лекции 9.

МАПК участвуют в запуске клеточной пролиферации, в индукции синтеза белков (активация различных транскрипционных факторов) и в регуляции апоптоза.

II. Тирозиновые протеинкиназы:

1. Цитоплазматические тирозиновые протеинкиназы. Примером такой киназы является **киназа Src**, участвующая в качестве белка-посредника в процессе трансдукции пролиферативного сигнала.

2. Рецепторные тирозинкиназы, или тирозиновые киназы, ассоциированные с рецептором. Рецепторы инсулина, факторов роста и цитокинов после связывания со своим лигандом претерпевают конформационные перестройки, которые приводят к «включению» собственной тирозинкиназы, присутствующей в составе цитоплазматического домена рецептора. Далее следует аутофосфорилирование строго определенных остатков тирозина в составе домена рецептора. Образующиеся фосфотирозины становятся пунктами для связывания специфических белков-посредников, участвующих в дальнейшей трансдукции регуляторного сигнала внутри клетки.

III. Протеинкиназы со смешанной специфичностью. Эти киназы способны фосфорилировать остатки трех вышеупомянутых аминокислот. Изучены недостаточно.

Дефосфорилирование белков.

Дефосфорилирование молекул ферментов или иных белков происходит с участием **протеинфосфатаз (protein phosphatase – PP)**. Их можно разделить на три группы:

1. Тирозин-специфичные PP. Участвуют в регуляции МАПК-сигнального пути, в контроле пролиферации, дифференцировке клеток и в регулировании клеточного цикла.

2. Серин-треонин-специфичные PP. Регулируют пролиферацию, дифференцировку клеток, эмбриональное развитие и апоптоз.

3. PP со смешанной специфичностью. Примером могут служить PP, дефосфорилирующие определенные киназы в составе МАПК-каскада, что приводит к их инактивации и прерыванию сигнализации.

Стратегия 2.Б:

Нековалентная модификация ферментов. Реализуется путем ограниченного (лимитированного) протеолиза. Как правило, **носит каскадный характер и необратима** (в отличие от фосфорилирования/дефосфорилирования).

Такой модификации подвергаются ферменты, катализирующие многие важные превращения биомолекул. Эти ферменты изначально синтезируются в неактивной форме как **проферменты**, или **зимогены**. Активация профермента (зимогена) происходит с участием различных протеаз. Типичные примеры нековалентной модификации ферментов:

1. Активация химотрипсина.

2. Активация каскада ферментов свертывающей системы крови (рис. 31):

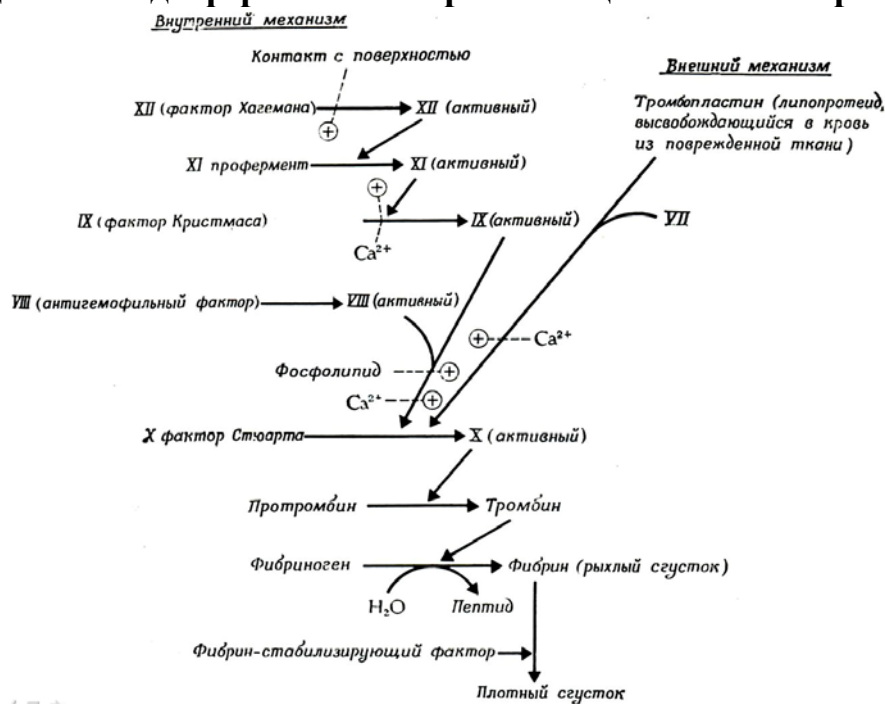


Рис. 31. Схема каскадного механизма, приводящего к свертыванию крови

Каскад состоит из нескольких последовательно расположенных **протеаз**, в котором **каждый фермент активирует следующий** путем отщепления небольшого

фрагмента пептидной цепи, реализуя принцип **ограниченного** или **лимитированного протеолиза**. Каталитическая природа процесса позволяет каждому фактору (ферменту) запускать реакцию, присутствуя изначально в малых количествах. Мономеры образующегося **фибрина** спонтанно образуют **фибриллы**. Для полноценного протекания процесса важны как **внутренний**, так и **внешний механизмы**.

3. Активация каскада каспаз для реализации апоптоза. Каспазы (от *англ. caspase + cysteine-dependent aspartate specific protease*) образуют обширное семейство внутриклеточных цистеиновых протеаз, расщепляющих пептидные связи белков, следующих после **аспартата**. Каспазы – активные участники процесса сигнальной трансдукции (не только в апоптозе). Неизвестны случаи участия **каспаз** в неспецифическом расщеплении белков.

В качестве ещё одного примера нековалентной модификации белков следует рассмотреть функционирование **мультиферментных комплексов**. Характерным при работе мультиферментного комплекса является то, что продукт первого фермента в составе комплекса тут же становится субстратом следующего фермента этого же комплекса. Благодаря такой структурно-функциональной организации:

а) Скорость превращения молекул чрезвычайно высока, поскольку нет ограничений, связанных с диффузией молекулы субстрата к активному центру фермента.

б) Реализуется высокоэффективная регуляция ферментативного процесса.

Примером мультиферментного комплекса может служить **пируватдегидрогеназный комплекс** (рис. 32). Катализируемое им превращение в общем виде описывает уравнение:

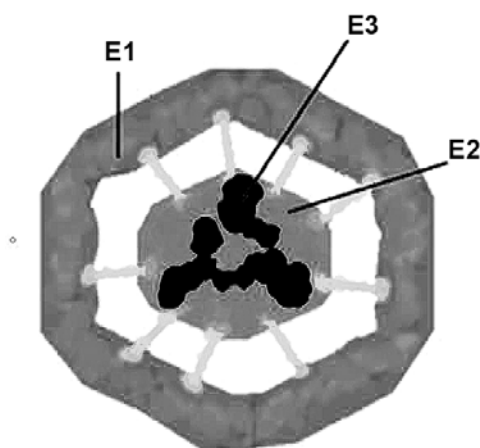


Рис. 32. Модель пируватдегидрогеназного комплекса

Ферменты, входящие в его состав: **E1 – пируватдегидрогеназа** (кофактор: тиамин-пирофосфат); **E2 – дигидролипоилтрансацилаза** (кофакторы: липоевая кислота и КоА); **E3 – дигидролипоилдегидрогеназа** (кофакторы: ФАД, НАД⁺). В регуляции активности комплекса участвуют: специфическая **киназа пируватдегидро-**

геназы, которая фосфорилирует 3 остатка серина в составе E1 (инактивирует комплекс), и специфическая фосфатаза пируватдегидрогеназы (активирует комплекс).

Стратегия 3: Изменение количества фермента – усиление его биосинтеза либо разрушение (деградация) уже имеющихся молекул фермента. Это путь медленного изменения активности метаболических путей. Реализуется спустя часы, поскольку идет синтез белка *de novo*.

Изменение количества фермента – более мощный по своим последствиям, но медленный механизм регуляции метаболизма (по сравнению с изменением каталитических свойств ферментов). В рамках данных представлений все ферменты можно подразделять на две категории:

а) **Конститутивные ферменты** – ферменты, постоянно синтезирующиеся и функционирующие в клетках организма независимо от условий его существования или концентрации соответствующих субстратов на всех стадиях жизненного цикла организма. Гены, кодирующие такие ферменты, получили в последнее время название **гены «домашнего хозяйства»** (англ. housekeeping genes).

б) **Индукцибельные ферменты** в физиологических условиях синтезируются либо в следовых количествах, либо их синтез подавлен. Их синтез существенно изменяется в зависимости от изменения условий существования организма или в связи с появлением субстрата. Как правило, индуцибельные ферменты синтезируются в клетках определенных тканей.

Регуляция синтеза происходит на генетическом уровне под действием индукторов, в качестве которых часто выступают соответствующие субстраты или метаболиты.

Ген, кодирующий данный фермент находится в «выключенном» или «спящем» состоянии до тех пор, пока с промоторным участком ДНК связан белок-репрессор, который блокирует процесс транскрипции. Белки-репрессоры – типичные аллостерические белки. Они содержат в своей молекуле специфические центры связывания для молекул-индукторов. Когда концентрация индуктора повышается до соответствующих значений, индуктор синтеза данного фермента с высоким сродством связывается со своими регуляторными участками на белке-репрессоре, по сути, являющимися аллостерическими регуляторами. В результате связывания индуктора конформация молекулы репрессора меняется таким образом, что его сродство к участку молекулы ДНК существенно уменьшается, и репрессор диссоциирует, открывая возможность транскрипции гена. Синтез ферментативного белка *de novo* (как и синтез любого белка) регулируется на этапах транскрипции, трансляции и деградации мРНК.

Синтез индуцибельных ферментов – одно из проявлений биохимической адаптации метаболизма клетки или организма к изменившимся условиям существования. В итоге либо увеличивается количество уже имеющегося фермента, что обеспечивает более быстрое протекание определённой реакции, либо вырабатываются новые ферменты, ранее отсутствовавшие в клетке или ткани, но необходимые в новых условиях жизни.

Активные ферменты подвергаются деградации, как и другие клеточные белки. Синтез ферментов и их деградация находятся в динамическом равновесии, что и обеспечивает процесс их обновления.

Изоферменты (изоэнзимы)

Изоферменты – молекулярные формы (изотипы) одного фермента, имеющие отличия по их первичной структуре, что детерминировано генетически. Изоферменты – проявление полиморфизма генов (различные локусы) и наличия нескольких аллелей у гена. По этой причине большинство ферментов существует в виде нескольких молекулярных форм (изоферментов).

Изоферменты катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по молекулярной массе (различия, как правило, незначительные), электрофоретической подвижности, сродству к субстрату, чувствительности к регуляторам (ингибиторам и активаторам) и могут иметь различные рН-оптимумы. Как правило, каждый из изоферментов локализован в определенном клеточном компартменте и присутствует в определенном органе и ткани. Подробно изоферменты будут рассмотрены в лекции 4.

Стратегия 4:

Компартментализация ферментов и метаболических путей. Пространственное разделение метаболических путей позволяет согласованно и одновременно протекать анаболическим и катаболическим реакциям в пределах одной клетки, не мешая друг другу.

Компартментализация позволяет регулировать активность фермента с помощью:

- доступности субстрата(ов);
- доступности кофактора(ов);
- удаления продуктов и направления их в другие компартменты клетки, где они требуются;
- реализации механизма обратной связи как положительной, так и отрицательной.

Основными компартментами клетки являются:

- Цитоплазматическая мембрана
- Ядро
- Цитоскелет
- Митохондрии: внутренняя мембрана и матрикс
- Эндоплазматический ретикулум (микросомы): мембрана и внутреннее пространство цистерн ретикулума
- Комплекс (аппарат) Гольджи
- Лизосомы
- Пероксисомы
- Везикулы накопления
- Цитоплазма

По локализации в клетке ферменты подразделяют на:

1. **Ферменты, встроенные в мембраны** (связанные с различными мембранами). Например, переносчики электронов, образующие дыхательную цепь внутренней мембраны митохондрий.

2. **«Растворимые» ферменты** (в том числе те, которые образуют мультиферментные комплексы). Например, ЦТК и путь β -окисления в матриксе митохондрий; гликолиз и пентозофосфатный путь в цитоплазме; цикл синтеза мочевины, часть ферментов которого расположена в матриксе митохондрий, а часть – в цитоплазме клетки.

3. Наряду с этими примерами, существуют ферменты (главным образом, относящиеся к протеинкиназам), которые в процессе перехода из своей неактивной формы в активную изменяют свою локализацию (компартиментализацию): из цитоплазмы (растворимая форма) переходят и связываются с цитоплазматической мембраной. Примерами таких ферментов являются:

– **Белок Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma) – серин-треониновая протеинкиназа.** В неактивной конформации протеинкиназа находится в цитоплазме. Факторы роста (действующие на клетки посредством рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью) активируют мембранный белок **Ras**. Активный **Ras** взаимодействует с N-концевым доменом **неактивной киназы Raf**, находящейся в цитоплазме, и этим рекрутирует **Raf** из цитоплазмы в мембрану, где завершается процесс активации **протеинкиназы Raf**. **Raf** является первой **протеинкиназой** в каскаде **МАПК**, который образует основной сигнальный путь, стимулирующий пролиферацию клеток.

– **Протеинкиназа C.** Является **серин-треониновой протеинкиназой**. В неактивной конформации киназа находится в цитоплазме. Многие лиганды рецепторов, сопряженных с G-белком, активируют мембранный гетеротримерный G-белок. Далее происходит активация связанной с мембраной **Флазы C**, которая специфична к **фосфатидилинозитолбис-фосфату (ФИФ2)**, являющемуся минорным липидом внутреннего слоя цитоплазматической мембраны. Первый продукт гидролиза **ФИФ2** – **инозитолтрисфосфат (ИФ3)**, будучи гидрофильным соединением, диффундирует в цитоплазму и стимулирует **ИФ3-чувствительные Ca^{2+} -каналы в мембранах эндоплазматического ретикулума**, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Неактивная **протеинкиназа C (ПКС)**, связавшись с ионами Ca^{2+} , перемещается из цитоплазмы во внутренний слой цитоплазматической мембраны и связывается с ним за счет притяжения к головкам фосфатидилсерина, несущим отрицательный электрический заряд. В мембране **ПКС** встречается со вторым продуктом деятельности **Флазы C** – гидрофобным **диацилглицеролом**, который непосредственно активирует **ПКС**.

Стратегия 5:

Гормональная (эндокринная) регуляция метаболических путей

Эндокринная система координирует и регулирует деятельность практически всех органов и систем организма, обеспечивает его адаптацию к постоянно изменяющимся условиям внешней и внутренней сред, сохраняя постоянство

внутренней среды, необходимое для поддержания нормальной его жизнедеятельности.

Каждый тип клетки содержит специфическую комбинацию различных рецепторов, что даёт ей возможность по-разному отвечать на действие нескольких гормонов, одновременно циркулирующих в кровотоке. Иными словами, благодаря использованию разными типами клеток различных комплексов рецепторов, становится возможной тонкая регуляция функционального состояния клеток и органов. Для этого оказалось достаточно сравнительно небольшого комплекта гормонов, которые можно условно разделить на две основные группы:

1. Анаболические гормоны. Прежде всего, такие как соматотропный гормон, инсулин, андрогены и эстрогены. Их эффекты обеспечивают синтез и аккумуляцию биополимеров. Интегральный показатель анаболических процессов – положительный азотистый баланс.

2. Катаболические гормоны. В первую очередь это катехоламины, глюкагон и глюкокортикоиды. Гормоны этой группы стимулируют реакции расщепления.

Под действием гормонов (первичных мессенджеров) внутри клетки синтезируются вторичные мессенджеры, формируются специфические сигнальные пути, опосредуемые белками-посредниками, изменяется экспрессия множества различных генов. В конечном итоге происходит целенаправленное изменение активности различных внутриклеточных ферментных систем и путей метаболизма.

Заключение

Живые объекты (системы) состоят из множества специфически взаимодействующих биомолекул. Живые объекты отличаются от неживых своей способностью извлекать из окружающей среды и преобразовывать энергию, которая расходуется на построение биомакромолекул и поддержание характерной для живого объекта сложной структурной организации. Выделяют пять стратегий регуляции метаболических процессов.

1. Быстрое изменение каталитической активности ключевых (регуляторных) ферментов под влиянием аллостерических регуляторов. Ключевые ферменты относятся к категории аллостерических ферментов. Аллостерические регуляторы, действуя в очень малых концентрациях, вызывают существенное изменение активности аллостерического фермента при одной и той же концентрации субстрата.

2. Модификация ферментов:

- 2.1. Ковалентная модификация ферментов путём их обратимого фосфорилирования – дефосфорилирования. Этот вид модификации действует параллельно с аллостерической регуляцией и реализуется так же быстро. Фосфорилирование ферментов катализируют протеинкиназы. Дефосфорилирование происходит с участием протеинфосфатаз. Протеинкиназы и протеинфосфатазы классифицируют по названию фосфорилируемых – дефосфорилируемых ими

остатков аминокислот. Выделяют тирозин-специфичные и серин-треонин-специфичные ферменты.

2.2. Нековалентная модификация ферментов, которая реализуется путем ограниченного (лимитированного) протеолиза, катализируемого протеазами. Как правило, носит каскадный характер и в отличие от ковалентной модификации необратима. Такой модификации подвергаются ферменты, изначально синтезирующиеся в неактивной форме как проферменты, или зимогены.

К нековалентной модификации ферментов можно отнести мультиферментные комплексы. Для их функционирования характерным является то, что продукт первого фермента в составе комплекса тут же становится субстратом следующего фермента этого же комплекса. Благодаря этому достигается чрезвычайно высокая скорость катализа (нет ограничений, связанных с диффузией молекулы субстрата к активному центру фермента) и реализуется высокоэффективная регуляция ферментативного процесса.

3. Изменение количества фермента, которое достигается усилением его биосинтеза либо разрушением (деградацией) уже имеющихся молекул фермента. Это путь медленного изменения активности метаболических путей. Реализуется спустя часы, поскольку идет синтез белка *de novo*, но эффект длится несколько суток.

Изоферменты – молекулярные формы (изотипы) одного фермента, имеющие отличия по их первичной структуре, что детерминировано генетически. Изоферменты катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по сродству к субстрату, чувствительности к регуляторам, могут иметь различные рН-оптимумы и отличаются по электрофоретической подвижности.

4. Компартментализация ферментов и метаболических путей. Пространственное разделение метаболических путей позволяет согласованно и одновременно протекать анаболическим и катаболическим реакциям в пределах клетки. Компартментализация позволяет регулировать активность ферментов с помощью доступности субстратов и кофакторов, удаления продуктов и направления их в другие компартменты, а также реализации механизма обратной связи.

5. Гормональная (эндокринная) регуляция метаболических путей. Эндокринная система координирует и регулирует деятельность практически всех органов и систем организма, обеспечивает его адаптацию к постоянно изменяющимся условиям существования, сохраняя постоянство внутренней среды, которое необходимо для нормальной жизнедеятельности. Под действием гормонов (первичных мессенджеров) внутри клетки синтезируются вторичные мессенджеры, формируются специфические сигнальные пути, опосредуемые белками-посредниками, изменяется экспрессия множества генов. В итоге происходит целенаправленное изменение активности различных путей метаболизма.

ЛЕКЦИЯ 4

ТЕМА: СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ. ЭНЕРГЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ БИОКАТАЛИЗА

План лекции:

1. Свойства ферментов, отличающие их от химических катализаторов, действующих в неживых системах.
2. Рибозимы.
3. Об особых условиях ферментативного катализа.
4. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.
5. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH.
6. Виды субстратной специфичности ферментов.
7. Энергетика и термодинамика ферментативного катализа.
8. Переходное состояние и фермент-субстратный комплекс (ES).
9. Явления, лежащие в основе снижения ферментом энергетического барьера катализируемой им реакции и уменьшения величины энергии активации субстрата (E'_a).
10. Строение ферментов.
11. Строение каталитического (активного) центра фермента.
12. Изоферменты.
13. Этапы и молекулярные механизмы ферментативного катализа.
14. Номенклатура и классификация ферментов.

Заключение

Ферменты являются биологическими катализаторами. Их называют также каталитически активными белками. Как и химические катализаторы неорганической природы, ферменты катализируют только термодинамически вероятные реакции, то есть те биохимические превращения, которые могут спонтанно (самопроизвольно) протекать в данных условиях. Важно помнить, что ферменты не инициируют химические реакции, а только многократно увеличивают скорость их протекания. Фермент не может изменить направление химического превращения. В случае обратимого биохимического процесса фермент не сдвигает равновесие реакции, он в одинаковой степени увеличивает скорость как прямой, так и обратной реакций, благодаря чему состояние равновесия достигается во много раз быстрее. В ходе биохимической реакции ферменты претерпевают определенные изменения, но по ее завершении возвращаются в исходное состояние, то есть не расходуются.

Ферменты являются тем рабочим аппаратом, при помощи которого реализуется действие генов. Не случайно в геноме всех живых организмов закодирована первичная структура белков, а не липидов или углеводов. Ферменты как

продукты экспрессии генов обеспечивают синтез любых других биомолекул, необходимых для жизнедеятельности клетки. Организованная последовательность процессов обмена веществ обусловлена тем, что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов. Благодаря этому каждая ткань обладает характерным «ферментным профилем». В каждом случае обнаруживается хорошее совпадение ферментного профиля с соответствующей биологической функцией данной ткани или органа. Таким образом, фермент – ключевой участник любого биологического процесса. Значение ферментов в обеспечении жизнедеятельности клеток точно и образно определил академик И.П. Павлов, назвав их «возбудителями жизни».

Ферменты – самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Следует перечислить многочисленные функции белков, выполняемые ими в живых системах:

1. Ферментативная (каталитическая).
2. Гормональная, регуляторная – контроль метаболизма гормонами белково-пептидной природы.
3. Рецепторная – рецепторы (гликопротеиды) клеточной поверхности или внутриклеточные рецепторы.
4. Транспортная – перенос по сосудистому руслу, межклеточному пространству, через различные мембраны, по цитоплазме и внутри субклеточных органелл.
5. Структурная – участие в построении биомембран.
6. Опорная, или механическая (функция близка к структурной) – обеспечение прочности опорных тканей: коллаген (соединительная ткань), кератин (эпителий кожи).
7. Трофическая (резервная) – запас питательных веществ для развивающегося из яйца организма (овальбумин).
8. Субстратно-энергетическая – участие в синтезе АТФ (окисление аминокислот на терминальной стадии голодания).
9. Механо-химическая – белки сократительного аппарата мышц (миозин, актин) и цитоскелет клеток.
10. Энерготрансформирующая – белки дыхательной цепи митохондрий (транспорт электронов и синтез АТФ).
11. Ко-генетическая – вспомогательная функция: ДНК- и РНК-полимеразы.
12. Генно-регуляторная – гистоны как регуляторы репликации.
13. Иммунологическая, или защитная – иммуноглобулины (антитела).
14. Обезвреживающая – в крови связывают ионы тяжелых металлов, алкалоидов и т. д.
15. Гемостатическая – превращение фибриногена в фибрин, образующий основу сгустка.

В представленном перечне функций белков **каталитическая функция** не случайно указана первой.

XX век для биохимии прежде всего век энзимологии. В 1926 году Джеймс Самнер первым в мире получил в кристаллическом виде фермент *уреазу*. Это

событие в истории биохимии поставило точку в научной дискуссии на тему: «Существуют ли ферменты, имеющие небелковую природу?».

Свойства ферментов, отличающие их от химических катализаторов, действующих в неживых системах:

1. Термолабильность. Несмотря на то, что увеличение температуры усиливает катализ, при высоких значениях температуры (для животных выше 40 °С) происходят денатурация белка и инактивация фермента. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется его температурным оптимумом. У животных этот оптимум лежит между 37–40 °С, у растений – между 50 и 60 °С, хотя имеются исключения из этого правила.

2. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды. Величина pH, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется его pH-оптимумом. Большинство ферментов имеет максимальную активность при значении pH, близком к нейтральному: 7,35–7,4. (В химии нейтральное значение шкалы pH равно 7,4). При других значениях водородного показателя существенно изменяется степень ионизации аминокислотных остатков. Лишь некоторые специализированные ферменты в организме животных и человека функционируют в кислой среде (пепсин – pH 1,5–2,5; кислая фосфатаза лизосом – pH 3,0–5,0) или щелочной среде (трипсин – pH 7,8; аргиназа – pH 9,5–9,9).

3. Субстратная специфичность как универсальное свойство ферментов. Действие большинства ферментов высокоспецифично. Такие ферменты (проявляют абсолютную субстратную специфичность) катализируют расщепление только одного типа связи в субстратах определенной структуры. Некоторые из этих ферментов отличаются стереохимической специфичностью, то есть действуют только на один из пространственных изомеров. Специфичность превращений с участием ферментов подразумевает также образование строго определенного продукта.

4. Ферментативный катализ тонко регулируется с помощью различных активаторов и ингибиторов.

5. Ферменты являются чрезвычайно активными катализаторами, они повышают скорость реакции в 10^5 – 10^{17} раз и более. Во многих случаях каталитическая активность ферментов существенно превышает таковую у неорганических катализаторов.

Ферменты, являясь белками, обладают всеми чертами химического строения и структурной организацией белковых молекул. Молекулы ферментов имеют первичную, вторичную (α -спираль и β -складчатый слой) и третичную структуру. Существенная доля ферментов имеет четвертичную структуру – являются олигомерными белками. Молекула таких ферментов состоит из нескольких субъединиц или протомеров. Ферменты, имеющие олигомерное строение, образуют особую категорию ферментов – *аллостерических ферментов*. Они являются «ключевыми» ферментами, регулирующими активность метаболических путей в целом.

Лишь сравнительно небольшая часть ферментов является простыми белками (различные протеиназы). Чаще всего ферменты – сложные белки, то есть их

молекула содержит, помимо белковой части (апофермент), небелковые компоненты – простетические группы.

Рибозимы

Наряду с каталитически активными белками известны также каталитически активные нуклеиновые кислоты – **рибозимы**, которые были открыты в 1980 году Томасом Чеком и Сидни Олтменом. Они выделили рибозимный комплекс из клеток простейших и бактерий (Нобелевская премия 1989 года «... за исследование каталитических свойств РНК»). Термин «**рибозим**» происходит от **ribonucleic acid** и **enzyme**. Рибозимы составляют немногочисленную группу молекул малых ядерных РНК, которые участвуют в посттранскрипционной модификации РНК, а также 28S-рРНК и осуществляют пептидилтрансферазную реакцию в процессе трансляции белка. Рибозимы:

- катализируют гидролиз фосфодиэфирных и других связей внутри молекулы РНК;
- обеспечивают аминотрансферазную активность в рибосомах.

В качестве кофакторов для рибозимов выступают ионы двухвалентных металлов, часто ионы Mg^{2+} .

Предполагают, что существующие рибозимы можно рассматривать как реликты «мира РНК» – раннего периода биохимической эволюции, когда белки еще не приобрели такого значения, как в последующие периоды. Таким образом, рибозимы – единственное исключение из правила: «Все ферменты – белки, но не все белки – ферменты» («Ферменты – биокатализаторы, имеющие белковую природу»).

Особые условия ферментативного катализа

Выше было упомянуто, что ферменты, будучи белками по химическому строению, термолабильны и их конформация существенно зависит от pH. Эти обстоятельства позволяют говорить о том, что ферментативный катализ, в отличие от катализа в неживых системах, протекает в особых условиях: при постоянном атмосферном давлении, для каждого фермента существуют свои температурный и pH-оптимумы.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Как любые химические превращения, ферментативные реакции в значительной степени зависят от температуры. Ферменты, будучи в своей основе белками, при температуре выше 40 °С в большинстве своем необратимо изменяются. Уже в диапазоне роста температуры от 40 до 50 °С наблюдается денатурация белка, что совпадает с началом падения активности фермента. Таким образом, температурный интервал для работы ферментов ограничен. Для большинства из них температурный оптимум лежит в диапазоне от +30 до +40 °С (рис. 33).

Исключение составляет термофильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), которую выделили из бактерий *Thermus aquaticus* – обитателей термальных источников. Температурный оптимум для этой ДНК-полимеразы составляет +72 °С.

Экстремально низкие температуры также уменьшают скорость ферментативной реакции, что обуславливается:

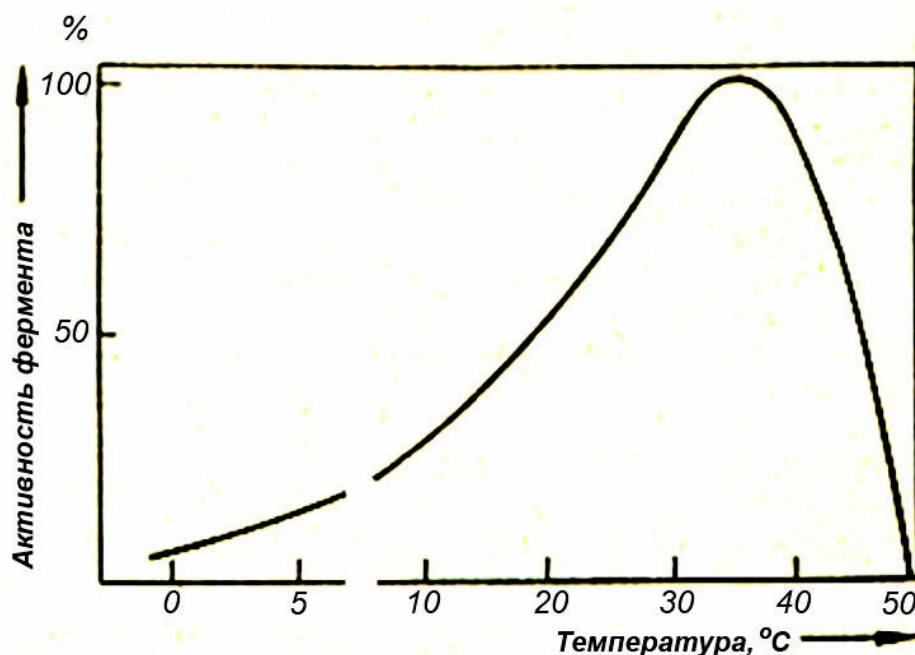


Рис. 33. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

- замедлением диффузии молекул субстрата и уменьшением частоты столкновения субстрата с активным центром фермента;
- денатурацией фермента.

Из графика (рис. 33) следует также, что для большинства ферментов высокие температуры более губительны, чем низкие температуры. Так, часть кривой графика в диапазоне температур от 37 до 50 °C имеет крутой спуск, в то время как кривая в диапазоне от 37 до 0 °C понижается более полого.

Вместе с тем необходимо помнить о том, что термостабильность отдельных ферментов различна, что используют в практике энзимологии при выделении и очистке ферментов.

Вант-Гоффом был выведен коэффициент (Q_{10}), характеризующий зависимость скорости химической реакции от температуры:

$$Q_{10} = V_{T+10}/V_T$$

Коэффициент показывает, во сколько раз возрастет скорость химических реакций при увеличении температуры на 10 °C. Для химических реакций в неживых системах $Q_{10} = 2,0$ (удвоение скорости на каждые дополнительные 10 °C). Для ферментативных реакций, протекающих в организме, $Q_{10} = 1,7$.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

В зависимости от значения pH среды различные функциональные группы аминокислот молекулы фермента будут ионизированы в разной степени. Так,

при кислых значениях рН (повышение концентрации ионов H^+) перестают диссоциировать функциональные группы, обеспечивающие отрицательные заряды, группы – доноры ионов водорода. Одновременно начинают протонироваться те функциональные группы, которые способны принять дополнительные водороды. В итоге при кислых значениях рН в молекуле белка начинают преобладать положительные электрические заряды. При сдвиге рН среды в щелочной диапазон (повышение концентрации гидроксильных ионов, что эквивалентно формированию дефицита ионов водорода) происходит усиление степени диссоциации групп – доноров водорода при одновременном удалении водородов с протонированных групп. Последние лишаются электрического заряда. Таким образом, при щелочных значениях рН в молекуле белка начинают преобладать отрицательные заряды.

Изменение распределения электрических зарядов в молекуле фермента неизбежно влечет за собой изменения её конформации. Нарушение нативной конформации любого белка всегда приводит к частичной или полной потере его функций. Эти физико-химические явления лежат в основе того, что даже при незначительном отклонении величины водородного показателя среды от рН-оптимума для данного фермента скорость катализируемой им реакции существенно снижается. Типичные случаи влияния сдвигов рН на скорость ферментативных реакций представлены на рис. 34:

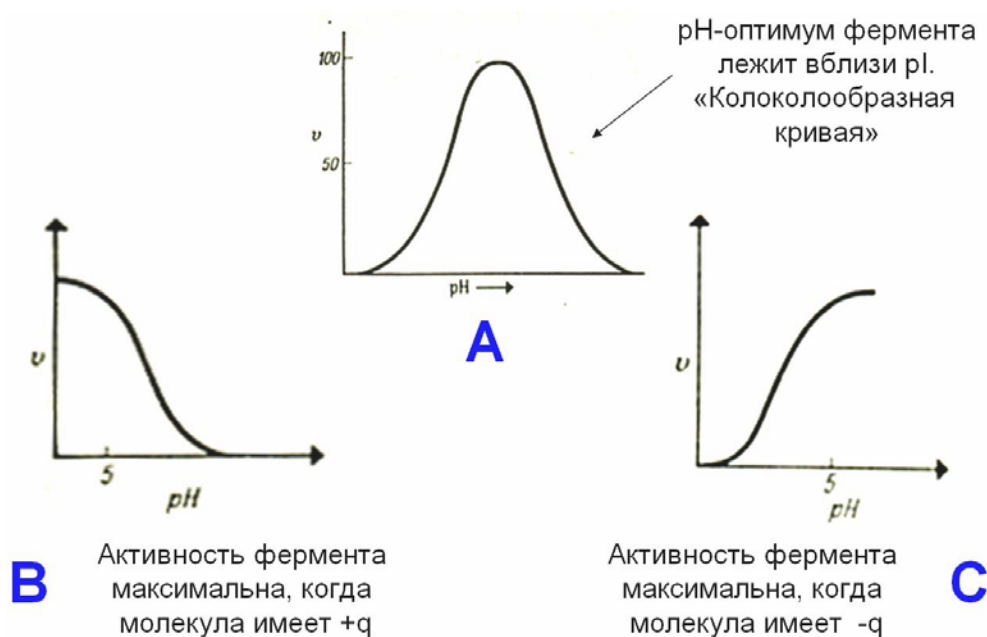


Рис. 34. Зависимость скорости ферментативной реакции от рН сред

pI – изоэлектрическая точка белка. pI обозначает величину рН, при которой в молекуле белка число положительных зарядов равно числу отрицательных зарядов.

Исключение из правила составляет фермент **инвертаза**, катализирующий гидролиз молекулы дисахарида сахарозы до глюкозы и фруктозы. Скорость ре-

акции, катализируемой инвертазой, остается неизменной в диапазоне значений pH от 3,0 до 7,5.

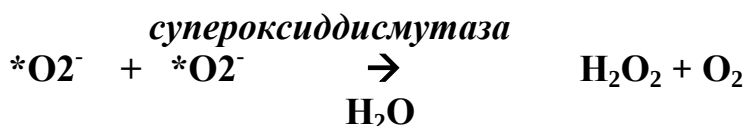
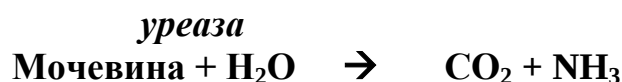
При суспендировании фермента в среде с pH, который не совпадает с pH-оптимумом фермента, в основе нарушений его каталитических свойств будут лежать:

- изменение степени ионизации функциональных групп аминокислот в активном центре, ответственных за связывание и правильное ориентирование молекулы субстрата;
- изменение степени ионизации функциональных групп аминокислот в активном центре, непосредственно ответственных за катализ;
- изменение конформации части или большей части молекулы фермента, затрагивающей активный центр, что нарушает пространственную ориентацию контактных и каталитических функциональных групп.

Неоптимальное значение pH среды также будет влиять на сродство субстрата к активному центру фермента по причине изменения степени ионизации молекулы субстрата.

Виды субстратной специфичности ферментов

1. Абсолютная субстратная специфичность. Активный центр фермента комплементарен только одному субстрату. В природе явление абсолютной субстратной специфичности сравнительно редкое. Примерами могут служить реакции:



2. Групповая субстратная специфичность. Этот вид специфичности характерен для большей части ферментов. Фермент катализирует однотипные реакции в группе структурно сходных субстратов. Примеры:



Протеазы катализируют гидролиз пептидных связей: $-\text{CONH}-$

3. Стереоспецифичность. Субстрат может иметь несколько стереоизомеров, но фермент взаимодействует только с каким-то одним определенным стереоизомером. Примеры:

D- и L-сахара. *Гексокиназа* активна только по отношению к **D-глюкозе**.

α - и β -гликозидные связи. *Амилаза* активна только по отношению к α -1,4-гликозидной связи (крахмал, гликоген), но не к клетчатке.

D- и L-аминокислоты.

Цис / Транс-изомеры.

4. Каталитическая субстратная специфичность. Одна молекула служит субстратом для нескольких ферментов. Пример: **глюкозо-6-фосфат** способен:

а) В гликолизе превращаться во **фруктозо-6-фосфат** (реакцию катализирует *фосфоглюкоизомераза*).

б) Включаться в пентозофосфатный путь, образуя **6-фосфоглюконолактон** (реакцию катализирует *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа*).

в) В глюконеогенезе превращаться в **глюкозу** (реакцию катализирует *глюкозо-6-фосфатаза*).

Ферменты, использующие один и тот же субстрат, имеют активные центры, строение которых существенно отличается. Этим определяется различие путей превращения одного и того же субстрата.

Энергетика и термодинамика ферментативного катализа

Согласно кинетической теории, для химического взаимодействия молекул необходимо выполнение двух ключевых условий:

1. Молекулы должны сталкиваться друг с другом, то есть сближаться на расстояния, достаточные для образования химических связей.
2. Столкнувшиеся молекулы должны обладать энергией, достаточной для преодоления **энергетического барьера**.

Химическая реакция, в ходе которой субстрат (S) превращается в продукт (P), протекает потому, что в любой момент времени некоторая доля молекул S обладает большей внутренней энергией по сравнению с другими молекулами данной популяции, и этой энергии оказывается достаточно для преодоления ими «вершины» энергетического барьера и перехода в активную форму, называемую **переходным состоянием**. Иными словами, в химические взаимодействия будут вступать только те молекулы, которые обладают **повышенной энергией** по сравнению с остальными молекулами. Эта дополнительная энергия, позволяющая молекуле участвовать в реакции, называется **энергией активации (E_a)**.

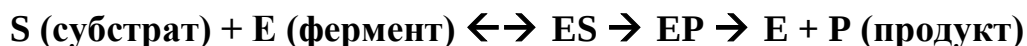
Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии. Отсюда следует, что при наличии у реагирующих молекул достаточной энергии все факторы, повышающие частоту их столкновений, будут повышать скорость реакции. Такими факторами могут быть повышение температуры (скорость повышается вдвое на каждые 10 °C) и добавление в реакционную смесь катализаторов, которые обеспечивают «обходной путь»: они снижают энергетический барьер. То есть в присутствии фермента (катализатора) молекулы начинают более активно химически взаимодействовать, и для этого им достаточно обладать меньшей по величине энергией активации (E'_a). Таким образом, в присутствии ферментов происходит

снижение энергии активации для взаимодействующих биомолекул, что позволяет клеткам значительно повышать скорости биохимических превращений, избегая фатального для них повышения температуры. Реакции метаболизма при этом протекают в условиях температурного оптимума от +37 до +40 °С.

Переходное состояние и фермент-субстратный комплекс (ES)

Теория переходного состояния возникла на основе исследований Г. Эйринга, проведенных им в первой половине 30-х годов XX столетия. Своё название теория получила в связи с тем, что она связала скорости химических реакций с термодинамическими свойствами реагирующих молекул, которые находятся при этом в определенном состоянии – в **переходном состоянии** – и обладают высокой энергией. Любая система реагирующих молекул претерпевает определенную последовательность изменения своих энергетических состояний, проходя на некотором этапе состояние с максимальной энергией (рис. 35). Это состояние и представляет собой переходное состояние.

В общем виде реакцию, катализируемую ферментом, можно представить как:



Время существования **ES** совпадает с временем продолжительности переходного состояния.

Из сказанного выше следует, что образование **ES** – способ уменьшения E_a , в условиях, при которых нельзя повышать температуру более +40 °С. Эти процессы представлены в виде схемы на рис. 35.

Стадия образования «**первичного**» **ES-комплекса** протекает сравнительно быстро и обратимо (скорость процесса в основном зависит от концентрации субстрата **[S]**).

Стадия **превращения «первичного» ES-комплекса в «активированный» ES-комплекс** – **лимитирующая**. На этой стадии происходит химическое превращение субстрата в продукт: разрываются определенные химические связи в молекуле субстрата и образуются новые связи – появляется молекула продукта (в уравнении – стадия **ES → EP**).

Стадия диссоциации комплекса фермент-продукт (**EP**) протекает сравнительно быстро: выход продукта (**P**) и освобождение молекулы фермента (**E**), который готов к следующему акту катализа.

Схема на рис. 35 наглядно демонстрирует, что **ферментативные реакции протекают в полном соответствии с законами термодинамики**, а именно: фермент катализирует только термодинамически вероятную реакцию, то есть такую, которая в данных условиях может происходить спонтанно (самопроизвольно). При спонтанной реакции изменение свободной энергии всегда имеет отрицательное значение ($-\Delta G$), поскольку свободная энергия

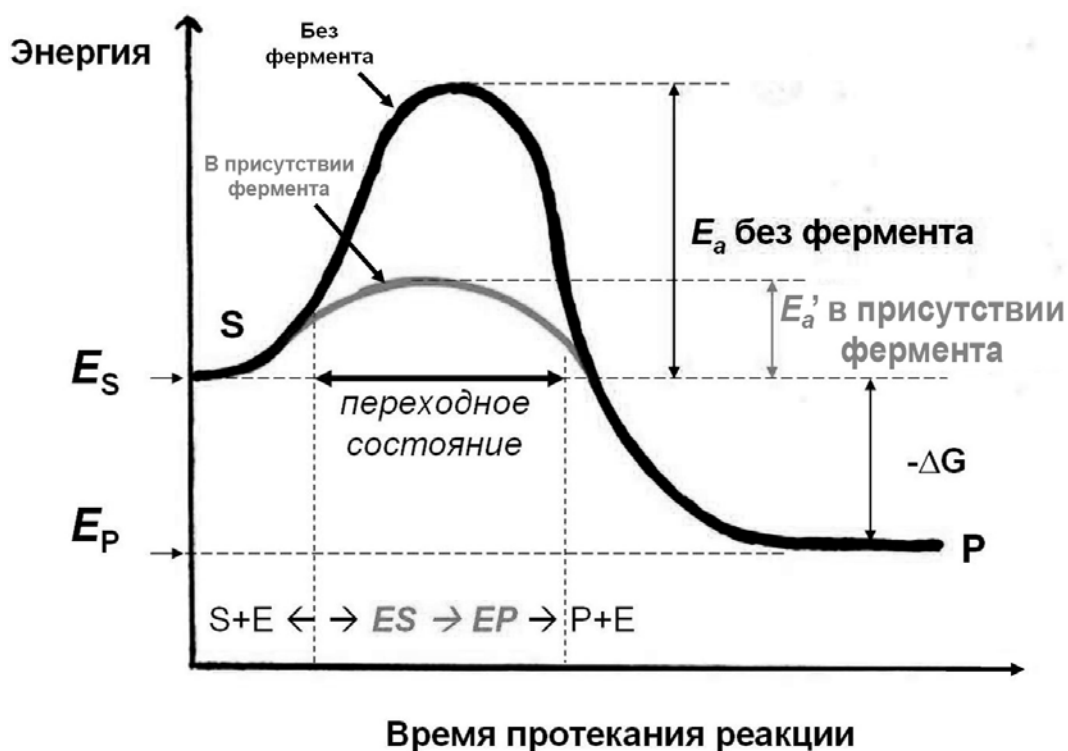


Рис. 35. Энергетическая диаграмма. Изменение свободной энергии молекул субстрата (S) и продукта (P) в реакции, катализируемой ферментом, и в реакции без участия фермента

По оси ординат – свободная энергия молекул S и P. В период существования переходного состояния происходят реакции химического превращения S в P. Продолжительность переходного состояния совпадает по времени с существованием фермент-субстратного комплекса ($ES \rightarrow EP$). Благодаря присутствию фермента происходит снижение энергетического барьера реакции и уменьшение величины энергии активации (E'_a) для субстрата по сравнению с таковой без фермента (E_a).

продукта реакции (E_P) будет меньше свободной энергии субстрата реакции (E_S) по причине того, что часть свободной энергии субстрата израсходовалась на разрыв одних химических связей и образование других. Иными словами, для спонтанных (самопроизвольно протекающих) реакций характерно **выделение свободной энергии**, благодаря которой становится возможным совершение химической работы.

Из схемы следует также, что участие фермента не влияет ни на свободную энергию субстрата и продукта реакции, ни на величину изменения свободной энергии реакции ($-\Delta G$). Это означает, что как в присутствии, так и в отсутствии фермента энергия химической системы остаётся постоянной. Кроме того, изменение свободной энергии не связано с энергией активации.

Самые первые попытки изучения скоростей ферментативных реакций привели к выводу о том, что для получения однозначных результатов в кинетических исследованиях необходимо строго контролировать и стабилизировать температуру.

Основы современных представлений о температурной зависимости констант скоростей химических и биохимических реакций были заложены работами Дж. Вант-Гоффа и С. Аррениуса в 80-е годы XIX века. Эти авторы впервые сопоставили кинетические данные с величинами констант равновесия. Важность этого подхода состояла в том, что константы равновесия являются термодинамическими величинами, то есть имеют строгий физический смысл по сравнению с кинетическими константами. Аррениус предложил уравнение, которое отражает закономерную связь между константой скорости реакции и температурой:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

где: $\ln$ – натуральный логарифм;

k – константа скорости реакции;

T – абсолютная температура по шкале Кельвина;

E_a – энергия активации;

R – газовая постоянная.

Впоследствии было доказано, что это уравнение выполняется для большинства реакций. Аррениус трансформировал свое уравнение (проинтегрирование по T), что позволило представить его в удобной графической форме, поскольку зависимость $\ln k$ от $1/T \times 10^3$ является прямой с наклоном, равным $-E_a/R$. На практике удобно строить зависимость $\lg k$ от $1/T$. В этом случае наклон линии графика к оси «Х» равен $-E_a/2,303R$. Этот график известен как **график Аррениуса** (рис. 36). С его помощью оказалось просто определять величину энергии активации (E_a):

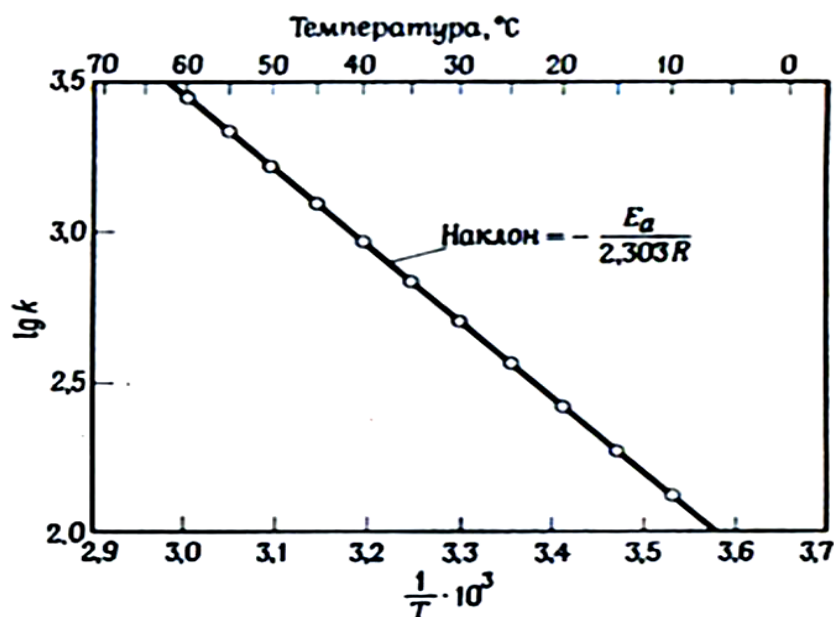


Рис. 36. График Аррениуса

Коэффициент 2,303 – коэффициент пересчета натурального логарифма в десятичный.

Явления, лежащие в основе снижения ферментом энергетического барьера катализируемой им реакции и уменьшения величины энергии активации субстрата (E'_a)

Из сказанного выше понятно, что если бы **все молекулы** (в данном объеме реакционной смеси) **обладали энергией активации**, то реакция произошла бы мгновенно. В действительности в реакции участвует лишь определенная доля молекул, которые, в отличие от остальных, обладают повышенной энергией – энергией активации. Таким образом, сравнительно низкая скорость реакции связана с тем, что не любое столкновение молекул может завершаться их химическим взаимодействием. Лимитировать процесс будут: а) энергетические возможности молекул – потенциальных реагентов и б) неправильная ориентация взаимодействующих молекул. Рассмотрим один из вариантов уравнения кинетики химических реакций:

$$V = p Z e^{-(E_a/RT)},$$

где: V – скорость химической реакции;

p – вероятностный фактор, определяющий пространственную ориентацию реагирующих молекул;

Z – частоты столкновений;

выражение $e^{-(E_a/RT)}$ показывает долю молекул с энергией E_a при температуре T .

Установлено, что фермент увеличивает факторы p и Z , тем самым минимизируя случайность во взаимодействии молекул.

Эффект ориентации. На самом первом этапе ферментативной реакции, когда молекула субстрата диффундирует к активному центру фермента, за счет способствующих функциональных групп активного центра происходит правильное ориентирование субстрата в пространстве, что необходимо для его связывания с контактными функциональными группами центра.

Эффект сближения. Правильно сориентированный в пространстве субстрат связывается с контактными функциональными группами активного центра фермента. При этом атакуемые в молекуле субстрата группы или связи настолько сближаются с каталитическими функциональными группами активного центра, что становится возможным достижение переходного состояния (образование фермент-субстратного комплекса).

Стабилизация переходного состояния. В данном состоянии фермент снижает энергетический барьер реакции и происходит превращение субстрата в продукт ферментативной реакции. Одним из механизмов снижения энергетического барьера являются напряжение и деформация связи в молекуле субстрата, атакуемой ферментом. Так, связывание субстрата в активном центре фермента, с одной стороны, приводит к конформационным перестройкам в области активного центра фермента и, с другой стороны, к деформации молекулы субстрата. Иными словами, **происходит вынужденное индуцируемое соответствие между ними**. Эти явления лежат в основе того, что для химических пре-

вращений требуется затратить существенно меньше энергии: снижаются энергетический барьер реакции и величина энергии активации для молекулы субстрата.

Специальные расчеты показали, что эффекты сближения и ориентации могут обеспечить 10^5 -кратное увеличение скорости ферментативной реакции по сравнению со скоростью некатализируемой спонтанной реакции.

Строение ферментов

По строению ферменты подразделяют на однокомпонентные, или простые белки и двухкомпонентные, или сложные белки, содержащие в своем составе дополнительную группу органического строения, но небелковой природы (**протестическая группа** или **кофермент**). Сложный фермент в целом называется **холофермент**, то есть полный фермент (от *греч. holos* – весь, полностью). Только холофермент обладает ферментативной активностью. Собственно белковую часть сложного фермента называют **апоферментом**. Если дополнительная группа прочно связана с апоферментом, ее называют **протестической группой**. Если дополнительная группа легко отделяется от апофермента (например, при диализе), то её называют **коферментом (коэнзимом)**. В апоферменте есть специфический кофермент-связывающий домен.

Апофермент + Кофермент (Протестическая группа) = Холофермент

Кофермент является активным участником катализируемого ферментом процесса, при этом он претерпевает обратимые химические изменения. Коферменты подразделяют на:

- **Витаминные коферменты** (их предшественниками являются различные витамины): НАД, НАДФ, ФМН, КоА и др.
- **Невитаминные коферменты**, к их числу относятся:
 - а) нуклеотидные коферменты;
 - б) металлопорфириновые коферменты;
 - в) пептидные коферменты;
 - г) ионы металлов.

Кофактором называют присутствующий в активном центре атом металла. Около 25 % известных ферментов нуждаются в кофакторах.

Роль металлов в ферментативном катализе многогранна:

1. Металлы образуют электрофильные группы в составе каталитического центра фермента: они связываются с отрицательными зарядами в молекуле субстрата.
2. Металлы с переменной валентностью сами участвуют в переносе электронов (прямое участие в катализе): $\text{Cu}^{+/2+}$, $\text{Fe}^{2+/3+}$.
3. Металлы участвуют в формировании и стабилизации пространственной конфигурации молекулы фермента, включая его четвертичную структуру.
4. Металлы образуют «мостик», соединяющий апофермент и кофермент.

Строение каталитического (активного) центра фермента

В каталитическом центре происходят два важнейших события:

- связывание молекулы субстрата;
- превращение субстрата в продукт.

В сложных ферментах неотъемлемой составной частью каталитического центра является кофактор.

Каталитический центр чаще всего формируется 12–16 аминокислотами, которые в первичной структуре полипептидной цепи расположены на значительном расстоянии друг от друга. После того, как полипептидная цепь фермента сворачивается в пространстве и формирует **нативную конформацию**, аминокислоты сближаются и занимают в пространстве определенное (уникальное) положение (рис. 37):

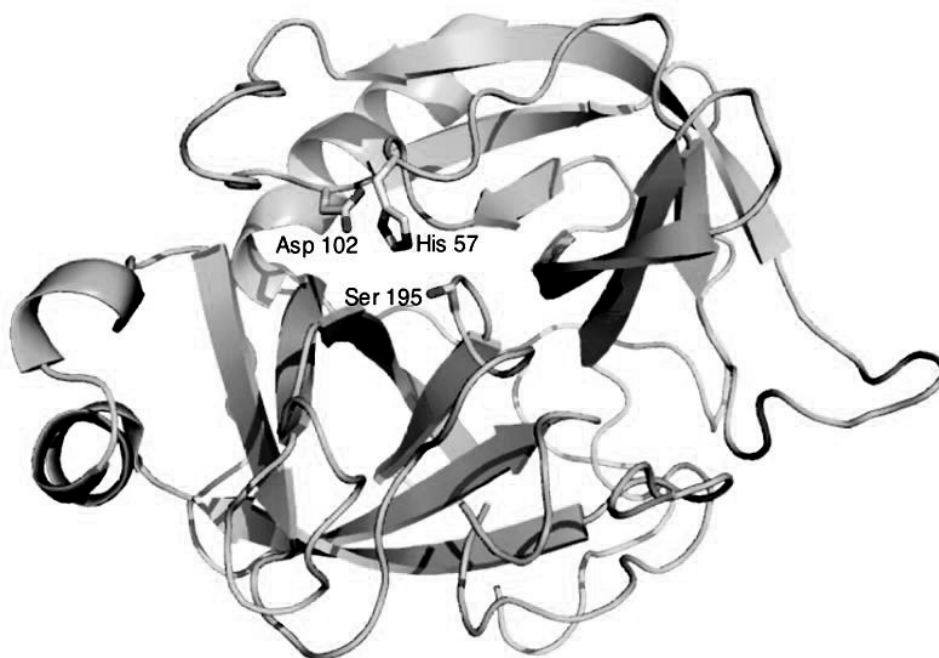


Рис. 37. Схема строения каталитического центра в молекуле химотрипсина

Таким образом, каталитический центр фермента – **трехмерное образование**. Установлено, что для некоторых ферментов каталитический центр имеет форму щели или углубления.

В структуре каталитического центра существуют **два типа функциональных групп**:

1. Контактные (якорные) функциональные группы. Они служат для связывания в правильной позиции молекулы субстрата и определяют субстратную специфичность фермента. Образующаяся связь между субстратом и контактными группами центра в 50–100 раз слабее ковалентной. Контактные группы не участвуют в катализе, отвечают за субстратную специфичность фермента.

2. Каталитические функциональные группы. Предназначены исключительно для катализа (ускорения) химического превращения субстрата в про-

дукт. Среди наиболее часто встречающихся каталитических функциональных групп можно выделить следующие:

- карбоксильная группа (аспарагин и глицин);
- аминокгруппа (лизин);
- имидазольная группа (триптофан);
- индольная группа (тирозин);
- ароматическое кольцо (фенилаланин);
- сульфгидрильная группа (цистеин);
- тиоэфирная группа (метионин) и др.

Следует также помнить о существовании двух типов остатков аминокислот, которые формально не входят в состав каталитического центра, но выполняют важные функции:

- **Вспомогательные аминокислоты.** Расположены в непосредственной близости от каталитического центра и поддерживают нативную трехмерную структуру этого центра.
- **Способствующие аминокислоты.** Они расположены дальше от каталитического центра, чем вспомогательные, но выполняют важную функцию – их функциональные группы обеспечивают правильное ориентирование диффундирующей к ферменту молекулы субстрата в пространстве, без чего невозможно его связывание с контактными функциональными группами каталитического центра.

У **аллостерических ферментов**, молекулы которых имеют олигомерную структуру, помимо каталитического центра (по одному на каждую субъединицу), имеются дополнительные центры, которые служат для высокоспецифичного связывания аллостерических регуляторов, – **аллостерические центры**. Каталитический центр и аллостерические центры пространственно разделены. Аллостерические регуляторы представляют собой гетерогенную по химическому строению группу, как правило, низкомолекулярных соединений. Каждый из аллостерических регуляторов имеет индивидуальный и высокоаффинный центр связывания. Такой регулятор, связавшись со своим аллостерическим центром, влияет на конформацию всей субъединицы, что распространяется и на каталитический центр. Изменение конфигурации каталитического центра сопровождается либо увеличением, либо снижением каталитической активности фермента. Это явление лежит в основе аллостерической регуляции ферментов. Принцип действия аллостерического регулятора представлен схемой на рис. 38.

Изоферменты (изозимы)

Многие из идентифицированных ферментов существуют в виде множественных молекулярных форм – **изоферментов**. Такая гетерогенность обусловлена наличием нескольких генов, каждый из которых кодирует одну субъединицу фермента, которые «собираются» в разных комплектах. Кроме того, в гене фермента могут иметься множественные аллели.

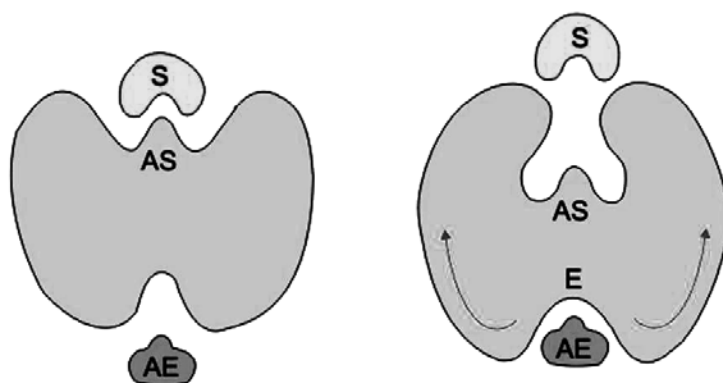


Рис. 38. Схема механизма действия аллостерического ингибитора на каталитический центр аллостерического фермента

Левая часть рисунка: в отсутствие аллостерического ингибитора (AE) аллостерический центр не занят. В этих условиях конформация молекулы фермента способствует свободному взаимодействию молекулы субстрата (S) с каталитическим центром (AS).

Правая часть рисунка: в результате связывания ингибитора с аллостерическим центром происходит изменение конформации молекулы фермента, которое распространяется на каталитический центр. Изменившаяся конформация каталитического центра не позволяет ему связывать субстрат. Каталитическая активность фермента существенно снижается.

Первым ферментом, у которого были обнаружены изоферменты, оказалась **лактатдегидрогеназа (ЛДГ)**. Изоферменты были разделены методом электрофореза в крахмальном геле, и их обозначили порядковыми номерами по степени нарастания электрофоретической подвижности: **ЛДГ-5** (самый «медленный») – **ЛДГ-1** (самый «быстрый»). Пять изоферментов **лактатдегидрогеназы** являются вариантами комбинации в различных соотношениях двух типов субъединиц: **Н-типа** и **М-типа**. Таким образом, пять изоферментов ЛДГ составлены из следующих типов субъединиц: **Н₄**, **Н₃М₁**, **Н₂М₂**, **Н₁М₃** и **М₄** (рис. 39).

Таким образом, **изоферментами (изозимами)** называют генетически детерминированные молекулярные формы ферментов. **Изоферменты** катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по физико-химическим свойствам (молекулярной массе), сродству к субстрату (то есть по величине K_M), чувствительности к ингибиторам и активаторам, рН-оптимуму и другим признакам.

Изоферменты не следует путать с изомерами и продуктами необратимой ковалентной модификации, поскольку у изоферментов отличия в первичной структуре детерминированы генетически.

Локализация определенных изоферментов в определенных тканях и органах определяется следующими факторами:

1. В разных органах и тканях существуют особенности метаболизма. Например, обнаружены различные формы фермента **лактатдегидрогеназы** в сердечной и скелетной мышцах (рис. 39). Другим примером могут служить

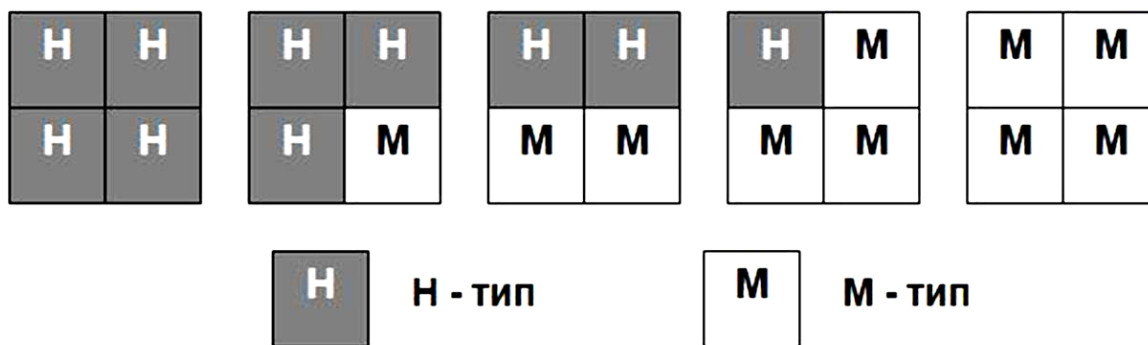


Рис. 39. Схема комбинаций субъединиц Н- и М-типов в изоферментах лактатдегидрогеназы

ЛДГ-1, обладающий наибольшей подвижностью, содержится преимущественно в миокарде.

ЛДГ-5, обладающий наименьшей подвижностью, преимущественно локализован в гепатоцитах.

ЛДГ-4 преимущественно локализован в скелетных мышцах и отчасти в гепатоцитах. Это причина того, что при болезни Боткина в сыворотке крови больного одновременно повышаются активность и содержание ЛДГ-5 и ЛДГ-4.

ЛДГ-3 преимущественно содержится в легких.

ЛДГ-2 преимущественно локализован в эритроцитах и почках.

изоферменты **гексокиназы**. Так, **гексокиназа** клеток центральной нервной системы имеет $K_M = 0,05 \text{ mM}$; ее изофермент в печени (получивший название **глюкокиназа**) имеет $K_M = 10 \text{ mM}$. То есть их сродство к субстрату различается в 200 раз.

2. В клетках одного и того же типа фермент может локализоваться в разных компартментах и выполнять разные роли в метаболизме. Например, фермент **малатдегидрогеназа** существует в разных формах в матриксе митохондрий и в цитозоле, где эти изоферменты выполняют разные функции.

3. Тонкая регулировка скоростей метаболических реакций, осуществляемая благодаря различной чувствительности изоферментов к их аллостерическим регуляторам. Некоторые регуляторные ферменты (например, **фосфофруктокиназа**) существуют в нескольких молекулярных формах, различающихся по своей чувствительности к этим регуляторам.

Прикладное значение изучения активности изоферментов – клиническая лабораторная диагностика: определение тканевой локализации патологического процесса. Изоферменты, по сути, являются тканевыми маркерами. В зависимости от тканевой локализации патологического процесса вследствие нарушения барьерной функции клеточной мембраны (**синдром цитолиза**) из клеток в кровоток попадают соответствующие изоферменты. Их количество и активность в сыворотке существенно возрастают по сравнению с нормой. Примером энзимодиагностики инфаркта миокарда может быть электрофоретическая картина активности различных изоферментов **ЛДГ** в сыворотке крови пациента (рис. 40):



Рис. 40. Результат электрофоретической оценки активности изоферментов *лактатдегидрогеназы* в сыворотке кровичеловека в норме и на различных сроках от начала инфаркта миокарда

Увеличение общей активности *ЛДГ* в сыворотке при инфаркте миокарда (на вторые сутки от начала заболевания) происходит за счет повышения активности *ЛДГ-1* (миокардиального изофермента) и в меньшей степени *ЛДГ-2*.

Этапы и молекулярные механизмы ферментативного катализа

Факт высокой специфичности фермента к субстрату позволил Эмилю Фишеру в 1890 году сформулировать гипотезу, согласно которой каталитический (активный) центр фермента структурно комплементарен субстрату. Фишер сравнивал субстрат с «ключом», а каталитический центр фермента с «замком». Его гипотеза получила название **гипотеза «ключ-замок»**. Каталитический центр фермента в рамках этой гипотезы рассматривался как стабильная, «жесткая» структура (рис. 41):

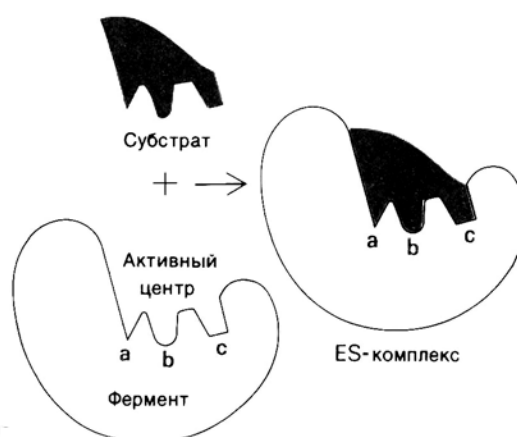


Рис. 41. Схема взаимодействия субстрата с каталитическим центром фермента, согласно модели «ключ-замок» Э. Фишера

В рамках гипотезы «ключ-замок» каталитический (активный) центр фермента сам по себе комплементарен по форме субстрату.

Основы современного учения о природе ферментативного катализа были разработаны в период с 1920 по 1946 годы Дж. Холдейном, М. Полани и Л. По-

лингом. Из работ этих исследователей вытекало важное обстоятельство: комплементарность каталитического центра субстрату имеет место только в период существования **переходного состояния**, то есть при образовании фермент-субстратного комплекса. На этой основе в 1958 г. Д. Кошландом был предложен другой вариант гипотезы «ключ-замок», объясняющий события в активном центре фермента. По этой гипотезе каталитический (активный) центр является гибкой структурой по отношению к субстрату. Субстрат, взаимодействуя с активным центром фермента, вызывает изменение его конформации, приводя к формированию фермент-субстратного комплекса, благоприятного для химических модификаций субстрата. При этом молекула субстрата также изменяет свою конформацию, что обеспечивает более высокую эффективность ферментативной реакции. Гипотезу Д. Кошланда называют **«гипотезой индуцированного соответствия»**. Впоследствии она получила экспериментальное подтверждение (рис. 42):

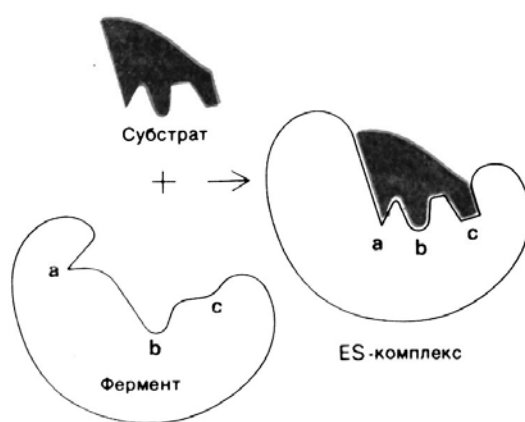


Рис. 42. Схема взаимодействия субстрата с каталитическим центром фермента, согласно модели «индуцированного соответствия» Д. Кошланда

В процессе связывания молекулы субстрата с каталитическим (активным) центром фермента индуцируется изменение пространственной структуры центра. Активный центр фермента только после присоединения субстрата становится комплементарным ему по форме.

Таким образом, индуцированное соответствие приводит к такой ориентации в пространстве функциональных групп каталитического центра фермента, которая необходима для осуществления катализа. Именно «новая» конформация каталитического центра фермента обеспечивает оптимизацию его каталитических свойств. Следует помнить, что **принцип индуцированного соответствия** – общий принцип обратимого связывания белков с лигандами (в том числе рецептора с гормоном).

В результате образования фермент-субстратного комплекса в каталитическом (активном) центре фермента субстрат располагается таким образом, чтобы участвующие в реакции функциональные группы субстрата находились в непосредственной близости друг к другу. Это свойство активного центра называют **эффектом сближения и ориентации реагентов**. Такое упорядоченное распо-

ложение субстратов вызывает уменьшение энтропии и, как следствие, снижение энергии активации (E'_a), что определяет каталитическую эффективность ферментов. Активный центр фермента также способствует дестабилизации межатомных связей в молекуле субстрата, что облегчает протекание химической реакции и образование продуктов. Это свойство активного центра называют **эффектом деформации субстрата**. Основные этапы ферментативного катализа схематично представлены на рис. 43:

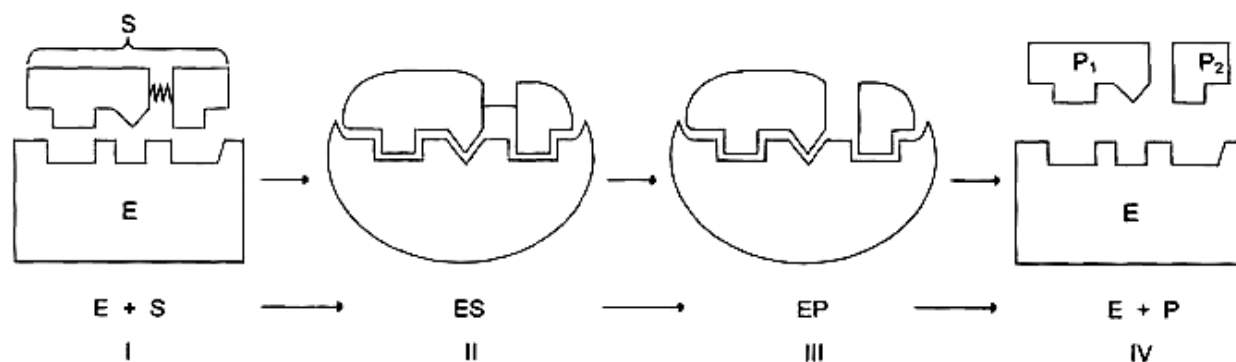


Рис. 43. Этапы ферментативного катализа

I – этап сближения и ориентации субстрата относительно каталитического (активного) центра фермента.

II – этап образования фермент-субстратного комплекса (**ES**) в результате индуцированного соответствия.

III – деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (**EP**).

IV – этап диссоциации комплекса (**EP**) с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента.

S – субстрат реакции; **E** – фермент; **P₁** и **P₂** – продукты реакции.

Молекулярные механизмы ферментативного катализа

Механизмы ферментативного катализа определяются ролью функциональных групп каталитического (активного) центра фермента в химической реакции превращения субстрата в продукт. Выделяют три главных механизма ферментативного катализа: кислотно-основной катализ, ковалентный катализ и катализ ионами металлов.

Кислотно-основной катализ

Концепция кислотно-основного катализа объясняет ферментативную активность участием в химической реакции кислотных групп (доноры протонов) или основных групп (акцепторы протонов). Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, имеют функциональные группы, проявляющие свойства как кислот, так и оснований. К аминокислотам, участвующим в кислотно-основном катализе, в первую очередь относятся: **Цис**, **Тир**, **Сер**, **Лиз**, **Глу**, **Асп** и **Гис**. Радикалы этих аминокислот в протонированной форме – кислоты (доноры протона), в депротонированной – основания (акцепторы прото-

на). Большое количество биохимических превращений идёт через стадию образования крайне неустойчивых заряженных промежуточных соединений, которые быстро распадаются на исходные молекулы, вследствие чего реакция химического превращения не происходит. В ходе кислотно-основного катализа заряженные интермедиаты стабилизируются путем переноса протонов на интермедиат или от него с помощью функциональных групп – доноров или акцепторов протонов соответственно. Это предотвращает распад интермедиатов на исходные молекулы и способствует превращению субстрата в продукт реакции, ускоряя процесс в 10^2 – 10^5 раз. Большинство ферментов действует согласно этому механизму. Одним из примеров кислотно-основного катализа может служить реакция, катализируемая алкогольдегидрогеназой печени.

Ковалентный катализ

Ковалентный катализ основан на атаке нуклеофильных (отрицательно заряженных) или электрофильных (положительно заряженных) групп активного центра фермента молекулами субстрата с обратимым образованием ковалентной связи между субстратом с одной стороны и коферментом или функциональной группой аминокислотного остатка (как правило, одной) активного центра фермента с другой стороны. Образование ковалентной связи между субстратом и ферментом специфически активирует субстрат, что существенно снижает его энергию активации. После образования ковалентного комплекса происходит реакция, высвобождающая свободный фермент. Примерами ковалентного катализа могут быть реакции, катализируемые сериновыми протеазами: трипсином, химотрипсином и тромбином.

Катализ ионами металлов

Металлы могут участвовать в каталитическом процессе как в форме прочно связанного с ферментом, так и захватываться из окружающего раствора вместе с субстратом. Металл, связанный с ферментом, способствует правильной ориентации молекулы субстрата, что необходимо для его связывания с каталитическим центром, и стабилизирует несущую заряд молекулу субстрата в переходном состоянии. Помимо этого, металлы с переменной валентностью способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, сопровождающих катализ. Около 30 % ферментов требуют присутствия одного или нескольких ионов металлов для проявления каталитической активности. Пример: ионы магния (Mg^{2+}) в реакциях, катализируемых различными киназами.

Номенклатура и классификация ферментов

Первая номенклатура ферментов была разработана в 1898 году (Тривиальная номенклатура). Современная номенклатура ферментов (Систематическая номенклатура) введена в практику в 1961 году Комиссией по ферментам при Международном биохимическом союзе. В настоящее время мы пользуемся правилами и поправками, утвержденными в 1972 году Международным союзом теоретической и прикладной химии. Современная номенклатура ферментов допускает старые тривиальные названия (например, папаин, пепсин, трипсин и химотрипсин).

По современной систематической номенклатуре название фермента составляют из химического названия субстрата, акцептора, названия той реакции, которая осуществляется ферментом, и окончания *-аза*. Например, *L-аланин: 2-оксoglутарат аминотрансфераза*.

Международная классификация ферментов. Согласно ей, все ферменты включены в «Каталог ферментов» (КФ или ЕС – **Enzymes's Catalogue**) под своим классификационным номером (шифром), состоящим из четырех чисел, разделенных точками. Первое число указывает на принадлежность к одному из шести классов. Следующие два определяют подкласс и подподкласс, а последнее число – номер фермента в данном подподклассе (рис. 44). Так, *лактатдегидрогеназа* имеет номер КФ 1.1.1.27.



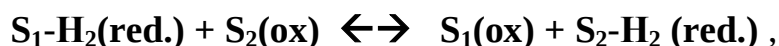
Рис. 44. Что обозначают цифры в классификационном номере фермента на примере алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.3.18.)

Конкретное содержание шифра фермента рассмотрим на примере *кислой фосфатазы* (КФ 3.1.1.2.). Фермент относится к классу гидролаз (3.), к подклассу этих ферментов, действующих на **сложноэфирные связи** (3.1.), к подподклассу ферментов, **гидролизующих моноэфиры фосфорной кислоты** (3.1.3.), порядковый номер фермента в подподклассе – 2 (3.1.1.2.).

В основу Международной классификации ферментов положен тип катализируемой реакции. Согласно ей, все ферменты подразделяют на 6 основных классов.

1 класс: ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Катализируют окислительно-восстановительные реакции, которые в общем виде можно записать как:



где: **red.** – восстановлен; **ox.** – окислен.

Этот класс содержит 17 подклассов, что делает его самым многочисленным классом ферментов.

Особенностью **оксидоредуктаз** является их способность образовывать системы окислительно-восстановительных ферментов, в которых осуществляется многоступенчатый перенос атомов водорода от первичного субстрата к конечному акцептору, обычно кислороду, с образованием воды. Так, несколько оксидоредуктаз образуют систему цитохромов, которые в качестве простетических групп содержат железопорфирины (геминное железо), отличающиеся строением боковых цепей. Оксидоредуктазы ускоряют протекание биохимических процессов, связанных с высвобождением свободной энергии. Этот класс ферментов имеет несколько коферментов и способен катализировать большое количество различных окислительно-восстановительных реакций. Это возможно благодаря тому, что один и тот же кофермент способен соединяться со многими апоферментами, образуя каждый раз оксидоредуктазу, специфичную по отношению к определенному субстрату. Коферментами оксидоредуктаз являются:

- НАД^+ (НАДН_2) – производное никотинамида или витамина РР. Партнерами НАД-зависимых дегидрогеназ являются флавопротеиды – производные витамина В₂ (ФМН/ФМНН₂). Другим коферментом во флавопротеинах является ФАД.
- НАДФ^+ (НАДФН_2).
- Хиноны (убихинон дыхательной цепи митохондрий) – хинон/гидрокси-хинон.

Разновидности оксидоредуктаз имеют специфические названия:

Дегидрогеназы – если субстрат является донором H^+ . Примеры: *малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа*.

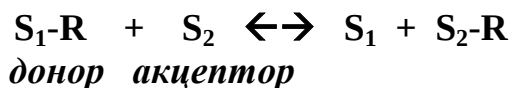
Оксидазы – если акцептором электрона является молекулярный кислород. Примеры: *цитохромоксидаза, ксантиноксидаза*.

Гидропероксидазы – если донором водорода является кофермент глутатион (GS-H). Примеры: *глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза*.

Оксигеназы (гидроксилазы) – если молекулярный кислород непосредственно включается в молекулу субстрата. Пример: *дофамингидроксидаза*.

2 класс: ТРАНСФЕРАЗЫ

Переносят функциональные группы (**R**) от молекулы-субстрата (*донора*) к другой молекуле-субстрату (*акцептору*). Содержат 8 подклассов:



В зависимости от переносимой группы делятся на подклассы:

- **Фосфотрансферазы (киназы)** переносят остаток фосфорной кислоты, точнее фосфорильную группу PO_3^{2-} . Донором фосфатных групп чаще всего является АТФ. Примеры: *глюкокиназа, гексокиназа*.
- **Аминотрансферазы** ускоряют реакцию трансаминирования аминокислот с кетокислотами, что важно для биосинтеза аминокислот. Простетической группой аминотрансфераз является пиридоксальфосфат, производное витамина В₆ (пиридоксина). Примеры: *аспартат- и аланинаминотрансферазы*.

- **Гликозилтрансферазы** ускоряют реакции переноса гликозильных остатков из молекул фосфорных эфиров или других соединений к молекулам моносахаридов, полисахаридов или других веществ. Пример: фермент **УДФ-глюкоза: гликоген-4-α-гликозилтрансфераза**, который осуществляет наращивание молекул гликогена на один остаток глюкозы.

3 класс: ГИДРОЛАЗЫ

Катализируют разрыв химических связей с присоединением воды. Содержат 11 подклассов:



Гидролазы не содержат коферментов, то есть относятся к простым белкам. В зависимости от характера гидролизуемого субстрата гидролазы делятся на ряд подклассов.

- **Эстеразы** катализируют реакции гидролиза сложных эфиров спиртов с органическими и неорганическими кислотами. Примеры: **липаза**, которая ускоряет гидролиз сложноэфирных связей в молекулах триацилглицерола, **ацетилхолинэстераза** и **фосфатазы**.
- **Гликозидазы** ускоряют реакцию гидролиза гликозидов. Обладают ярко выраженной пространственной специфичностью (α- и β-гликозидазы). Примерами могут служить **сахараза**, катализирующая гидролиз сахарозы на глюкозу и фруктозу, **лактаза** и **амилаза**.
- **Пептидазы** катализируют расщепление пептидных связей в белках и пептидах. Эндопептидазы катализируют гидролиз пептидных связей внутри молекулы, экзопептидазы – отщепление от полипептидной цепи концевых аминокислот (аминопептидазы и карбоксипептидазы). Существуют также дипептидазы, завершающие гидролиз белка. Примеры: **пепсин**, **трипсин**.
- **Амидазы** ускоряют гидролиз амидов кислот. Примеры: **уреаза**, **аспарагиназа** и **глутаминаза**.

4 класс: ЛИАЗЫ

Ускоряют негидролитические реакции распада органических соединений по связям C-C, C-N, C-O и C-S. При этом замыкаются двойные связи и выделяются такие простейшие продукты, как CO₂, H₂O и NH₃:



Класс содержит 4 подкласса. Важнейшими представителями класса лиаз являются:

- **Углерод-углерод лиазы.** К ним относятся **декарбоксилазы** кето- и α-аминокислот и **альдегидлиазы**. Представителем альдегидлиаз является **аль-**

долаза, катализирующая обратимую реакцию расщепления **фруктозо-1,6-дифосфата** до фосфотриоз: **дигидроксиацетонфосфата** и **глицеральдегид-3-фосфата**. В качестве коферментов декарбоксилазы кетокислот используют производное витамина В₁ – тиаминпирофосфат, а декарбоксилазы α-аминокислот – пиридоксальфосфат.

- **Углерод-кислород лиазы** ускоряют реакции гидратирования и дегидратирования при метаболизме углеводов и жирных кислот. Пример: **фумаратгидратаза** катализирует присоединение воды по двойной связи фумарата с образованием малата.

- **Углерод-азот лиазы.** Пример: **аспартат-аммиаклиаза**, ускоряющая реакцию прямого дезаминирования аспартата до фумарата.

В основном ферменты этого класса катализируют синтез или расщепление промежуточных продуктов обмена.

5 класс: ИЗОМЕРАЗЫ

Катализируют внутримолекулярный перенос водорода, фосфатных и ацильных групп, перемещение двойных связей, изменение пространственного расположения атомных группировок:



Класс делится на 5 подклассов, помимо **изомераз** сюда относятся **рацемазы**, **эпимеразы** и **мутазы**. Примерами могут служить **фосфоглюкоизомеразы**, катализирующая превращение:

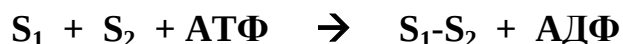


или **дифосфоглицератмутаза**:



6 класс: ЛИГАЗЫ

Катализируют присоединение друг к другу двух разных молекул с образованием ковалентной связи, то есть синтез органических молекул в клетке. Процесс идет с потреблением энергии. Если источниками является АТФ или другие нуклеозид-трифосфаты, то ферменты называют **СИНТЕТАЗАМИ**:



С-С лигазы. Пример – **пируваткарбоксилаза**.

С-N лигазы. Пример – **глутаминсинтетаза**.

С-S и С-O лигазы. Примеры: **ацил-КоА синтетаза** и **аспаргил-тРНК синтетаза**.

Если источниками являются высокоэнергетические фосфаты ($X\sim\Phi$), такие как **фосфоенолпируват**, **креатин-фосфат** и др., то ферменты называют **СИНТАЗАМИ**:



Пример – **цитратсинтаза**:



Класс содержит 5 подклассов.

Заключение

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы или каталитически активные белки. Их функционирование подчиняется законам термодинамики, однако ферменты имеют важные отличия от неорганических катализаторов, действующих в неживых системах. Ферменты – самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Среди многочисленных функций, выполняемых белками в живых системах, ферментативная (каталитическая) функция – главная. Каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов, благодаря чему каждая ткань и орган обладают характерным «ферментным профилем». Наряду с каталитически активными белками известны каталитически активные нуклеиновые кислоты – рибозимы (от **ribonucleic acid + enzyme**), которые были открыты в 1980 году у бактерий. Рибозимы – единственное исключение из правила: «Все ферменты – белки, но не все белки – ферменты».

Будучи белками по химической природе, каждый фермент имеет оптимум pH для проявления максимальной каталитической активности. Температурный оптимум ферментов, как правило, лежит в пределах узкого диапазона: от +30 до +40 °C. К универсальным свойствам ферментов относят: а) высокую субстратную специфичность и б) тонкую регуляцию активности с помощью различных активаторов и ингибиторов.

Ферменты могут быть простыми белками и сложными (двухкомпонентными): состоящими из апофермента и кофермента, совместно образующих холофермент, который, собственно, и обладает каталитической активностью. Особую категорию составляют аллостерические ферменты, имеющие субъединичную (олигомерную) структуру. Они выполняют роль регуляторов активности метаболических путей. Их активностью управляют специфические аллостерические регуляторы, с высоким сродством связывающиеся с аллостерическими центрами, которые пространственно отделены от каталитических (активных) центров фермента (по одному каталитическому центру на каждую субъединицу).

Многие из идентифицированных ферментов находятся в виде множественных молекулярных форм, называемых изоферментами. Изоферменты – генетически детерминированные молекулярные формы ферментов, которые катализуют одну и ту же реакцию, но отличаются по молекулярной массе, сродству к

субстрату (то есть по величине K_M), чувствительности к ингибиторам и активаторам, рН-оптимуму и другим признакам.

Ферментативный катализ позволяет снизить энергию активации для взаимодействующих биомолекул, что позволяет клеткам значительно повышать скорости биохимических превращений, избегая при этом фатального для них повышения температуры. Лимитирующим событием любой ферментативной реакции является образование фермент-субстратного комплекса, существование которого совпадает с достижением переходного состояния ферментативной реакции, в пределах которого происходит превращение субстрата в продукт.

В молекулярном механизме ферментативного катализа важная роль принадлежит принципу индуцированного соответствия, согласно которому под влиянием субстрата, с одной стороны, каталитический центр обратимо меняет свою конформацию и, с другой стороны, молекула субстрата подвергается определенной деформации. Ведущие роли в механизме ферментативного катализа принадлежат кислотно-основному катализу, ковалентному катализу и катализу ионами металлов.

В основу Международной классификации ферментов положен тип катализируемой реакции. Согласно ей, ферменты подразделяются на 6 классов:

- 1 класс – ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ;
- 2 класс – ТРАНСФЕРАЗЫ;
- 3 класс – ГИДРОЛАЗЫ;
- 4 класс – ЛИАЗЫ;
- 5 класс – ИЗОМЕРАЗЫ;
- 6 класс – ЛИГАЗЫ.

ЛЕКЦИЯ 5

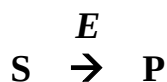
ТЕМА: ЗАКОНЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ. УРАВНЕНИЕ И ГРАФИК МИХАЭЛИСА — МЕНТЕН. ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

План лекции:

1. Основные законы ферментативной кинетики.
 2. Молекулярность и порядок реакции.
 3. Уравнение и график Михаэлиса — Ментен.
 4. Единицы активности ферментов.
 5. Линеаризация графика Михаэлиса — Ментен: графики Лайнуивера — Берка, Эди — Хофсти, график Эйзенталя и Корниш-Боуден.
 6. Двухсубстратные ферментативные реакции.
 7. Ингибиторы и активаторы неаллостерических ферментов.
 8. Классификация ингибиторов.
 9. Выявление типа обратимого ингибирования с использованием графика Лайнуивера — Берка.
 10. Графические методы определения константы ингибирования.
- Заключение

Основные законы ферментативной кинетики

В простейшей форме уравнение биохимической реакции, катализируемой ферментом, можно записать как:



где: **S** – субстрат реакции;

P – продукт реакции;

E – фермент, катализирующий реакцию.

В целом скорость биохимической реакции (**V**) выражает изменение количества субстрата, вступившего в реакцию (или количества продукта, образовавшегося в ходе реакции), за единицу времени. В общем виде скорость (**V**) ферментативной реакции можно описать уравнениями как через скорость потребления субстрата (**S**), так и через скорость образования продукта (**P**):

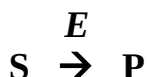
$$\text{a) } v = -\frac{d[S]}{dt} \qquad \text{б) } v = \frac{d[P]}{dt}$$

Знак «минус» в уравнении а) означает, что в ходе реакции субстрат расходуется и его концентрация уменьшается.

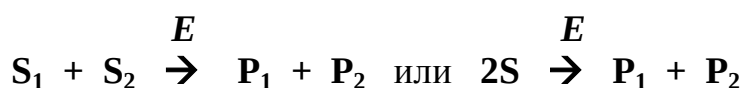
Существуют два способа классифицировать химические (биохимические) реакции:

1. Молекулярность реакции. Определение «молекулярность» исходит из числа молекул, которые должны взаимодействовать с образованием конечных продуктов. В соответствии с этим различают:

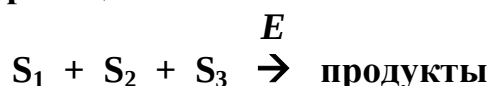
Мономолекулярные реакции (уномолекулярные реакции):



Бимолекулярные реакции:



Тримолекулярные реакции:



2. Порядок реакции. Способ классификации основан на кинетических характеристиках. Классификация учитывает, как скорость реакции зависит от концентрации реагирующих веществ. Порядок реакции определяется числом участников реакции, концентрации которых перемножаются в уравнении скорости реакции (согласно закону действующих масс). Можно дать альтернативное определение: порядком реакции называют степень, в которой концентрация данного компонента входит в уравнение реакции.

Реакции первого порядка. Это реакции, скорость которых прямо пропорциональна концентрации единственного субстрата, участвующего в ферментативной реакции. Уравнение реакции первого порядка имеет вид:



Если концентрацию S обозначить буквой a , то уравнение реакции первого порядка можно записать в виде:

$$V = - da/dt = - ka ,$$

где k – константа реакции первого порядка.

Константа скорости реакции (k), по сути, является поправочным коэффициентом, с помощью которого можно с максимальной точностью вычислить скорость реакции в данных условиях. Величина k не зависит от концентрации реагирующих молекул. Её величина определяется природой реагирующих

веществ, наличием или отсутствием катализатора, температурой, величиной рН, наличием или отсутствием регуляторов активности фермента (ингибиторов или активаторов), потребностью в различных ионах и другими факторами.

Константа реакции первого порядка имеет размерность с^{-1} . Размерность k легко вывести из уравнения:

$$V = ka$$

Тогда $k = V/a$. Подставим в формулу размерности скорости реакции (моль/л/с) и концентрации субстрата (моль/л). После сокращения получим:

$$k = \text{М} \cdot \text{с}^{-1} / \text{М} = \text{с}^{-1},$$

где М – моль $\cdot$ л $^{-1}$ (моль/л).

Реакции первого порядка в чистом виде встречаются сравнительно редко, поскольку описывают превращение одного вещества, например как при радио-активном распаде.

Реакции второго порядка. Большинство реакций относятся к реакциям второго порядка. К их числу относятся реакции, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ или второй степени концентрации двух одинаковых веществ, вступающих в реакцию.

В общем виде реакцию второго порядка можно представить как:



Если концентрации S_1 и S_2 обозначить соответственно буквами a и b , то уравнение реакции второго порядка можно записать в виде:

$$V = kab$$

В частном случае, когда взаимодействуют две одинаковых молекулы (a), уравнение реакции второго порядка примет вид:

$$V = ka^2,$$

где k – константа скорости реакции второго порядка с размерностью $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Размерность константы легко вывести, если использовать прием, описанный выше для константы реакции первого порядка.

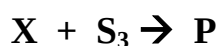
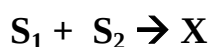
Следует помнить, что в случае существенной разницы в исходных концентрациях реагирующих веществ, например, когда $b \gg a$, уравнение скорости реакции второго порядка следует записать как:

$$V = k'a,$$

где k' – кажущаяся константа скорости реакции второго порядка.

В силу избытка вещества b , несмотря на уменьшение его концентрации в ходе реакции, исчерпание резерва вещества b в реакционной смеси не произойдет. В то же время лимитирующим фактором будет низкая исходная концентрация вещества a : в ходе реакции это вещество также расходуется, но его содержание в реакционной смеси будет стремиться к нулю. Иными словами, скорость реакции в этих условиях будет пропорциональна концентрации только одного из двух реагирующих веществ: в данном примере – концентрации вещества a . По этой причине уравнение скорости реакции выглядит как для реакции первого порядка.

Тримолекулярные реакции вида $S_1 + S_2 + S_3 \rightarrow P$, как правило, не протекают в одну стадию. Поэтому их нельзя отнести к реакциям третьего порядка. Такие реакции протекают в две стадии с образованием промежуточного соединения X :



Какая-то из двух реакций будет лимитирующей, то есть определять скорость всего процесса.

Реакции нулевого порядка. Скорость таких реакций не зависит от концентрации субстрата или субстратов. Иными словами, скорость реакции не зависит от концентрации всех участвующих в превращениях реагентов. Реакции нулевого порядка всегда относятся к ферментативным реакциям, для которых характерным является то, что каждый субстрат присутствует в избытке. Это обстоятельство позволяет ферменту обеспечивать максимальную скорость метаболических превращений.

Уравнение Михаэлиса — Ментен

Первые попытки описания законов ферментативной кинетики были сделаны **А. Брауном** и **В. Анри** в 1902 году. Эти авторы серьезно обосновали ключевую роль стадии образования фермент-субстратного комплекса. Однако их работы не достигли цели. На рубеже XIX и XX веков исследователями еще не была осознана принципиальная важность измерения начальной скорости ферментативной реакции, то есть скорости, наблюдаемой в течение первых 3-5 минут от её начала. Учет начальной скорости позволяет избегать влияния обратной реакции, которая оказывает все больший вклад на её поздних стадиях. Кроме этого, В. Анри в своих экспериментах использовал слабый буферный раствор, который не позволял создать *in vitro* оптимальные условия для протекания изучаемой ферментативной реакции. В итоге уравнение, которое было предложено В. Анри, не позволяло удовлетворительно описать все эмпирически полученные данные.



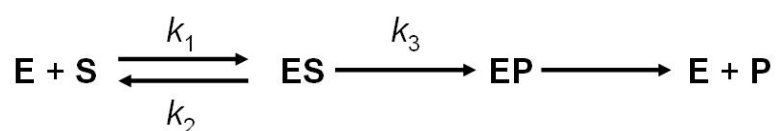
Leonor Michaelis
1875-1949



Maud Leonora Menten
1879-1960

Леонор Михаэлис и **Мод Ментен** в 1913 году представили уравнение ферментативной кинетики и соответствующий этому уравнению график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Впоследствии это уравнение стали называть «**уравнением Михаэлиса — Ментен**». Успех в решении этой проблемы был обусловлен тем, что авторы адекватно представляли все стадии ферментативной реакции, использовали оптимальную буферную систему, измеряя концентрацию ионов водорода в логарифмических единицах шкалы рН, которую в 1909 году предложил Сёренсен, и регистрировали начальную скорость ферментативной реакции при разных концентрациях субстрата.

Согласно представлениям Михаэлиса и Ментен, ферментативная реакция является равновесным процессом и состоит из следующих стадий:



Первая стадия ферментативной реакции (с константами k_1 и k_2) – равновесный процесс, следовательно скорость образования комплекса **ES** равна скорости его диссоциации. Эта стадия протекает быстро.

Константа диссоциации комплекса **ES** (субстратная константа, K_S) может быть выражена как $K_S = k_2 / k_1$.

Стадия реакции **ES** → **EP** (с константой k_3) – лимитирующая, то есть определяет скорость процесса в целом.

Судьба комплекса **ES** принципиальна, поскольку скорость всего процесса будет пропорциональна концентрации комплекса **[ES]**.

Уравнение скорости образования комплекса **ES**:

$$V = k_1 [\text{E}][\text{S}]$$

Уравнение скорости диссоциации комплекса **ES**:

$$V = k_2 + k_3 [ES]$$

Принципиально важен учет скоростей обеих реакций, определяющих концентрацию комплекса **ES**. Важно помнить, что судьба комплекса (**ES**) двойка: он может как диссоциировать на исходные компоненты (**S + E**), так и подвергаться дальнейшей трансформации, завершаясь превращением субстрата в продукт.

Стадия диссоциации продукта реакции и освобождения свободного фермента также протекает быстро.

При достижении равновесия, скорости прямой и обратной реакций будут равны. Тогда:

$$k_1[E][S] = k_2 + k_3 [ES]$$

Отсюда легко определить концентрацию комплекса **ES**:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3) / k_1}$$

где: $(k_2 + k_3) / k_1 = K_M$ – константа Михаэлиса с размерностью моль $\times$ л⁻¹ (моль/л).

Окончательная форма записи фундаментального уравнения ферментативной кинетики, или **уравнения Михаэлиса — Ментен** представлена ниже:

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

где: **v** – моментальная скорость при данной концентрации субстрата;
V_{max} – максимальная скорость, то есть когда все молекулы фермента в реакционной среде участвуют в катализе;
[S] – концентрация субстрата;
K_M – константа Михаэлиса.

Графически уравнение Михаэлиса — Ментен представляет собой гиперболическую кривую в координатах зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 45). Из графика следует:

1. При низкой концентрации субстрата (**S**) наблюдаемая скорость реакции (**v**) будет прямо пропорциональна концентрации субстрата. В этих условиях скорость реакции лимитируется этапом образования фермент-субстратного комплекса (**ES**). Таким образом, когда $[S] \ll K_M$, получаем реакцию первого порядка. Иными словами, если $[S] \ll K_M$, то знаменатель в уравнении

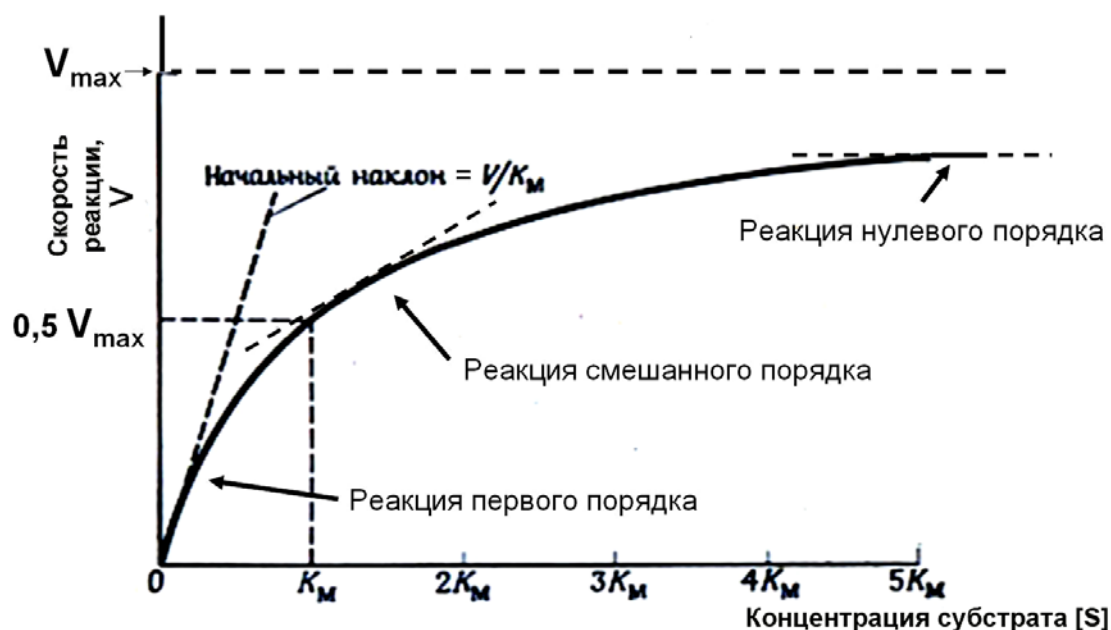


Рис. 45. График зависимости скорости ферментативной реакции (V) от концентрации субстрата $[S]$, описываемый уравнением Михаэлиса — Ментен

Михаэлиса — Ментен будет представлен K_M , так как величиной $[S]$ можно пренебречь. Тогда уравнение примет вид:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m}$$

Из уравнения следует, что при низких концентрациях субстрата (меньше K_M) наблюдаемая скорость прямо пропорциональна концентрации субстрата.

2. При концентрации субстрата, равной K_M ($[S] = K_M$), наблюдаемая скорость будет полумаксимальной ($0,5 V_{\max}$).

3. При концентрации субстрата, многократно превышающей величину K_M , наблюдаемая скорость будет соответствовать максимальной скорости. Иными словами, если $[S] \gg K_M$, то уравнение Михаэлиса — Ментен примет вид $v = V_{\max}$. Так, в уравнении Михаэлиса — Ментен в этих условиях величиной K_M можно пренебречь, а $[S]/[S] = 1$. Дальнейший рост концентрации субстрата не будет сопровождаться увеличением скорости реакции. Реакция будет иметь нулевой порядок. В этих условиях все молекулы фермента, присутствующие в инкубационной среде, находятся в форме комплекса ES , то есть фермент **насыщен субстратом**. Иными словами, достигается верхний предел скорости ферментативной реакции, поскольку концентрация комплекса ES максимальна. Схематично этот процесс представлен на рис. 46.

4. K_M обозначает концентрацию субстрата, при которой достигается полумаксимальная скорость реакции ($0,5 V_{\max}$).

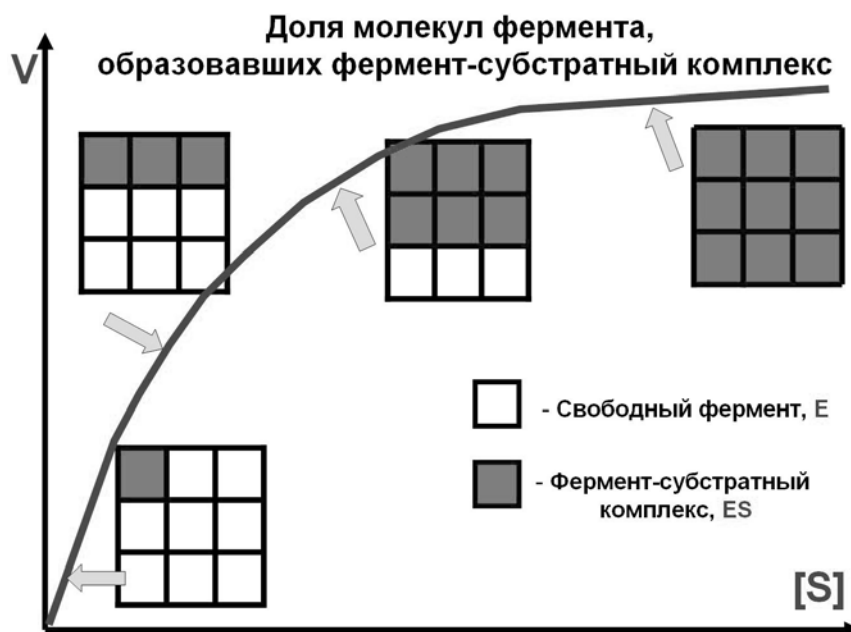


Рис. 46. Увеличение доли фермент-субстратных комплексов (ES) в инкубационной среде по мере нарастания концентрации субстрата

Количество молекул ферментов в среде инкубации постоянно. По мере увеличения концентрации субстрата всё большая доля ферментов существует в виде комплекса ES и скорость реакции нарастает. При насыщающей концентрации субстрата, когда все молекулы фермента образуют с ним комплекс, **система достигает своей максимальной производительности (максимальная концентрация комплекса ES)**. По этой причине дальнейший рост концентрации субстрата уже не может повлиять на скорость реакции, она становится постоянной и соответствует $V_{\max}$.

Значение K_M и $V_{\max}$ для энзимологической практики

- K_M – мера сродства субстрата к активному центру фермента и мера прочности связывания субстрата с центром. Чем выше сродство, тем меньше величина K_M и наоборот.
- Если фермент проявляет относительную субстратную специфичность, то для каждого из субстратов существует индивидуальное значение K_M .
- Величина K_M не зависит от концентрации фермента, поскольку константа характеризует индивидуальное биохимическое свойство каждой молекулы фермента. Следовательно, с одной стороны, сродство данного фермента к своему субстрату не может зависеть от количества (концентрации) молекул этого фермента, присутствующих в среде инкубации, и, с другой стороны, различное число молекул фермента не может изменить их индивидуальных биохимических характеристик (в том числе сродство каталитического центра к субстрату).
- Знание величины K_M позволяет корректно определить активность фермента *in vitro*. Активность фермента – это максимальная скорость, с которой фермент превращает субстрат в продукт. Известная величина K_M позволяет корректно рассчитать насыщающую концентрацию субстрата. Обычно насы-

шающая концентрация составляет 8–10 K_M . Это позволяет избежать занижение скорости реакции, если концентрация субстрата оказалась ниже насыщающей или если имеет место субстратное торможение по причине неоправданно высокой концентрации субстрата.

- V_{max} – характеристика активности фермента.
- V_{max} зависит от концентрации фермента: чем больше фермента, тем выше скорость, с которой фермент преобразует в продукт то количество субстрата, которое присутствует в инкубационной среде.
- V_{max} отражает ещё одну важную характеристику фермента: число оборотов фермента. **Число оборотов фермента** – количество молекул преобразованного субстрата в пересчете на 1 молекулу фермента за единицу времени (при условии насыщения фермента субстратом). Большинство ферментов имеет число оборотов около $1 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$. Абсолютный рекорд принадлежит ферменту *карбоангидразе*, число оборотов которой составляет $6 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$.

Единицы активности ферментов

Под активностью фермента подразумевают скорость, которую обеспечивает фермент в процессе потребления субстрата (или скорость образования продукта) в единицу времени. По сути, активность фермента – это максимальная скорость ферментативной реакции (V_{max}). Поэтому термины «**активность фермента**» и «**скорость ферментативной реакции**» идентичны.

В энзимологической практике используют три способа представления активности фермента:

1. Международная (интернациональная) единица активности. Обозначается символами «U» (от англ. *unit* – единица) или «ME» (международная единица). **1 U (1 ME)** – такая активность фермента, которая обеспечивает потребление 1 мкмоль субстрата (образование 1 мкмоль продукта) в 1 минуту. Размерность – **мкмоль/мин**.

2. Активность фермента в системе СИ. Носит название «**katal**»/«**катал**» (сокращенно **kat** или **кат**). **1 кат** – такая активность фермента, которая обеспечивает потребление 1 моля субстрата (образование 1 моля продукта) в 1 секунду. Размерность – **моль/с**.

1 кат – размерность чрезвычайно велика. Для удобства пользования используют представление активности фермента в меньших кратных значениях – в мккат или нкат ($1 \text{ нкат} = 10^{-9} \text{ кат}$). Между U и кат существует следующая зависимость: **1U = 16,67 нкат**.

3. Удельная активность фермента. Это активность фермента, выраженная в U (ME) или кат, пересчитанная на 1 мг белка, присутствующего в пробе. Энзимологическая практика показала, что только единицы удельной активности позволяют адекватно сопоставлять активность изучаемого фермента между «контролем» и «опытом» или сравнивать активность одного и того же фермента, присутствующего в различных органах и тканях.

Линеаризация графика Михаэлиса — Ментен для повышения точности определения K_M и V_{max}

Практика энзимологии свидетельствует о том, что в эксперименте, даже при концентрации субстрата, десятикратно превышающей K_M ($[S] = 10K_M$), наблюдаемая скорость ферментативной реакции часто составляет около 92 % от максимальной. В ряде случаев, вследствие ограничений в растворимости субстрата, невозможно приготовить его раствор достаточно высокой (насыщающей) концентрации. Эти обстоятельства затрудняют точное определение значений K_M и V_{max} непосредственно с помощью графика Михаэлиса — Ментен.

График Лайнуивера — Берка

В 1934 году Г. Лайнуивером и Д. Берком впервые был предложен способ линеаризации классического графика Михаэлиса — Ментен. Лайнуивер и Берк преобразовали уравнение Михаэлиса — Ментен следующим образом:

$$1/v = 1/V_{max} + K_M/V_{max} [S]$$

Этому преобразованию соответствует график зависимости $1/V$ от $1/S$, что позволило представить результаты в виде прямой. Поскольку график Михаэлиса — Ментен отражает зависимость V от S , то график Лайнуивера — Берка стали называть «график двойных обратных координат» (рис. 47):

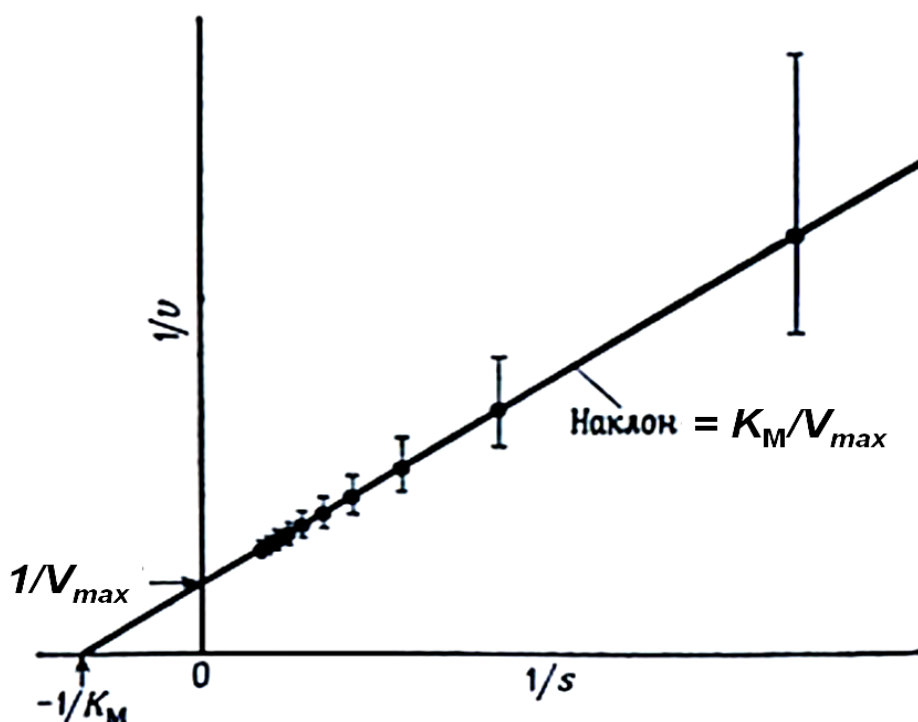


Рис. 47. График зависимости $1/v$ от $1/S$ — график Лайнуивера — Берка, или график двойных обратных координат

С помощью графика Лайнуивера — Берка (рис. 47) можно с достаточной точностью определить:

1. Величину K_M . Это точка пересечения линией графика оси «Х», точнее не самой линией, а её экстраполяцией, поскольку все точки, через которые проходит линия, расположены в пределах верхнего правого квадранта системы координат.
2. Величину $V_{\max}$. Это точка пересечения линией графика оси «Y».
3. Наклон линии графика по отношению к оси «Х» ($\tan$ угла наклона) равен отношению $K_M/V_{\max}$.

Следует помнить, что непосредственно по графику определяются числовые значения обратных величин $1/K_M$ и $1/V_{\max}$, которые следует пересчитать для получения абсолютных значений этих параметров.

График Эди — Хофсти (Иди — Хофсти)

Следующий способ линеаризации графика Михаэлиса — Ментен был предложен Дж. Эди и Б. Хофсти, которые разрабатывали математический аппарат для трансформации гиперболической кривой в прямую в период с 1942 по 1952 год. После преобразования уравнения Михаэлиса — Ментен, согласно Эдди — Хофсти, оно приобрело вид:

$$v = V_{\max} - K_M v/[S]$$

Данному уравнению соответствует график зависимости V от V/S (рис. 48):



Рис. 48. График зависимости V от V/S , или график Эди — Хофсти

С помощью этого графика (рис. 48) можно определить:

1. K_M — точка пересечения линией графика оси «Х», которая соответствует величине отношения $V_{\max}/K_M$.
2. $V_{\max}$ — точка пересечения линией графика оси «Y». Считывается абсолютное значение $V_{\max}$ (пересчета не требуется).

Преимуществом подхода по Эди — Хофсти является то, что предложенный ими график позволяет определить K_M и $V_{\max}$ с существенно большей точностью, чем с помощью графика Лайнуивера — Берка.

График Эйзенталя и Корниш-Боуден

В 1974 году Роберт Эйзенталь и Этель Корниш-Боуден предложили принципиально иной метод графического представления кинетики ферментативных реакций. Авторы преобразовали уравнение Михаэлиса — Ментен следующим образом:

$$V_{\max} = v + (v/S)K_M$$

Этой форме уравнения соответствует график зависимости $V_{\max}$ от K_M (рис. 49):

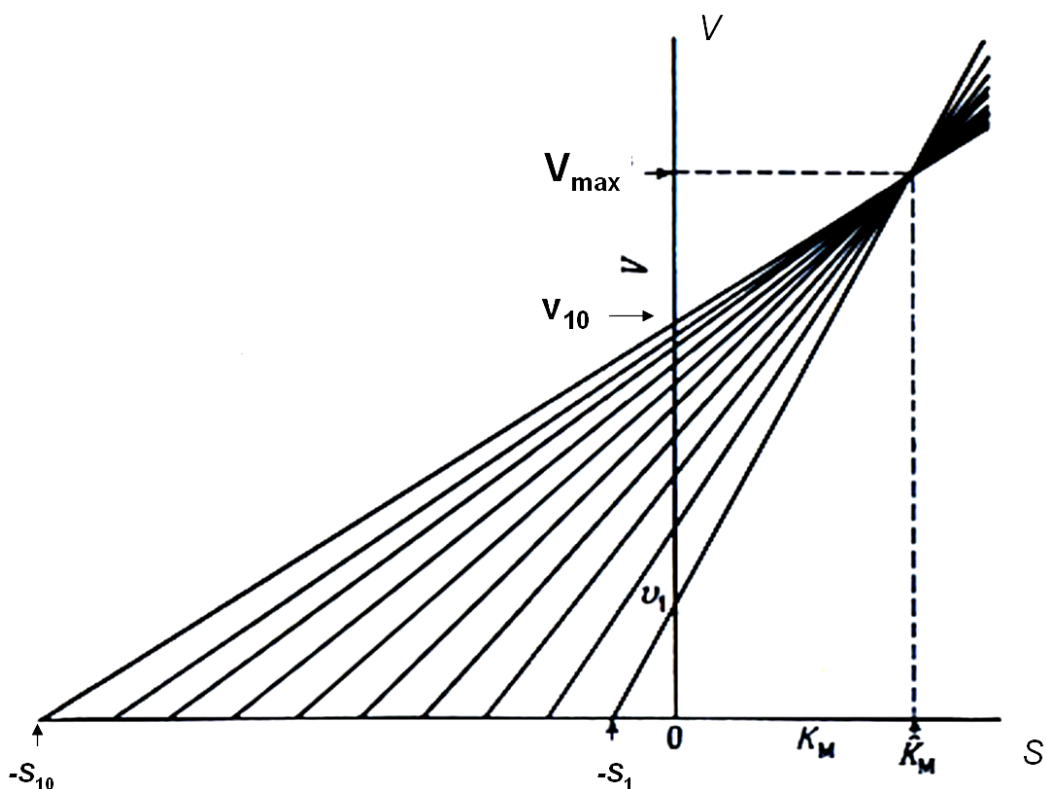


Рис. 49. График зависимости $V_{\max}$ от K_M — график Эйзенталя и Корниш-Боуден (или прямой линейный график)

Согласно подходу Эйзенталя и Корниш-Боуден, для любой пары значений S и V можно построить зависимость $V_{\max}$ от K_M . Эта зависимость представляет собой прямую с наклоном, равным v/S . Каждой паре значений S и v будет соответствовать своя линия (при том, что значения использованных концентраций

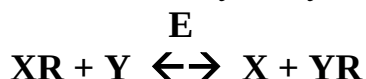
субстрата откладывают на оси «X» с отрицательными значениями). Все линии будут пересекаться в точке, лежащей в верхнем правом квадранте со значениями координат: по оси «Y» абсолютное значение $V_{\max}$ и по оси «X» абсолютное значение K_M .

Преимущество графика Эйзенталя и Корниш-Боуден состоит в том, что при достаточной точности определения $V_{\max}$ и K_M он не требует предварительных пересчетов, как это имеет место в случае графиков Лайнуивера — Берка и Эдди — Хофсти.

Двухсубстратные ферментативные реакции

Двухсубстратные ферментативные реакции – самый распространенный тип биохимических реакций, на долю которых приходится более 60% известных ферментативных реакций. Существенным отличием двухсубстратных реакций от реакций с участием одного субстрата является более сложная кинетика. Это обстоятельство часто выражается в отклонении от линейности на графике двойных обратных координат Лайнуивера — Берка.

Почти все двухсубстратные-двухпродуктные реакции формально представляют собой реакции **переноса группы**. В результате этого функциональная группа (**R**) переносится от одной молекулы субстрата (**X**) к другой молекуле (**Y**):



Двухсубстратные реакции протекают с образованием **двух видов промежуточных комплексов**:

1. **Тройной комплекс EXRY** содержит фермент (**E**) и оба субстрата (**XR** и **Y**).
2. **Замещенная форма фермента – ER**.

При этом субстраты связываются с ферментом в **произвольном порядке**.

Пример двухсубстратных-двухпродуктных реакций, идущих с образованием замещенной формы фермента, – реакции, катализируемые **аминотрансферазами** (механизм «пинг-понг»):



В процессе катализа происходит **обратимая модификация** кофермента. На определенном этапе в молекуле фермента (**E**) кофермент претерпевает обратимую химическую модификацию: образуется ковалентная связь переносимой аминокислоты в активном центре фермента (**E'**). В такой форме фермент приобретает способность взаимодействовать со второй молекулой субстрата (**S**₂).

Число вариантов протекания двухсубстратных реакций огромно. Примером описания механизма двухсубстратной ферментативной реакции может служить модель, предложенная У. Фердинандом. В рамках модели принимается:

1. Сродство S_1 к ферменту выше, чем у S_2 . С учетом произвольного принципа связывания субстратов с ферментом уравнение реакции можно записать следующим образом:



Схема всех формальных вариантов протекания реакций будет иметь вид (рис. 50):

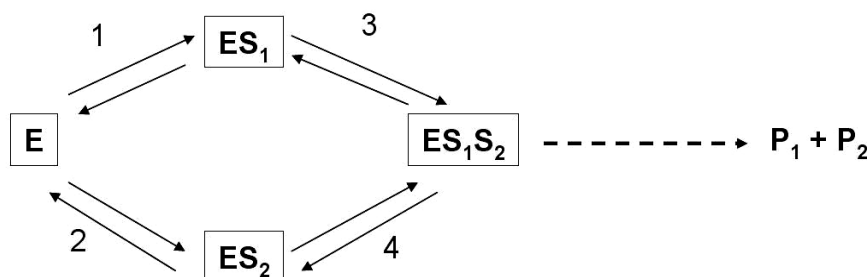


Рис. 50. Формальная схема путей протекания реакций с участием двух субстратов, имеющих разное сродство к ферменту

2. Поскольку в большинстве случаев *in vivo* оба субстрата реакции не только отличаются по сродству к каталитическому (активному) центру фермента, но и находятся в разных концентрациях, принимается, что S_2 изначально присутствует в большем количестве, чем S_1 . Следовательно, по ходу реакции концентрации S_2 изменяется незначительно: S_2 является невариабельным субстратом. В то же время принимается, что концентрация S_1 будет монотонно нарастать от неких исходно минимальных значений.

Согласно модели У. Фердинанда, события будут развиваться следующим образом. Первоначально будет формироваться комплекс ES_2 (поскольку $[ES_2] > [E]$), а при нарастании концентрации S_1 , начиная с низких значений, этот субстрат будет взаимодействовать с ES_2 с образованием тройного комплекса ES_1S_2 (медленный путь $2 \rightarrow 4$). Однако при достижении концентрации S_1 достаточно высокого значения все большее количество свободной формы фермента (E) будет взаимодействовать с S_1 (вследствие большего сродства к ферменту) и начнет увеличиваться концентрация комплекса ES_1 . Вследствие этого комплекс ES_2 диссоциирует ($ES_2 \leftrightarrow E + S_2$), и свободная форма фермента будет преимущественно взаимодействовать уже с S_1 и преобладать станет комплекс ES_1 . В итоге реакция пойдет с большой скоростью: путь $1 \rightarrow 3$. Таким образом, в рамках данной модели становится ясной причина отклонения от линейности на графике двойных обратных координат Лайнуивера — Берка. Это происходит вследствие существенного изменения скорости ферментативной реакции, которая обусловлена изменением соотношения концентрации субстратов, имеющих разное сродство к ферменту.

Ингибиторы и активаторы неаллостерических ферментов

Как было отмечено в предыдущей лекции, активность всех ферментов, в отличие от небиологических катализаторов, тонко регулируется. Поскольку у **аллостерических ферментов** механизмы регуляции активности имеют характерные особенности, эти вопросы будут рассмотрены отдельно в лекции 6. В настоящей лекции изложены вопросы регуляции активности **неаллостерических ферментов**, подчиняющихся кинетике Михаэлиса — Ментен.

Активаторы усиливают каталитическое действие фермента. К числу активаторов неаллостерических ферментов следует отнести **коферменты** (в отсутствие последнего сложный фермент теряет каталитическую активность) и ионы металлов. Металлы-активаторы облегчают образование фермент-субстратного комплекса, способствуют присоединению кофермента к апоферменту, обеспечивают становление четвертичной структуры фермента.

Ингибиторы ослабляют каталитическое действие фермента. В общем виде можно дать следующее определение ингибиторам. **Ингибиторы** – соединения, специфически снижающие активность фермента путем прямого или косвенного влияния на его каталитический (активный) центр. Под влиянием ингибитора активность фермента может существенно уменьшиться, но никогда не становится равной нулю. Последняя ситуация наблюдается в случае инактивации фермента (полная потеря каталитической активности). Таким образом, понятия **ингибитор фермента** и **инактиватор фермента** принципиально отличаются.

Ингибиторами могут быть как нормальные метаболиты, образующиеся в ходе жизнедеятельности, так и токсические соединения (природные или синтетические). Токсичность этих соединений обусловлена тем, что они тормозят активность ферментов, катализирующих важные метаболические превращения в организме.

Инактиваторы – комплекс химических, биологических, физических факторов, которые способны полностью или частично деструктурировать молекулу фермента. Под влиянием инактиваторов активность фермента становится равной нулю. К числу инактиваторов ферментов относят:

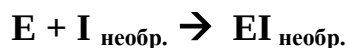
- экстремальные температуры;
- «жесткое» УФ излучение (обычно в диапазоне длин волн 200–300 нм);
- ультразвук высокой мощности;
- экстремальные значения pH;
- действие протеолитических ферментов;
- ионизирующую радиацию.

Классификация ингибиторов

Различают два основных типа ингибиторов:

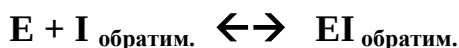
1. **Необратимые ингибиторы** (или «каталитические яды»). Они образуют прочные, обычно ковалентные связи с функциональными группами в активном центре молекулы фермента, необходимые для проявления его каталитической активности. Ковалентные связи образуются относительно медленно, и для проявления эффекта такого ингибитора требуется определенное время. Степень торможения работы фермента будет зависеть и от концентрации необратимого

ингибитора. Поскольку действие таких ингибиторов необратимо, в общем виде уравнение реакции можно представить как:



В результате образуется **непродуктивный** комплекс фермент-ингибитор.

2. **Обратимые ингибиторы** связываются с различными участками молекулы фермента, в том числе и за пределами каталитического (активного) центра. При этом образуются слабые связи подобно тем, которые имеют место при связывании субстрата с каталитическим центром фермента: образуются они быстро и так же быстро разрушаются. Следствием такого характера связывания является практически мгновенное действие обратимого ингибитора, а после удаления ингибитора – проявление ферментом его первоначальной активности. Поскольку обратимый ингибитор находится в равновесии с ферментом, то реакцию их взаимодействия следует представить как:



Степень торможения под влиянием обратимого ингибитора зависит от доли молекул фермента, связавшихся с ингибитором (комплекс фермент-ингибитор).

Обратимые ингибиторы по механизму действия подразделяются на **конкурентные, неконкурентные и бесконкурентные**.

Конкурентные (изостерические) ингибиторы (Ik). Связываются с активным центром фермента, конкурируя за этот центр с естественным субстратом вследствие высокого структурного сходства с ним. Из-за схожести (изос-) структуры молекул субстрата и ингибитора конкурентное ингибирование также называют «изостерическим ингибированием». Благодаря такому сходству конкурентному ингибитору удастся «обмануть» фермент и связаться с каталитическим (активным) центром. В отличие от субстрата, связавшийся с ферментом конкурентный ингибитор не подвергается ферментативному превращению. Связывание ингибитора происходит только со свободной формой фермента:



Если комплекс фермент-субстрат (**ES**) уже сформировался, то конкурентный ингибитор присоединиться к активному центру фермента уже не может. Данный вид ингибирования широко распространен.

Примерами **конкурентных ингибиторов** являются:

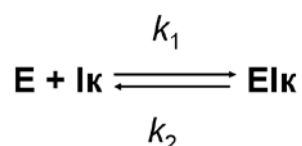
- **малоновая кислота** (структурный аналог янтарной кислоты) – ингибитор *сукцинатдегидрогеназы*;
- **сульфаниламид** (структурный аналог парааминобензойной кислоты) – ингибитор синтеза фолиевой кислоты, которая необходима для биосинтеза нуклеиновых кислот у микроорганизмов;
- **6-фосфоглюконат** замедляет катализ с участием *фосфоглюкозоизомеразы*;

- **прозерин, эндрофоний** – ингибиторы *холинэстеразы*;
- **ритонавир** – препарат из категории ингибиторов протеиназ, используемый для лечения вирусных инфекций.

Многие химиотерапевтические средства являются конкурентными ингибиторами.

Учитывая конкуренцию ингибитора и субстрата за один и тот же каталитический центр, а также обратимость процесса, очевидно, что степень проявления эффекта конкурентного ингибитора будет определяться не его абсолютной концентрацией, а **соотношением концентраций ингибитора и субстрата**. Отсюда следует также, что ослабить или снять действие конкурентного ингибитора можно путем увеличения концентрации субстрата.

Итак, связывание конкурентного ингибитора с активным центром фермента – обратимый процесс:



где k_1 и k_2 – константы скоростей реакций образования и диссоциации комплекса **EIk** соответственно.

Тогда константу ингибирования K_i для случая конкурентного ингибитора можно определить как:

$$K_i = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[\text{E}] [\text{Ik}]}{[\text{EIk}]}$$

Физический смысл константы ингибирования K_i состоит в том, что она обозначает концентрацию конкурентного ингибитора, при которой он связывается с половиной активных центров присутствующих ферментов, вызывая 50 %-торможение имеющейся скорости ферментативной реакции. Размерность K_i – моль/л.

По мере нарастания концентрации конкурентного ингибитора (при неизменной концентрации субстрата) больше будет величина отношения $[\text{I}]:[\text{S}]$ и проявление эффекта ингибитора будет нарастать.

По мере увеличения концентрации ингибитора $[\text{I}]$ (при неизменной концентрации субстрата) значение K_i будет уменьшаться. Причина этого состоит в том, что при каждом «шаге» концентрации ингибитора он будет занимать все большую часть активных центров. Для субстрата будет оставаться всё меньше свободных центров. Таким образом, для того чтобы вызвать 50 %-ингибирование оставшихся «работающих» центров, понадобится добавить меньшее количество ингибитора (его концентрация также будет меньше).

Поведение фермента под влиянием конкурентного ингибитора подчиняется закону ферментативной кинетики Михаэлиса — Ментен. Выявить факт кон-

курентного характера ингибирования фермента можно путем построения графика Лайнуивера — Берка, используя кинетические данные, измеренные в отсутствии и в присутствии ингибитора (рис. 51):

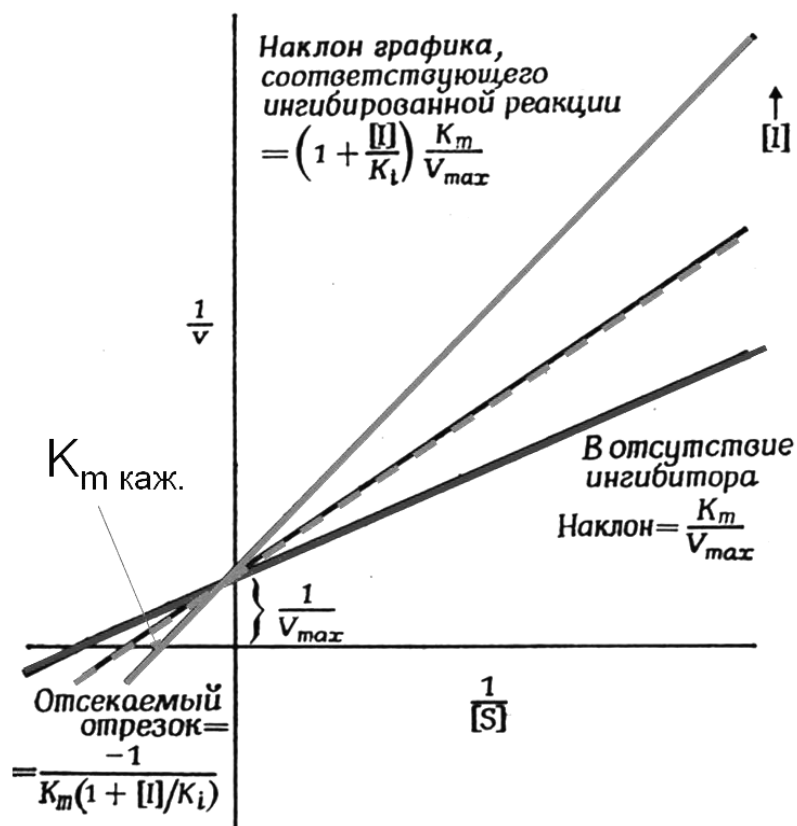


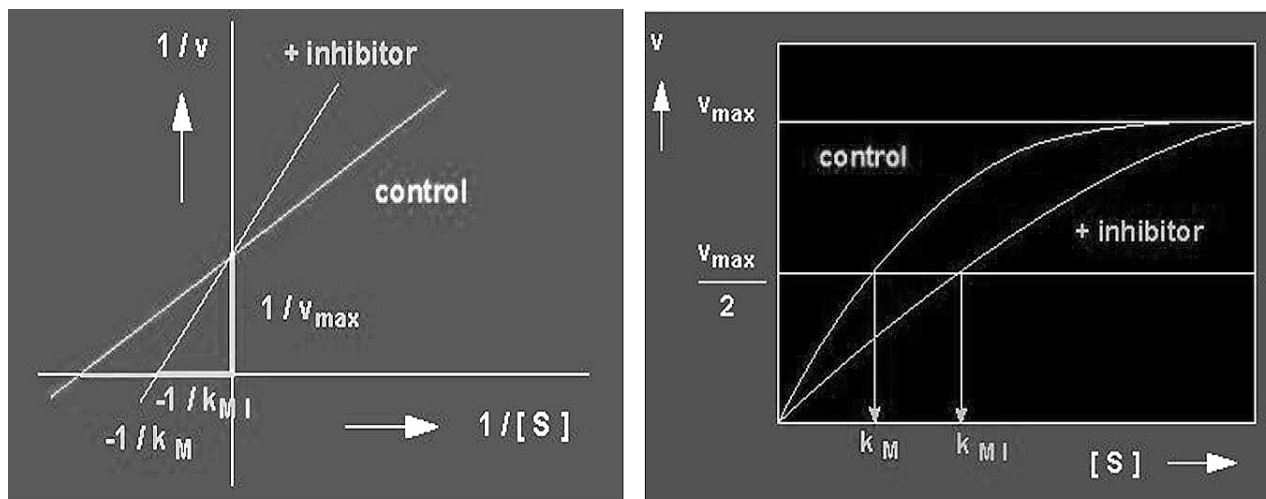
Рис. 51. Конкурентный тип ингибирования в координатах Лайнуивера — Берка

График построен на основе кинетических данных: различные концентрации субстрата $[S]$ в отсутствие и в присутствии двух разных концентраций ингибитора $[I]$.

Из графика следует, что конкурентный ингибитор не изменяет величину $V_{\max}$ (линии графиков пересекают ось «Y» в одной точке), но увеличивает значение K_M . По мере роста $[I]$ линии графика отсекают на оси «X» всё меньшие отрезки. Поскольку эта ветвь оси «X» несёт отрицательные значения, уменьшение длины отрезков будет соответствовать увеличению абсолютных значений K_M . K_M , определяемую в присутствии ингибитора, принято называть кажущейся константой: $K_{M \text{ каж.}}$. Увеличение этой константы в присутствии конкурентного ингибитора указывает на **снижение сродства каталитического центра к субстрату**. В основе этого явления лежит то, что при любой концентрации конкурентного ингибитора им будет занята часть каталитических центров, в то время как для субстрата число доступных (свободных) центров уменьшится. То есть не все молекулы фермента будут участвовать в реакции. Зная конечную концентрацию ингибитора и определив значения K_M и $K_{M \text{ каж.}}$, можно вычислить величину K_i по формуле:

$$K_i = \frac{[I]}{\left[\frac{K_{m \text{ каж.}}}{K_m} - 1 \right]}$$

На рис. 52 сопоставлены два типа графиков, демонстрирующих эффект конкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента:



Координаты Лайнуивера-Берка

Координаты Михаэлиса-Ментен

Рис. 52. Графическое представление эффекта конкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента

Неконкурентные ингибиторы (Инк). Они не обладают структурным сходством с субстратом и связываются не с активным центром фермента, а с другим участком молекулы фермента, **лежащим за пределами активного центра**. Такое связывание вызывает изменение конформации части молекулы фермента, которое распространяется и на активный центр. То есть конформация активного центра меняется **опосредованно**, что и приводит к уменьшению скорости реакции. Взаимодействие неконкурентного ингибитора с ферментом можно описать как:



Примерами неконкурентных ингибиторов являются:

- **формальдегид** и **хлормеркурибензоат**, которые замедляют реакцию, катализируемую **уропорфириноген-I-синтетазой**;
- **цианиды** связываются с гемовым железом **цитохромоксидазы**, что приводит к остановке клеточного дыхания.

Характерным для действия неконкурентного ингибитора является то, что он не оказывает влияния на процесс связывания субстрата с каталитическим

центром фермента. То есть ингибитор этого типа не уменьшает доли ферментов, связавшихся с субстратом, но **снижает число оборотов фермента, что неизбежно отражается на уменьшении $V_{\max}$.**

Уменьшить эффект неконкурентного ингибирования можно путем отмытия фермента от ингибитора.

Выявить факт неконкурентного характера ингибирования фермента можно путем построения графика Лайнуивера — Берка, используя принцип, изложенный выше (рис. 53):

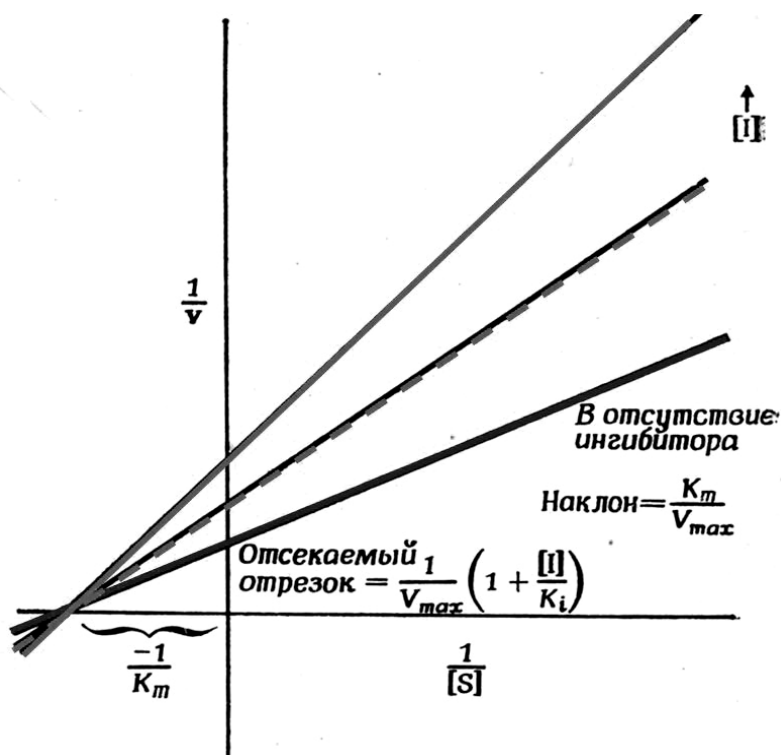
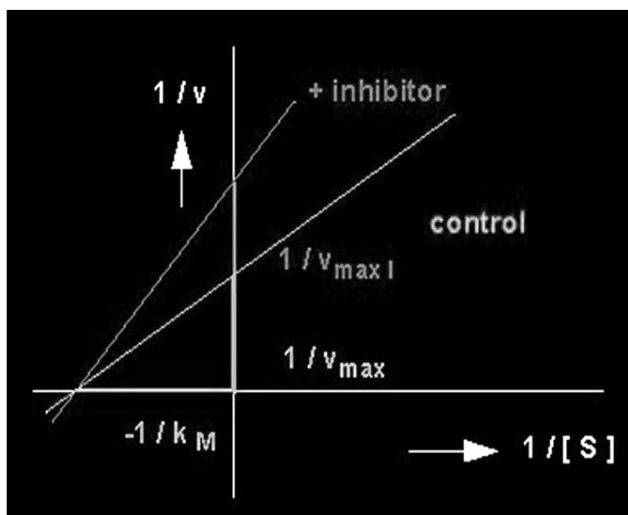


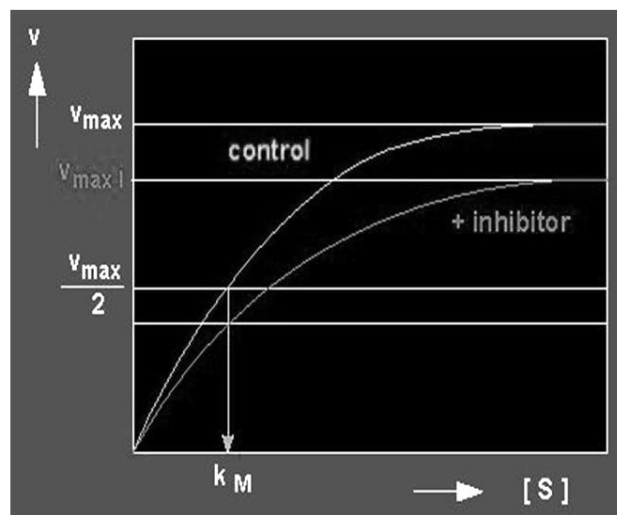
Рис. 53. Неконкурентный тип ингибирования в координатах Лайнуивера — Берка

Из графика следует, что неконкурентный ингибитор не изменяет величину K_M (линии графиков пересекают ось «X» в одной точке), но уменьшает значение $V_{\max}$ (линии графиков в присутствии ингибитора отсекают на оси «Y» большие отрезки, чем без ингибитора). На оси «Y» откладывают обратные величины измеренных скоростей, поэтому увеличение отрезков соответствует уменьшению $V_{\max}$. Константы K_M и $K_{M \text{ каж.}}$ остаются неизменными, поскольку неконкурентный ингибитор не влияет на связывание субстрата с каталитическим центром, то есть не изменяет его сродство к субстрату.

На рис. 54 сопоставлены два типа графиков, демонстрирующих эффект неконкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента:



Координаты Лайнуивера-Берка



Координаты Михаэлиса-Ментен

Рис. 54. Графическое представление эффекта неконкурентного ингибитора на каталитические свойства фермента

Бесконкурентные ингибиторы. Такие ингибиторы присоединяются только к уже существующему комплексу фермент-субстрат (ES). В отсутствие субстрата ингибитор не взаимодействует с ферментом. Причина состоит в том, что участок, предназначенный для связывания с бесконкурентным ингибитором, «открывается» в молекуле фермента (то есть становится доступен для бесконкурентного ингибитора) только после образования комплекса фермент-субстрат (ES).

Выявление бесконкурентного типа ингибирования путем построения графика Лайнуивера — Бэрка (рис. 55). Из графика следует, что линии, полученные в отсутствие и в присутствии бесконкурентного ингибитора расположены параллельно друг другу. Это означает, что значения K_M и V_{max} изменяются в одинаковой степени. Такой тип ингибирования для односубстратных ферментативных реакций встречается редко. Чаще такую картину получают при изучении многосубстратных ферментативных реакций, которые подчиняются механизмам типа «пинг-понг». Наряду с этим случаем, возможно и торможение (ингибирование) продуктом реакции, который может выступать в качестве бесконкурентного ингибитора.

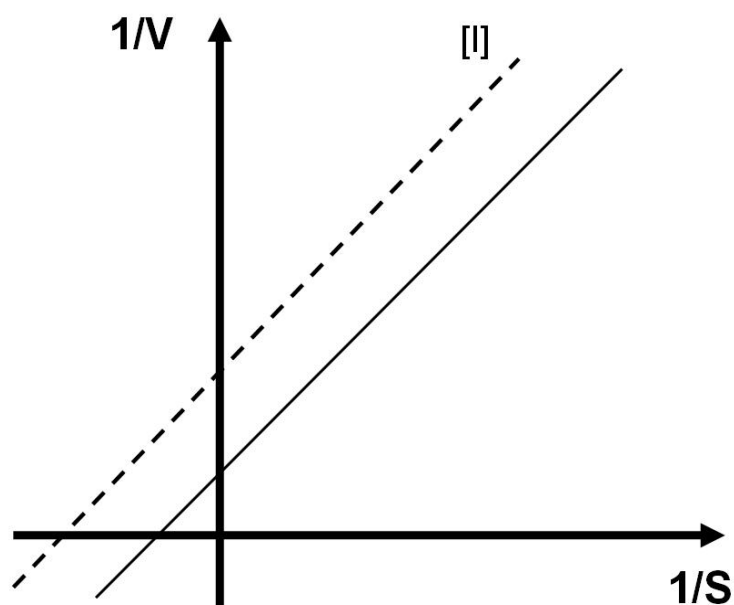


Рис. 55. Неконкурентный тип ингибирования в координатах Лайнуивера — Берка

Как частный случай бесконкурентного ингибирования, иногда рассматривают **ингибирование субстратом**, или **субстратное торможение**. В условиях существенного избытка субстрата (чрезвычайно высокая $[S]$) фермент может быть ингибирован в результате того, что в его активный центр, где должна связываться только одна молекула субстрата, встраиваются одновременно **две молекулы субстрата**. Образуется непродуктивный «ошибочный» комплекс **ESS** (вместо **ES**), и ферментативный катализ существенно замедляется (рис. 56):

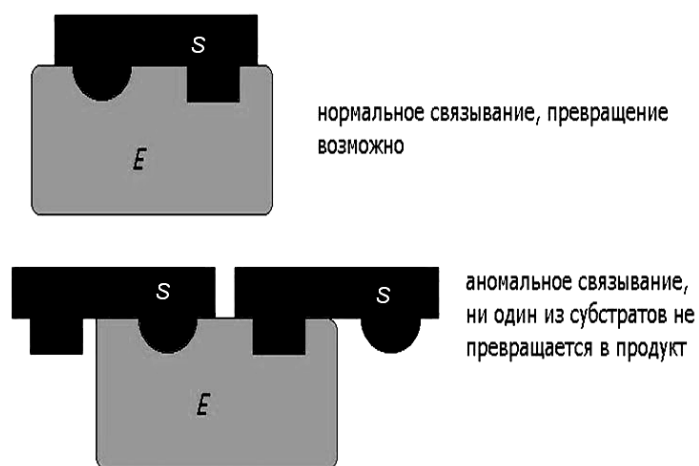


Рис. 56. Схема образования непродуктивного комплекса ESS при субстратном торможении

На рис. 57 представлен график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в случае проявления **субстратного торможения**.

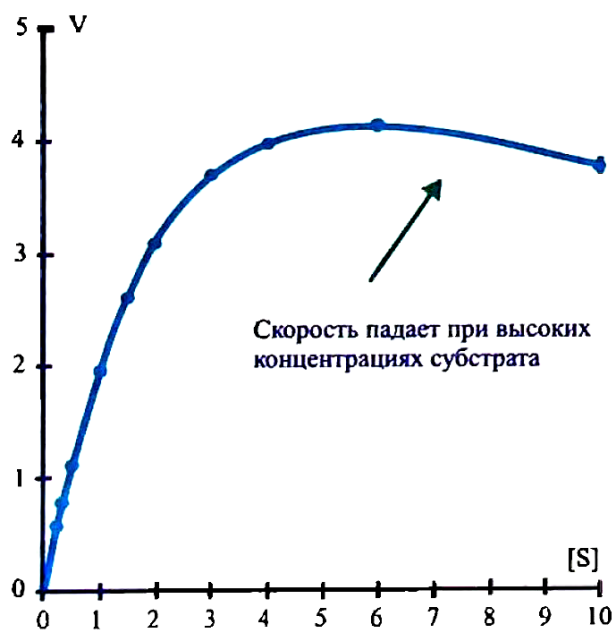


Рис. 57. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при субстратном торможении

Субстратное ингибирование можно снять путем уменьшения концентрации субстрата.

Графические методы определения константы ингибирования (K_i)

Точное определение значения K_i важно для решения биохимических и биотехнологических задач. Учитывая различия в механизмах проявления конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного типов ингибирования, были разработаны графические методы определения K_i (рис. 58):

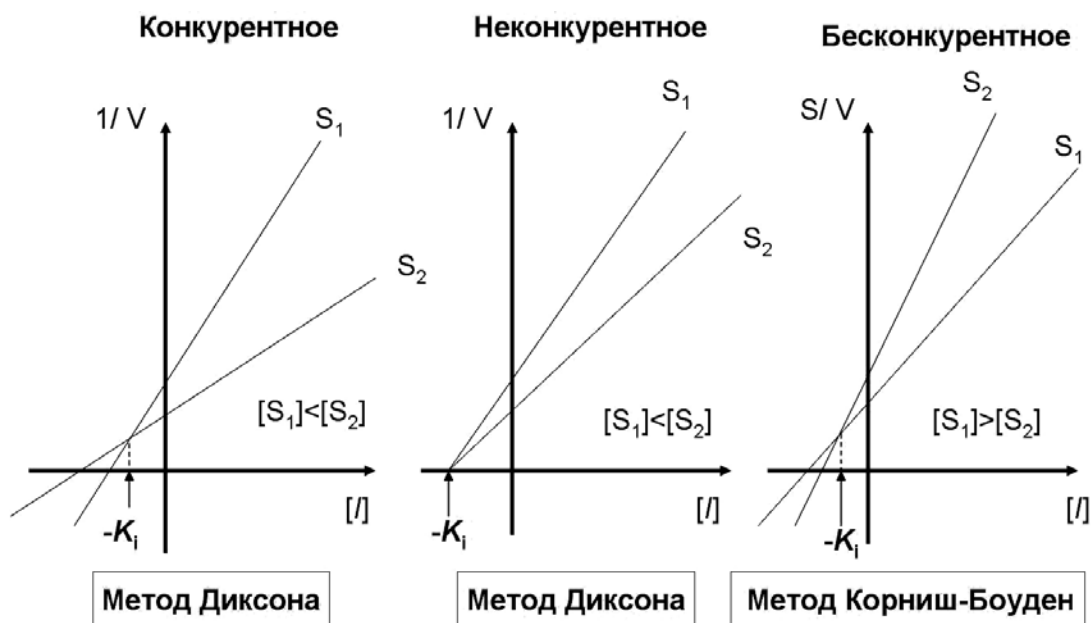


Рис. 58. Графические методы определения K_i

Для построения соответствующих графиков (рис. 58) ввели определение скорости ферментативной реакции в зависимости от концентрации ингибитора [I] при двух разных концентрациях субстрата [S]. Согласно методу Диксона, строят график в координатах $1/V$ от [I]. По методу Корниш-Боуден строят график в координатах S/V от [I]. Проекция точки пересечения линий графика на ось «X» даёт величину K_i .

Заключение

Существуют два способа классифицировать химические (биохимические) реакции:

1. Молекулярность реакции. Способ исходит из числа молекул, которые должны взаимодействовать с образованием конечных продуктов. Различают мономолекулярные реакции (уномолекулярные реакции), бимолекулярные реакции и тримолекулярные реакции.

2. Порядок реакции. Способ классификации основан на кинетических характеристиках: учитывается характер зависимости скорости реакции от концентрации реагирующих веществ. Порядок реакции определяется числом участников реакции, концентрации которых перемножаются в уравнении скорости реакции (согласно закону действующих масс). Различают:

- Реакции первого порядка, чья скорость прямо пропорциональна концентрации единственного субстрата, участвующего в ферментативной реакции.
- Реакции второго порядка, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ или второй степени концентрации двух одинаковых веществ, вступающих в реакцию.
- Тримолекулярные реакции ($S_1 + S_2 + S_3 \rightarrow P$) идут в две стадии с образованием промежуточного соединения, что не позволяет отнести их к реакциям третьего порядка.
- Реакции нулевого порядка, скорость которых не зависит от концентрации субстрата. Эти реакции относятся к ферментативным реакциям, для которых характерным является то, что субстрат присутствует в избытке. В таких условиях все молекулы фермента находятся в составе фермент-субстратного комплекса, что позволяет ферменту обеспечивать максимальную скорость метаболических превращений.

В 1913 году Л. Михаэлис и М. Ментен представили уравнение ферментативной кинетики и соответствующий этому уравнению график, который представляет собой гиперболическую кривую в координатах зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Их разработка позволила определять две фундаментальные характеристики любого фермента: сродство фермента к субстрату (константа Михаэлиса, K_M) и максимальную скорость (V_{max}), которая и характеризует активность фермента в данных условиях. Позже для повышения точности определения K_M и V_{max} были предложены способы линеаризации графика Михаэлиса — Ментен. В 1934 году Г. Лайнуивер и Д. Берк представили линейный график зависимости $1/V$ от $1/S$, который получил название «график двойных обратных координат». Следующий способ был предложен Дж. Эди и Б. Хофсти в период с 1942 по 1952 год. Их уравнению соответствовал график

зависимости V от V/S . Преимуществом подхода Эди — Хофсти является определение K_M и V_{max} с существенно большей точностью, чем с помощью графика Лайнуивера — Берка. В 1974 году Р. Эйзенталь и Э. Корниш-Боуден предложили принципиально иной метод графического представления кинетики ферментативных реакций. Их преобразованию уравнения Михаэлиса — Ментен соответствует график зависимости V_{max} от K_M . Преимущество графика Эйзенталя и Корниш-Боуден в том, что он не требует пересчетов, как это имеет место в случае графиков Лайнуивера — Берка и Эди — Хофсти, и не уступает по точности способу Эди — Хофсти.

Двухсубстратные ферментативные реакции – самый распространенный тип биохимических реакций. Почти все двухсубстратные-двухпродуктные реакции представляют собой реакцию переноса химической группы от одной молекулы субстрата к другой молекуле (например, реакции трансаминирования). Удовлетворительно описать механизм двухсубстратной ферментативной реакции может модель, предложенная У. Фердинандом.

Активаторы усиливают каталитическое действие фермента. К их числу относят коферменты и ионы металлов. Ингибиторы ослабляют каталитическое действие фермента. Ингибиторы – соединения, специфически снижающие активность фермента путем прямого или косвенного влияния на его каталитический (активный) центр. Между понятиями «ингибитор фермента» и «инактиватор фермента» существует принципиальное отличие.

Ингибиторы делят на необратимые и обратимые. Первые образуют прочные ковалентные связи с функциональными группами в активном центре фермента. Вторые связываются с различными участками молекулы фермента, образуя слабые нековалентные связи, которые быстро образуются и разрушаются.

Обратимые ингибиторы, в свою очередь, подразделяются на конкурентные, неконкурентные и бесконкурентные. Поведение фермента в присутствии обратимых ингибиторов подчиняется закону ферментативной кинетики Михаэлиса — Ментен. Выявить характер ингибитора можно путем построения графика Лайнуивера — Берка, используя кинетические данные, измеренные в отсутствие и в присутствии изучаемого ингибитора. Конкурентные ингибиторы связываются с активным центром фермента, конкурируя за центр с естественным субстратом, вследствие высокого структурного сходства с ним. Конкурентный ингибитор не изменяет величину V_{max} , но увеличивает значение K_M , что указывает на уменьшение сродства активного центра фермента к субстрату.

Неконкурентные ингибиторы не обладают структурным сходством с субстратом и связываются с участком молекулы фермента, лежащим за пределами активного центра. Такое связывание вызывает изменение конформации части молекулы фермента, которое распространяется и на активный центр. Неконкурентный ингибитор не изменяет величину K_M , но уменьшает значение V_{max} .

Бесконкурентные ингибиторы присоединяются только к уже существующему комплексу фермент-субстрат (ES). В отсутствие субстрата ингибитор не взаимодействует со свободным ферментом. Причина состоит в том, что участок в молекуле фермента, предназначенный для связывания с бесконкурентным ингибитором, «открывается» только после образования комплекса фермент-

субстрат (ES). Линии на графике Лайнуивера — Берка, полученные в отсутствие и в присутствии бесконкурентного ингибитора расположены параллельно друг другу. Это означает, что величины K_M и V_{max} изменяются в одинаковой степени.

ЛЕКЦИЯ 6

ТЕМА: ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И КИНЕТИКИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

План лекции:

1. Молекулярная структура аллостерических ферментов.
2. Аллостерические регуляторы и механизм их действия.
3. Кинетика аллостерических ферментов.
4. Явление кооперативности в функционировании аллостерических белков.
5. Влияние аллостерических регуляторов на проявление кооперативности.
6. Уравнение и график А. Хилла как средство количественной оценки степени проявления кооперативности.
7. Модели кинетики аллостерических ферментов.
8. Физиологическое значение «сигмовидной кинетики».

Заключение

Аллостерические ферменты образуют особую и весьма многочисленную категорию ферментов, которые выполняют функцию регуляции активности метаболических путей. Любой метаболический путь обязательно содержит несколько регуляторных ферментов. В связи с этим аллостерические ферменты называют также «регуляторными», или «ключевыми» ферментами («key enzymes»).

Функционирование аллостерических ферментов имеет две уникальные особенности:

а) зависимость скорости катализируемой ими реакции от концентрации субстрата не подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен;

б) аллостерические ферменты, в отличие от неаллостерических ферментов, чью кинетику описывает уравнение Михаэлиса — Ментен, способны кратно ускорять или замедлять катализируемые биохимические превращения.

Именно эта особенность определяет способность аллостерических ферментов влиять на активность целого метаболического пути. Следует помнить о том, что регуляция подразумевает как усиление (активацию) процесса, так и его подавление (ингибирование). Каталитические свойства неаллостерических ферментов (подчиняются кинетике Михаэлиса — Ментен) в основном регулируются ингибиторами и активирующими факторами различной природы, механизмы действия которых были подробно рассмотрены в предыдущей лекции (лекция 5).

История развития представлений об аллостерических ферментах началась в 1955 году с работы Р. Робертса. Позже к изучению проблемы присоединились другие исследователи: Г. Амбуржье, Дж. Герхард, А. Парди, Д. Моно, Ж.-П. Шанжэ и Ф. Жакоб – работы которых охватили период времени до 1963 го-

да. Р. Робертс обнаружил у микроорганизмов феномен ингибирования биосинтетических путей конечным продуктом. При этом продукт всегда ингибировал самый первый фермент пути биосинтеза, не влияя на активность остальных ферментов. Такой тип ингибирования стали называть «ингибированием конечным продуктом», «ингибированием по принципу отрицательной обратной связи», или «ретроингибированием». Эта находка дала стимул для появления аллостерической теории, в разработку которой основной вклад был сделан Д. Моно, Ж.-П. Шанжё и Ф. Жакобом. Впоследствии было установлено, что ретроингибирование – один из самых распространенных типов аллостерической регуляции в биосистемах. Аллостерическая регуляция – один из наиболее распространенных видов быстрой (срочной) регуляции активности ферментов.

Молекулярная структура аллостерических ферментов.

Молекула аллостерических ферментов имеет четвертичную структуру: состоит из нескольких субъединиц – протомеров. Субъединичное (олигомерное) строение аллостерических ферментов лежит в основе феномена их «десенсibilизации», который можно воспроизвести *in vitro*. Так, в мягких денатурирующих условиях аллостерические ферменты теряют чувствительность к аллостерическим регуляторам при том, что каталитическая активность изменяется незначительно. Было установлено, что «десенсibilизация» вызывается диссоциацией нативного олигомерного фермента на составляющие его субъединицы (протомеры).

Каждая субъединица в составе аллостерического фермента (рис. 59), помимо каталитического (активного) центра, содержит один или несколько

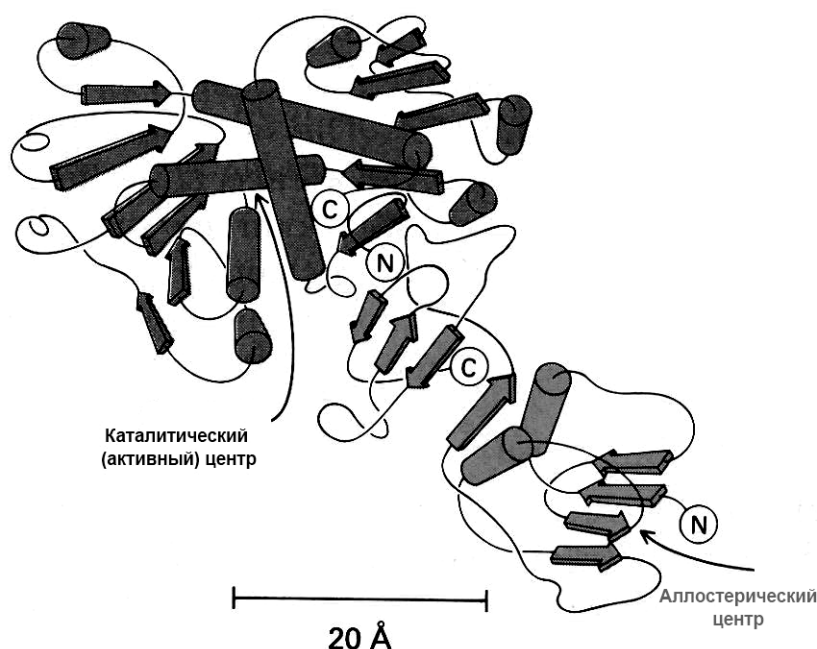


Рис. 59. Схема строения одной из субъединиц аллостерического фермента, содержащей пространственно разделенные каталитический (активный) центр и аллостерический центр, который предназначен для связывания аллостерического регулятора

дополнительных центров, которые **пространственно отделены** от каталитического центра. Эти центры называются **регуляторными центрами** и предназначены для связывания **аллостерических регуляторов (модуляторов)**, которые подразделяются на **активаторы и ингибиторы**. Отсюда второе название этих центров – **аллостерические центры**.

Таким образом, каждая молекула аллостерического фермента имеет несколько (по числу субъединиц) каталитических (активных) центров и несколько разных аллостерических центров для специфического связывания с аллостерическими активаторами и ингибиторами.

Аллостерические регуляторы – обширная группа разнообразных по химическому строению, в основном низкомолекулярных, биомолекул, которые действуют в сравнительно низких концентрациях. Часть из них является промежуточными метаболитами различных путей обмена. В силу пространственного разделения активного и аллостерического центров субстрат и аллостерический регулятор никогда не конкурируют за каталитический (активный) центр фермента. Общими свойствами аллостерических регуляторов является то, что:

1. Они не обладают явным структурным сходством с субстратом. Это обстоятельство послужило основанием для появления термина **аллостерический**, от «**аллос**» (греч.) – другой, иной и «**стерео**» (греч.) – пространственный.
2. Каждый аллостерический регулятор имеет индивидуальный участок связывания (аллостерический центр) в составе молекулы фермента, который с высоким сродством и специфичностью связывает предназначенный для него аллостерический регулятор.
3. Связывание аллостерического регулятора с аллостерическим центром всегда обратимо.

Примеры аллостерических регуляторов (модуляторов)

Конечный эффект на регуляторный фермент определяется комплексом сложных аллостерических взаимодействий, оказываемых несколькими модуляторами. В результате этого скорость реакции, катализируемой аллостерическим ферментом, может изменяться в сотни раз.

Адениновые нуклеотиды как аллостерические регуляторы:

- **АМФ** – в скелетных мышцах активатор **гликогенфосфорилазы *b***, что способствует увеличению доли высокоактивной **гликогенфосфорилазы *a***. Концентрация **АМФ** в мышцах возрастает при их усиленном сокращении в результате распада **АТФ**. **АТФ** действует как отрицательный модулятор. В покое мышце почти все молекулы **гликогенфосфорилазы** находятся в неактивной ***b***-форме, поскольку в этом функциональном состоянии мышцы внутриклеточная концентрация **АТФ** гораздо выше, чем **АМФ**. Иными словами, интенсивность расщепления гликогена в мышцах определяется соотношением концентраций **АМФ** и **АТФ**.

- **АДФ** и **АМФ** – основные активаторы, а **АТФ** – основной ингибитор мышечной **фосфофруктокиназы-1 (ФФК-1)** – первого из двух главных регуляторных ферментов гликолиза. При интенсивном мышечном сокращении в миоцитах снижается концентрация **АТФ** и повышаются концентрации **АДФ** и

АМФ, что приводит к активации **ФФК-1**. Активация фермента происходит даже при сравнительно низкой концентрации субстрата фермента – фруктозо-6-фосфата. Это позволяет мышцам удовлетворить возросшую потребность в энергии. В условиях мышечного покоя баланс между адениновыми нуклеотидами смещается в пользу **АТФ**, что вызывает снижение сродства **ФФК-1** к фруктозо-6-фосфату. Благодаря этому фермент будет активен лишь при сравнительно высокой концентрации фруктозо-6-фосфата.

- **АТФ** – ингибитор **пируваткиназы** – второго из двух главных регуляторных ферментов гликолиза. Повышение концентрации **АТФ** существенно снижает сродство **пируваткиназы** к её субстрату – фосфоенолпирувату (ФЕП), что обуславливает низкую скорость превращения ФЕП в этих условиях. При понижении концентрации **АТФ** сродство **пируваткиназы** к субстрату возрастает настолько, что высокая активность фермента имеет место при относительно низкой концентрации ФЕП.

Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации **АТФ** (высокое соотношение концентраций **АТФ** к **АДФ** и **АМФ**), что характерно для состояния полного обеспечения клетки метаболически доступной энергией, приводит к торможению гликолиза на уровне его двух регуляторных ферментов.

Аллостерические регуляторы – метаболиты:

- **Фруктозо-1,6-дифосфат** – основной активатор мышечной **ФФК-1**.
- **Цитрат** – один из промежуточных метаболитов цикла Кребса, ингибитор мышечной **ФФК-1**, действующий синергично с высокими концентрациями **АТФ**.

- **Фруктозо-2,6-бисфосфат** – активатор **ФФК-1** (гликолиз) и одновременно ингибитор **фруктозобисфосфатазы-1**, которая катализирует реакцию глюконеогенеза, «обходящую» фосфофруктокиназную реакцию гликолиза. Повышение внутриклеточной концентрации **фруктозо-2,6-бисфосфата** активирует гликолиз и тормозит глюконеогенез.

- **Ацетил-КоА** и **длинноцепочечные незэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК)** – ингибиторы **пируваткиназы**. Повышение их концентрации в клетке приводит к ингибированию гликолиза. Эти соединения также являются ингибиторами активности **пируватдегидрогеназного комплекса**, который наряду с **цитратсинтазой** и **изоцитратдегидрогеназой** определяет скорость ЦТК.

- **Сукцинил-КоА** – метаболит ЦТК, является ингибитором **цитратсинтазы** – ключевого фермента, определяющего скорость ЦТК.

- **Малонил-КоА** – ингибитор **карнитинацилтрансферазы-I**. **Малонил-КоА** является первым промежуточным продуктом биосинтеза жирных кислот, протекающего в цитозоле. В условиях стимуляции синтеза липидов концентрация **малонил-КоА** в цитоплазме повышается. Происходит подавление окисления жирных кислот в митохондриях (β -окисление). Неактивная **карнитинацилтрансфераза-I** теряет способность катализировать образование из **КоА-эфиров** длинноцепочечных жирных кислот их карнитиновых эфиров. В резуль-

тате прекращается доставка длинноцепочечных жирных кислот через мембрану митохондрий к месту окисления.

- **Глюкоза** – ингибитор *гликогенфосфорилазы*: стимулирует переход активной *a-формы* в неактивную *b-форму*. Эффект проявляется при гипергликемии.

- **Глюкозо-6-фосфат** – активатор *фосфопротеинфосфатазы-1 (PP1)*. В печени и мышцах стимулирует синтез гликогена. В мышцах **глюкозо-6-фосфат** – ингибитор гликолитической *гексокиназы*. Печеночная *глюкокиназа* не чувствительна к повышению концентрации **глюкозо-6-фосфата**.

- **Комплекс Ca^{2+} -кальмодулин** – активатор *киназы гликогенфосфорилазы* в мышцах: активная киназа обеспечивает переход *гликогенфосфорилазы* из неактивной *b-формы* в активную *a-форму*.

- **Ксилулозо-5-фосфат** – активатор *фосфопротеинфосфатазы-2A (PP2A)* в печени. *PP2A* последовательно дефосфорилирует транскрипционный фактор *CHREBP*, что необходимо для его проникновения из цитоплазмы в ядро и активации синтеза ферментов *пируваткиназы*, *ацетил-КоА-карбоксилазы* и *синтазы жирных кислот*. Благодаря регуляторному эффекту **ксилулозо-5-фосфата**, в условиях повышенного потока глюкозы в печень (углеводная диета) происходит усиление синтеза жирных кислот – трансформирование избыточных пищевых углеводов в жир.

Механизм действия аллостерических регуляторов

Механизм эффекта аллостерического регулятора состоит в том, что он связывается с аллостерическим центром и вызывает изменение конформации фермента, охватывающее и его каталитический (активный) центр. В результате в нём происходит специфическое изменение пространственного взаимоположения соответствующих остатков аминокислот, что сопровождается либо увеличением (активацией), либо уменьшением (ингибированием) активности аллостерического фермента. Иными словами, аллостерические регуляторы воздействуют на каталитический (активный) центр **опосредованно**.

Все аллостерические ферменты подразделяют на две группы – **гомотропные** и **гетеротропные** ферменты:

1. **Гомотропные аллостерические ферменты.** Содержат аллостерический центр, способный связывать молекулу субстрата. При этом данная молекула субстрата не подвергается каталитическому превращению, но действует как регулятор, чаще всего как активатор фермента: стимулирует превращение тех молекул субстрата, которые связались с каталитическим (активным) центром.

2. **Гетеротропные аллостерические ферменты.** Это «классические» аллостерические ферменты: их активность регулируется исключительно аллостерическими активаторами и ингибиторами, взаимодействующими с высоким сродством со специфическими аллостерическими центрами. Аллостерические регуляторы не являются субстратами.

Кинетика аллостерических ферментов

Для аллостерических ферментов кривая графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата не соответствует классической гиперболической кривой по Михаэлису — Ментен: линия графика в системе координат

«скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата» представляет собой **сигмовидную кривую** или **S-образную кривую** (рис. 60):

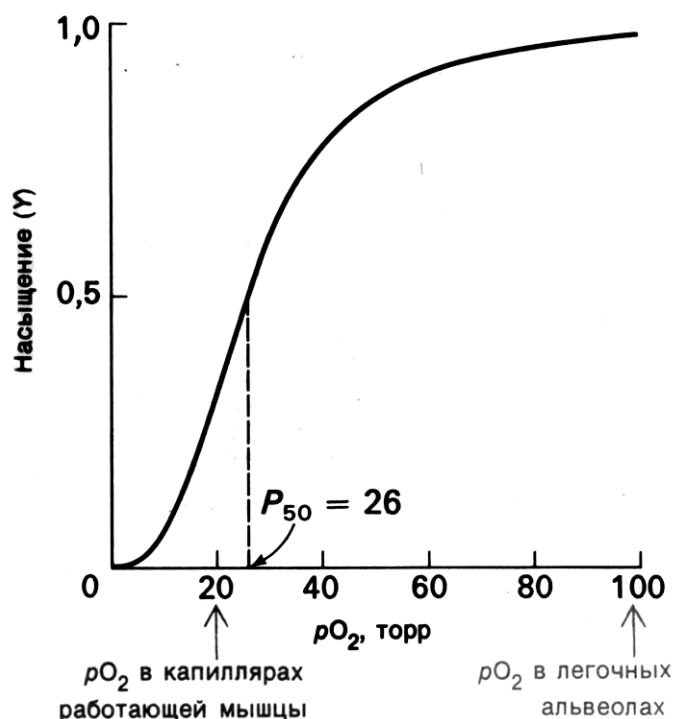


Рис. 60. Кривая насыщения гемоглобина кислородом в зависимости от его парциального давления в растворе

Степень насыщения участков, связывающих кислород (Y), показана как функция парциального давления O₂ (pO₂) в растворе. Кривая зависимости имеет типичную сигмовидную форму. Параметр **P₅₀** характеризует сродство к O₂: это парциальное давление, при котором насыщены 50 % (половина) участков связывания (степень насыщения Y=0,5).

Сигмовидный характер кривой указывает на то, что, во-первых, в каждой молекуле фермента имеется более одного каталитического (активного) центра, к которому может присоединяться субстрат, и, во-вторых, связывание первой молекулы субстрата с ферментом способствует облегчению связывания следующей молекулы субстрата, что нелинейно повышает активность фермента.

В 1963 году для объяснения феномена S-образной кривой была привлечена концепция **кооперативного взаимодействия центров связывания в молекуле аллостерического белка**. Концепция была сформулирована по результатам изучения зависимости количества кислорода, связанного с гемоглобином, от парциального давления кислорода, которая описывалась сигмовидной кривой. Впервые это явление зарегистрировал Кристиан Бор в 1904 году (рис. 60).

Следует подчеркнуть, что в 1904 году была известна только функция гемоглобина как белка эритроцитов, транспортирующего кислород из лёгких к

клеткам. Олигомерная структура молекулы гемоглобина (четыре протомера: 2α и 2β -субъединицы) была установлена лишь в начале 30-х годов.

Принцип кооперативности в процессе связывания кислорода с гемоглобином можно проиллюстрировать схемой, учитывающей субъединичное строение его молекулы (рис. 61):

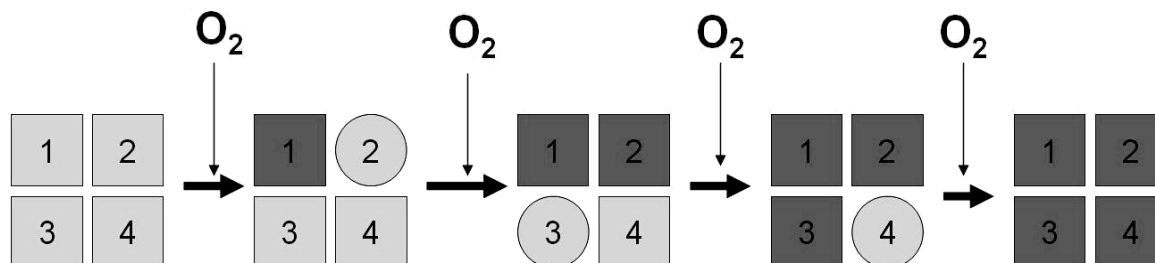


Рис. 61. Схема проявления принципа кооперативности в процессе насыщения кислородом молекулы гемоглобина

Квадратами обозначены субъединицы молекулы гемоглобина. Светлые квадраты – субъединицы не связаны с кислородом, темные квадраты – субъединицы, которые присоединили молекулу кислорода. Смена формы квадрата на круг обозначает изменение конформации субъединицы, приводящее к повышению сродства участка связывания к кислороду.

Из схемы на рис. 61 следует:

1. Каждая из 4-х молекул O_2 связывается с субъединицами гемоглобина в последовательности (слева направо): $1(\alpha 1) \rightarrow 2(\beta 1) \rightarrow 3(\alpha 2) \rightarrow 4(\beta 2)$.

2. В молекуле гемоглобина, не связанного с кислородом (дезоксигемоглобина), все четыре участка связывания обладают одинаковым сродством к кислороду (четыре светлых квадратика, крайние слева).

3. В результате связывания первой молекулы кислорода с субъединицей $\alpha 1$ меняется конформация субъединицы $\beta 1$, что повышает её сродство к кислороду. Благодаря чему вторая молекула кислорода присоединяется к субъединице $\beta 1$ с большей лёгкостью.

4. По мере связывания очередной молекулы кислорода сродство остающихся свободными субъединиц ($\alpha 2$ и $\beta 2$) продолжает нарастать. В результате связывание последней, 4-й молекулы кислорода с $\beta 2$ субъединицей происходит с максимально высоким сродством. Молекула гемоглобина оказывается полностью насыщена кислородом (образовался оксигемоглобин).

5. Нарастание сродства к кислороду молекулы гемоглобина происходит **нелинейно**, что и находит свое отражение в сигмовидной форме кривой.

Таким образом, гемоглобин оказался первым изученным аллостерическим белком. На его примере стала возможной разработка концепции кооперативного взаимодействия центров связывания. Позже было установлено, что аллостерические эффекты играют важнейшую роль в регуляции и интеграции молекулярных процессов в биосистемах.

Миоглобин, в отличие от гемоглобина, не является аллостерическим белком. Его молекула представляет собой одну полипептидную цепь (не состоит из протомеров), содержащую только одну гемогруппу, и способна поэтому связывать только одну молекулу кислорода. Кривая насыщения миоглобина кислородом имеет классическую гиперболическую форму.

В применении к аллостерическим ферментам можно дать следующее определение явления кооперативности:

Кооперативность – согласованное взаимодействие между каталитическими центрами субъединиц фермента в процессе связывания с ними молекул субстрата, что выражается в нелинейном изменении сродства субстрата к центру. Изменение сродства происходит опосредованно – через изменение конформации остающихся незаполненными каталитических центров.

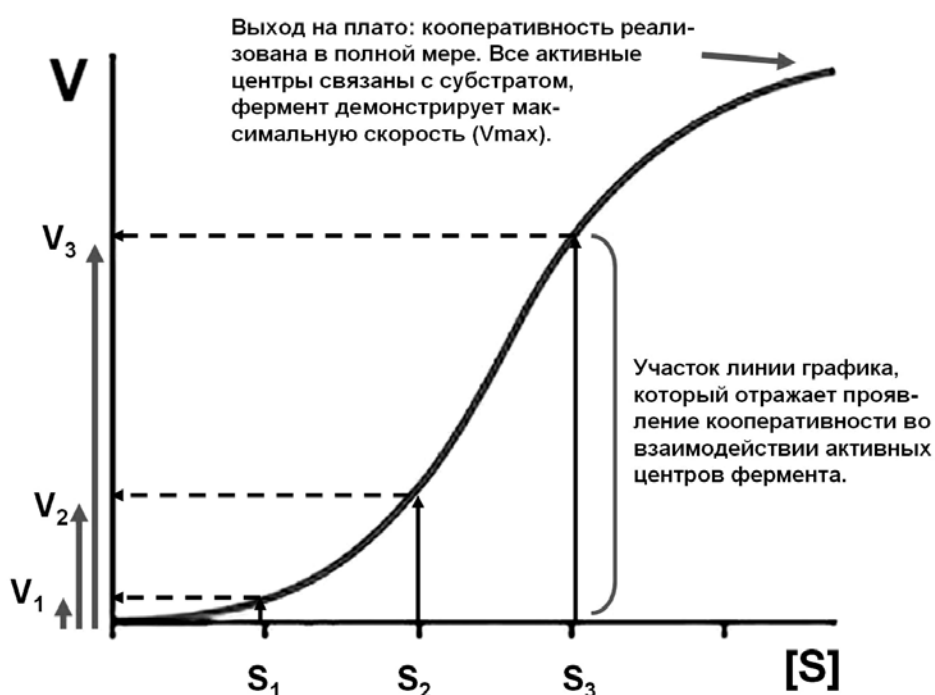


Рис. 62. Сигмовидная (S-образная) кривая зависимости скорости реакции аллостерического фермента от концентрации субстрата

Вертикальные стрелки обозначают скорости реакции (V_1 , V_2 и V_3), соответствующие равномерному приросту концентрации субстрата (S_1 , S_2 и S_3). Если принять величину V_1 , наблюдаемую в присутствии S_1 , за 100 %, то при равном приросте концентрации (от S_1 до S_2) наблюдаемая V_2 составит около 425 % (увеличение в 5,6 раза). Дальнейший равный прирост концентрации (от S_2 до S_3) обеспечит V_3 , которая составит уже 1225 % от V_1 (увеличение в 16,6 раза).

В отсутствие аллостерических регуляторов кооперативность проявляется в нелинейном повышении сродства каталитических центров аллостерического фермента к субстрату по мере роста его концентрации.

Нелинейность повышения сродства каталитических центров к субстрату приводит к тому, что повышение скорости ферментативной реакции оказывается больше, чем сумма скоростей, которые могли бы обеспечить каждый из центров, функционирующих по отдельности. Это обуславливает сигмовидную форму графика (рис. 62). По мере дальнейшего роста концентрации субстрата (превышающей величину S_3) скорость реакции начинает замедляться и график выходит на плато. Его появление обусловлено насыщением всех активных центров субстратом, поскольку количество молекул фермента (равно как и количество каталитических центров) остаётся неизменным.

Влияние аллостерических регуляторов на проявление кооперативности

На рис. 63 представлены варианты эффектов аллостерических регуляторов на зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для гетеротропных аллостерических ферментов:

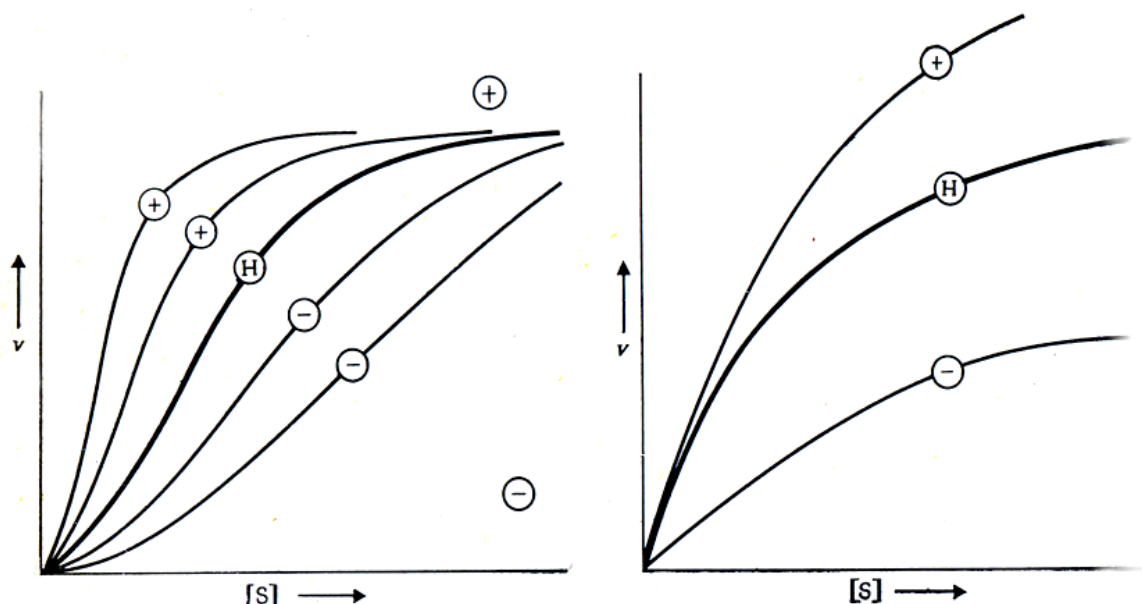


Рис. 63. Влияние аллостерических регуляторов на зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для гетеротропных аллостерических ферментов [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Левый график: аллостерический **активатор** (знак «плюс») может увеличивать сродство фермента к субстрату (уменьшение K_M), а аллостерический **ингибитор** (знак «минус») – уменьшать сродство фермента к субстрату (увеличение K_M) без изменения величины V_{max} .

Правый график: аллостерический **активатор** (знак «плюс») способен увеличивать V_{max} , а аллостерический **ингибитор** (знак «минус») – уменьшать V_{max} без изменения сродства фермента к субстрату (величина K_M постоянна).

Буквой **Н** обозначена скорость реакции в отсутствие аллостерических регуляторов.

Из рис. 63 следует, что аллостерические регуляторы способны стимулировать или ингибировать реакцию при любой данной концентрации субстрата. При этом и ингибирование, и стимулирование могут быть результатом измене-

ния как K_M , так и V_{max} . Аллостерические активаторы обеспечивают **положительную кооперативность**, в то время как аллостерические ингибиторы – **отрицательную кооперативность**.

В последнее время для характеристики сродства аллостерического фермента к субстрату предлагается вместо K_M (аллостерический фермент не подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен) использовать показатель $K_{0,5}$. Он обозначает концентрацию субстрата, при которой достигается полумаксимальная скорость ($0,5 V_{max}$).

Сочетания каталитических свойств у известных аллостерических ферментов чрезвычайно разнообразны, что и составляет широкий спектр особенностей их «кинетического поведения».

На рис. 64 представлена обобщающая схема реализации эффектов аллостерических активатора и ингибитора на активность аллостерического фермента:

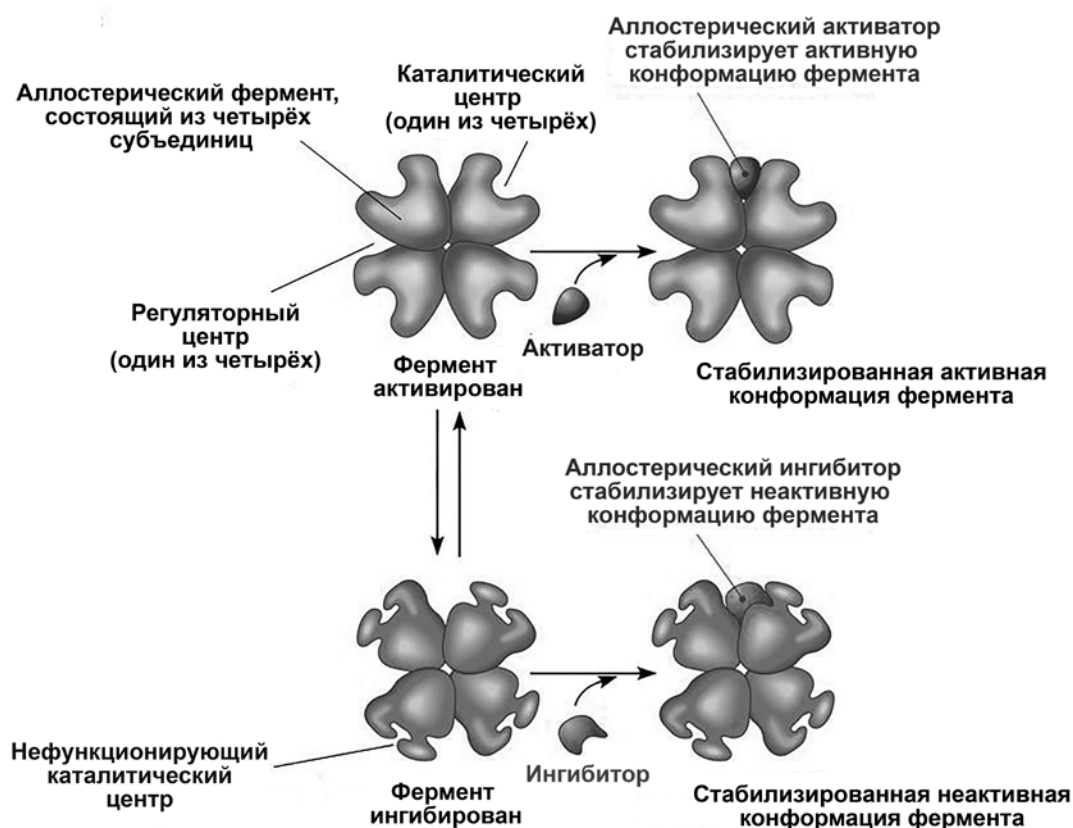


Рис. 64. Схема механизмов действия аллостерических регуляторов на активность гетеротропного аллостерического фермента

На схеме (рис. 64) показано, что аллостерические регуляторы, связываясь с высоким сродством со специфическими регуляторными центрами, влияют на конформацию субъединиц, из которых состоит фермент. Изменения конформации субъединиц распространяются на каталитический (активный) центр аллостерического фермента, что изменяет его сродство к субстрату. Таким образом, аллостерические регуляторы опосредованно влияют на каталитический (активный) центр. На схеме, в форме различных силуэтов, показана активная («открытая») конформация каталитического центра, который доступен для субстрата. Эту конформацию обеспечивает и стабилизирует аллостерический актива-

тор. Аллостерический ингибитор индуцирует и стабилизирует неактивную («закрытую») конформацию каталитического центра, который становится недоступным для субстрата.

Уравнение и график Хилла – средство количественной оценки степени проявления кооперативности.

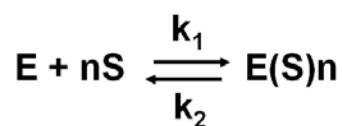
Ещё в начале XX века после описания сигмовидной кривой насыщения гемоглобина кислородом в зависимости от его парциального давления исследователи пришли к пониманию того, что в белке, обладающем несколькими центрами для связывания кислорода, заполнение этих центров происходит не мгновенно, а постепенно. Это означало, что между исходным состоянием такого белка (когда все центры ещё свободны) и завершением процесса (когда все центры оказываются заняты) существует промежуточная стадия, характеризующаяся различным соотношением числа занятых и остающихся свободными центров, что обуславливает различную степень проявления кооперативности.

В 1913 году Арчибальд Хилл предложил эмпирическое уравнение, позволяющее количественно охарактеризовать степень проявления кооперативности. Моделью служил процесс связывания кислорода молекулой гемоглобина. Хилл рассматривал процесс в динамике последовательного заполнения центров молекулами кислорода. Для количественной характеристики этого явления в каждый данный момент времени им было введено понятие **степень насыщения (Y)**:

$$Y = \frac{y}{1-y}$$

где **степень насыщения (Y)** – отношение числа центров, связавшихся с кислородом (**y**), к числу центров, оставшихся свободными (**1-y**).

Присоединение кислорода (**S**) к молекуле гемоглобина (**E**), имеющей **n** участков связывания можно описать уравнением:



Поскольку при равновесии процессы ассоциации и диссоциации протекают с одинаковой скоростью, можно записать:

$$k_1 [E][S]^n = k_2 [E(S)_n]$$

Отсюда скорость образования комплекса гемоглобин-кислород можно выразить как:

$$[E(S)_n] = \frac{k_1 [E][S]^n}{k_2}$$

Если отношение констант скоростей прямой (k_1) и обратной (k_2) реакций выразить как $k_1 / k_2 = K$, уравнение, представленное выше, примет вид:

$$[E(S)_n] = K [E][S]^n$$

Для того чтобы учесть процесс постепенного заполнения участков связывания молекулами S , А. Хилл предложил эмпирическое уравнение, которое для случая частичного заполнения участков связывания имеет вид:

$$Y = \frac{K [S]^n}{1 + K [S]^n}$$

где Y – степень заполнения центров молекулами S .

Когда все участки связывания заняты молекулами S (случай насыщения), то уравнение примет вид:

$$Y = K [S]^n$$

Ранее было определено, что:

$$Y = \frac{y}{1-y}$$

Подставив это выражение в уравнение Хилла для случая насыщения, получим уравнение:

$$\frac{y}{1-y} = K [S]^n$$

Прологарифмировав обе части уравнения, получим **уравнение Хилла**:

$$\lg \left(\frac{y}{1-y} \right) = \lg K + n \lg [S]$$

Зависимость $\lg[y/(1-y)]$ от $\lg[S]$ будет выражаться прямой с наклоном n к оси «х» (**tg** угла наклона). Этот график называется **график Хилла**. Для связывания кислорода миоглобином и гемоглобином график Хилла будет иметь вид (рис. 65):

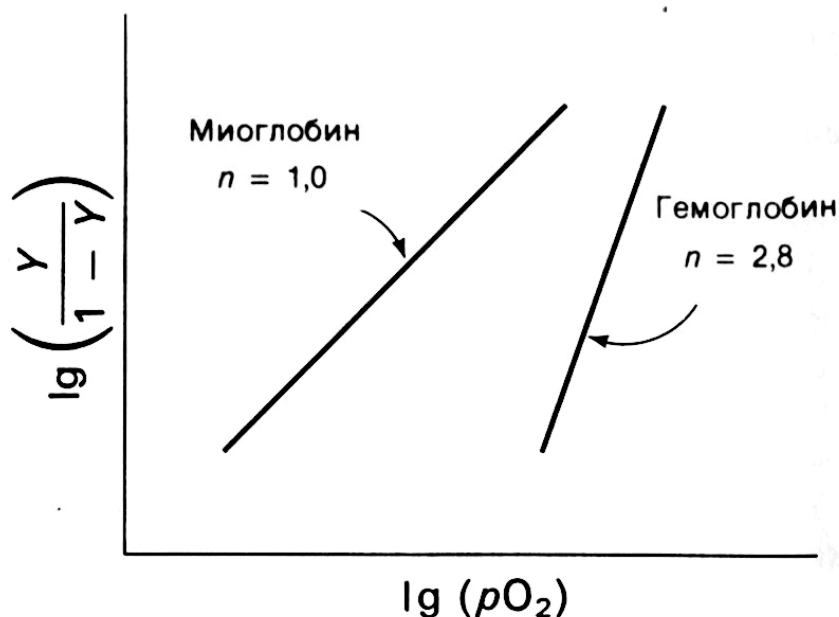


Рис. 65. График Хилла для случаев связывания кислорода молекулами миоглобина и гемоглобина

Из графика на рис. 65 следует, что для гемоглобина наклон $n = 2,8$ (tg угла наклона линии графика к оси «х», или **коэффициент Хилла**) свидетельствует о кооперативном связывании кислорода: $n > 1,0$. Присоединение кислорода к одному гему облегчает связывание кислорода с другими гемами того же тетрамера вследствие повышения сродства. Миоглобин не является аллостерическим белком, в связи с чем коэффициент Хилла (n) в этом случае равен единице ($n=1,0$). Это подтверждает то, что молекулы кислорода присоединяются к миоглобину независимо друг от друга.

Для анализа кооперативности взаимодействия каталитических центров у аллостерических ферментов уравнение Хилла имеет вид:

$$\lg \left(\frac{v}{V_{\max} - v} \right) = \lg K + n \lg [S]$$

где: S – концентрация субстрата;

v – скорость ферментативной реакции при любой S ;

$V_{\max}$ – максимальная скорость ферментативной реакции.

График Хилла для таких случаев строят в координатах $\lg[v/(V_{\max} - v)]$ от $\lg[S]$ (рис. 66). Из графика следует, что в отсутствие модуляторов кооперативность аллостерического фермента сравнительно невелика ($n=2,5$). Аллостерический активатор усиливает кооперативность ($n=4,2$), в то время как аллостерический ингибитор ослабляет кооперативность ($n=2,0$).

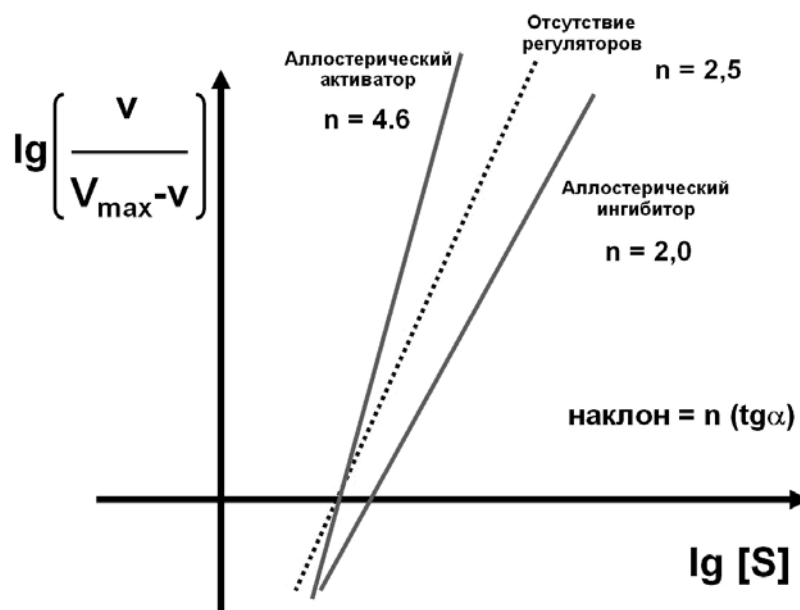


Рис. 66. Типичный график Хилла для аллостерического фермента в отсутствие регуляторов и в присутствии аллостерических активатора и ингибитора

Таким образом, **коэффициент Хилла (n)** является **численной мерой степени кооперативности** во взаимодействии каталитических (активных) центров у аллостерических ферментов. Чем больше величина коэффициента Хилла (n), тем выше степень кооперативности. Отсутствие кооперативности, равно как и полная её потеря ферментом, соответствует коэффициенту Хилла, равному единице ($n=1,0$). Вычисление коэффициента Хилла позволяет вести количественный анализ изменений степени кооперативности у изучаемого аллостерического фермента.

Модели для описания кинетики аллостерических ферментов

В настоящее время общепризнанными моделями, удовлетворительно описывающими большинство вариантов кинетики аллостерических ферментов, являются модель согласованного механизма аллостерических взаимодействий и модель последовательного механизма аллостерического взаимодействия.

Модель согласованного механизма аллостерических взаимодействий, или «симметричная» модель. Авторы: Ж. Моно, Дж. Уаймен и Ж.-П. Шанжё.

Модель исходит из важной роли симметрии во взаимодействии субъединиц олигомерных белков и на этой основе предполагает сохранение симметрии при аллостерических переходах. Основные постулаты модели:

1. Фермент состоит из 2 субъединиц.
2. Субъединицы могут находиться в двух конформациях: **Р-конформации**, или **релаксированной** (*relaxed* – релаксированная) и **Т-конформации**, или **напряженной** (*tense* – напряженная).
3. В отсутствие субстрата между Р- и Т-конформациями субъединиц имеется равновесие.

4. Субъединица в **T**-конформации имеет низкое сродство к субстрату (**S**); субъединица в **R**-конформации имеет высокое сродство к субстрату (**S**).
 5. Связывание в активном центре фермента первой молекулы субстрата индуцирует **согласованный переход обеих субъединиц** из **T**-конформации в **R**-конформацию: **2T** $\rightarrow$ **2R**.
 6. Аллостерический ингибитор взаимодействует с субъединицей, имеющей T-конформацию, и стабилизирует её.
 7. Аллостерический активатор взаимодействует с субъединицей, имеющей R-конформацию, и стабилизирует её.
- Схематично основные этапы реализации модели представлены на рис. 67:

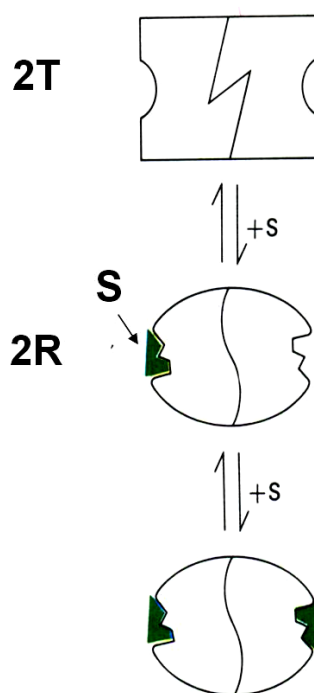


Рис. 67. Модель согласованного механизма аллостерических взаимодействий

Добавление субстрата сдвигает конформационное равновесие в сторону образования R-конформации, которая способна связывать субстрат в активном центре. Таким образом, по мере увеличения концентрации субстрата доля молекул аллостерического фермента, имеющих R-конформацию, прогрессивно возрастает, и связывание субстрата происходит кооперативно. При полном насыщении активных центров фермента субстратом все молекулы фермента оказываются в R-конформации (рис. 67).

Модель последовательного механизма аллостерического взаимодействия. Автор: Д. Кошланд.

Модель построена на предположении, что субъединицы аллостерического фермента способны взаимодействовать даже тогда, когда они находятся в разных конформациях. Основные постулаты модели:

1. Фермент состоит из 2 субъединиц, существующих **в двух независимых конформациях: Т и R** (см. предыдущую модель).
2. Связывание первой молекулы субстрата (**S**) с активным центром фермента индуцирует конформационный переход **T→R** только одной из двух субъединиц.
3. В результате появляется **гибридная форма** молекулы фермента, имеющая **RT-конформацию**. Сродство к субстрату у фермента в **RT-конформации** выше, чем в **TT-конформации**.
4. Переход молекулы фермента в **RT-конформацию** изменяет сродство активного центра второй субъединицы к субстрату. Допускается, что сродство может как увеличиваться, так и уменьшаться.
5. Связывание второй молекулы **S** завершает переход второй субъединицы в **R-конформацию (2R-конформация)**.

Схематично основные этапы реализации модели представлены на рис. 68:

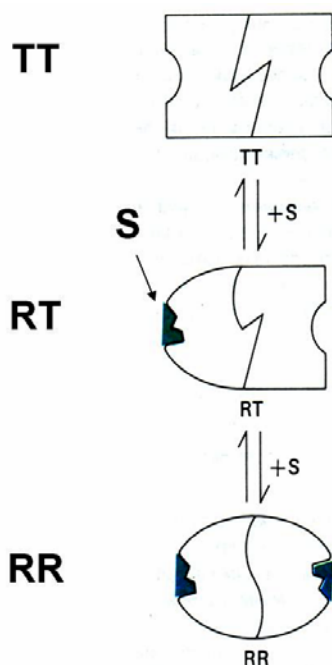


Рис. 68. Модель последовательного механизма аллостерического взаимодействия

Модель последовательного механизма взаимодействия (рис. 68) отличается от модели согласованного механизма (рис. 67) по следующим позициям:

а) Модель последовательного механизма взаимодействия не предполагает равновесия между **T-** и **R-**конформациями в отсутствие субстрата.

б) Конформационный переход, индуцируемый присоединением первой молекулы субстрата, в разных субъединицах происходит не согласованно, а **последовательно**, через этап образования **гибридной RT-формы** фермента. В модели согласованного механизма наличие гибридной формы исключается.

в) В случае согласованного механизма у **гомотропных аллостерических ферментов** взаимодействия всегда положительные: кооперативность увеличи-

вается. В случае последовательного механизма у **гетеротропных аллостерических ферментов** взаимодействия могут быть как положительными, так и отрицательными.

Как показала практика энзимологии, отдать явное предпочтение одной из двух представленных моделей не представляется возможным. Оказалось, что для одних аллостерических белков больше подходит модель согласованного взаимодействия, в то время как для других аллостерических белков более применима модель последовательного механизма. Существуют аллостерические белки, к которым не применима ни одна из рассмотренных моделей. Полагают, что такие белки имеют более двух конформационных состояний. Их поведение невозможно описать простыми моделями, допускающими две конформации (**R** и **T**).

Физиологическое значение «сигмовидной кинетики»

Сигмовидная кинетика существенно повышает функциональную роль аллостерических белков, что выше обсуждалось на примере гемоглобина и миоглобина. Насыщение кислородом этих белков, равно как и диссоциация (отдача) присоединенного кислорода у гемоглобина и миоглобина, протекает поразному. Так, в специальных исследованиях было показано, что при имеющемся парциальном давлении кислорода в капиллярах органов и тканей только гемоглобин способен полностью отдавать клеткам принесенный кислород. Относительно высокое парциальное давление кислорода в капиллярах необходимо для создания необходимого градиента его концентрации, что и обеспечивает диффузию газа из капилляров в клетки. В этих же условиях насыщенный кислородом неаллостерический белок миоглобин диссоциирует с гораздо большим трудом, что делает его непригодным для транспорта кислорода по кровотоку.

В случае аллостерических ферментов сигмовидная кинетика позволяет при незначительных изменениях концентрации субстрата значительно изменять скорость катализируемой реакции. Низкие концентрации аллостерических регуляторов при одной и той же концентрации субстрата способны существенно изменять кинетические свойства аллостерических ферментов: изменять величины $V_{\max}$ или K_M (точнее $K_{0,5}$), а иногда оба параметра одновременно. Эти особенности сигмовидной кинетики позволяют аллостерическим ферментам кратно менять скорость катализируемой реакции, что лежит в основе способности аллостерических ферментов влиять на активность целого метаболического пути.

Расчеты показали, что для повышения активности неаллостерического фермента на 80 % потребуется 80-кратное повышение внутриклеточной концентрации субстрата. В физиологических условиях такой прирост концентрации не может быть реализован, поскольку он неминуемо приведет к серьезным нарушениям метаболизма. В случае же аллостерического фермента с его «сигмовидной кинетикой» для увеличения активности на 80 % потребуется всего 2–3-кратное увеличение концентрации субстрата.

Следует подчеркнуть, что значение сигмовидной кинетики заключается в сведении к минимуму изменений концентрации регулятора, которая необходима для эффективного функционирования аллостерического фермента.

Заключение

Аллостерические ферменты образуют особую категорию ферментов, которые выполняют функцию регуляции активности метаболических путей. Функционирование аллостерических ферментов имеет две уникальные особенности:

а) зависимость скорости катализируемой ими реакции от концентрации субстрата не подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен;

б) аллостерические ферменты способны кратно ускорять или замедлять катализируемые биохимические превращения.

Молекула аллостерических ферментов имеет четвертичную структуру: состоит из нескольких субъединиц – протомеров. Каждая субъединица аллостерического фермента, помимо каталитического (активного) центра, содержит один или несколько дополнительных центров, которые пространственно отделены от каталитического центра. Эти центры называются регуляторными или аллостерическими центрами и предназначены для связывания аллостерических регуляторов (модуляторов), которые подразделяются на активаторы и ингибиторы.

Механизм эффекта аллостерического регулятора состоит в том, что он специфически связывается с аллостерическим центром и вызывает изменение конформации фермента, охватывающее и его каталитический (активный) центр. В результате в нём происходит специфическое изменение пространственного взаимоположения соответствующих остатков аминокислот, что сопровождается либо увеличением (активацией), либо уменьшением (ингибированием) активности аллостерического фермента.

Для аллостерических ферментов линия графика в системе координат «скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата» представляет собой сигмовидную кривую или S-образную кривую. Такой характер кривой указывает на то, что, во-первых, в каждой молекуле фермента имеется более одного каталитического (активного) центра, к которому может присоединяться субстрат, и, во-вторых, связывание первой молекулы субстрата с ферментом способствует облегчению связывания следующей молекулы субстрата, что нелинейно повышает активность фермента. Иными словами, между активными центрами в процессе их заполнения молекулами субстрата существует кооперативное взаимодействие. Нелинейность повышения сродства каталитических центров к субстрату приводит к тому, что повышение скорости ферментативной реакции оказывается больше, чем сумма скоростей, которые могли бы обеспечить каждый из центров, функционирующих по отдельности. Это обуславливает сигмовидную форму графика.

Аллостерические регуляторы способны ускорять или замедлять ферментативную реакцию при любой данной концентрации субстрата. Аллостерические активаторы обеспечивают положительную кооперативность, в то время как аллостерические ингибиторы – отрицательную кооперативность.

В 1913 году Арчибальд Хилл предложил эмпирическое уравнение, позволяющее количественно охарактеризовать степень проявления кооперативности. Моделью послужил процесс связывания кислорода молекулой гемоглобина. Хилл рассматривал процесс в динамике заполнения центров связывания гемо-

глубина молекулами кислорода. Им было введено понятие «степень насыщения (Y)» как отношение числа центров, связавшихся с кислородом, к числу центров, оставшихся свободными. Уравнению, предложенному Хиллом, соответствует график в координатах зависимости $\lg Y$ от $\lg S$ (где S – концентрации субстрата). Наклон прямой графика к оси «X» (tg угла наклона) принято обозначать буквой «n», которая получила название «коэффициент Хилла». В случае кооперативного взаимодействия центров связывания $n > 1,0$. Для некооперативного взаимодействия $n = 1,0$. Таким образом, коэффициент Хилла (n) является численной мерой степени кооперативности во взаимодействии каталитических (активных) центров у аллостерических ферментов. Чем больше величина коэффициента Хилла (n) превышает 1,0, тем выше степень кооперативности.

Общепризнанными моделями, удовлетворительно описывающими большинство вариантов кинетики аллостерических ферментов, являются:

а) модель согласованного механизма аллостерических взаимодействий или, «симметричная» модель (Ж. Моно, Дж. Уаймен и Ж.-П. Шанжё);

б) модель последовательного механизма аллостерического взаимодействия (Д. Кошланд).

ЛЕКЦИЯ 7

ТЕМА: СИСТЕМА ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ РЕГУЛЯЦИЮ МЕТАБОЛИЗМА

План лекции:

1. Терминология: сигнальная трансдукция (signal transduction), или сигнализация (signaling).
2. Представление о сигнальных молекулах, их свойствах и этапах реализации регуляторного эффекта.
3. Два направления передачи сигнала: изнутри – кнаружи и снаружи – внутрь.
4. Краткая история концепции системы первичных и вторичных мессенджеров.
5. О корректности терминов «вторичный мессенджер» и «вторичный посредник» в свете современных знаний о природе сигнальной трансдукции.
6. Молекулы, являющиеся первичными и вторичными мессенджерами, и их краткая характеристика.
7. Сигнализация, опосредуемая рецепторами. Основы кинетики взаимодействия лигандов (первичных мессенджеров) с рецептором.
8. Представления о константе диссоциации (K_D) и полумаксимальном метаболическом эффекте (EC_{50}).
9. Два способа передачи сигнала от активированного лигандом рецептора на внутриклеточную исполнительную молекулу.
10. Основные структурные элементы мембранных рецепторов, или рецепторов клеточной поверхности.
11. Классификация рецепторов клеточной поверхности, опосредующих метаболическую регуляцию.
12. Основные механизмы активации и инактивации мембранных рецепторов.
13. Основные структурные элементы внутриклеточных рецепторов и механизм активации лигандом.
14. SH2-, SH3- и PH-домены белков-посредников.

Заключение

Клетка, независимо от того, говорим ли мы об одноклеточном организме или о клетке в составе многоклеточного организма, получает различные сигналы из окружающей её среды, декодирует их и передаёт внутрь к соответствующим молекулам-мишеням, изменяя их активность.

Процесс передачи полученного клеткой регуляторного сигнала по её внутреннему пространству к исполнительным молекулам-мишеням (в том числе к ферментам), который опосредуют вторичные мессенджеры и специализированные белки-посредники, называется **сигнальной трансдукцией** (signal trans-

duction; от *лат. transductio* – перенос) или просто **сигнализацией (signaling)**. Термин «signal transduction» впервые появился в научных журналах в 1972 году.

Как уже упоминалось в ранее прочитанных лекциях, к числу ведущих задач, решаемых регуляцией метаболизма, относятся:

1. Взаимосогласование внутриклеточных метаболических процессов.
2. Согласование активности метаболических процессов между клетками и органами.
3. Поддержание постоянства внутренней среды организма.
4. Обеспечение адаптации организма к постоянно меняющимся условиям среды его обитания.

Существуют два ведущих способа управления внутриклеточными метаболическими процессами:

1) управление активностью существующих ферментов путем изменения их каталитических свойств;

2) управление экспрессией генов, кодирующих ферменты, либо их деградацией, что определяет количество функционирующих в данный момент времени ферментов.

Конечный регуляторный эффект определяется сочетанием вышеупомянутых способов. При этом первый из них – быстрый, но кратковременный. Второй – медленный, но действующий продолжительное время.

В рамках современных представлений о сигнальной трансдукции выделяют следующие ключевые понятия:

- **Сигнальные молекулы** – химические соединения, синтезирующиеся в организме (то есть эндогенного происхождения), которые обеспечивают внешнее управление метаболизмом клеток-мишеней посредством взаимодействия со специфическими рецепторами этих клеток.
- **Лиганд (фактически синоним термина «сигнальная молекула»)** – не что иное, как сигнальная молекула, способная с высоким сродством взаимодействовать с собственным специфическим рецептором клетки.
- **Клетка-мишень** – клетка, имеющая специфический рецептор для данной сигнальной молекулы (лиганда).

Основополагающие свойства сигнальных молекул:

1. Их действие осуществляется через специфический рецептор.
2. Сигнальные молекулы имеют короткий период жизни, однако он достаточен для переноса регуляторного сигнала.
3. Обладают высокой биологической активностью.
4. Действие сигнальной молекулы уникально.
5. В ходе сигнальной трансдукции обязательно происходит усиление регуляторного сигнала.
6. Для одного вида сигнальных молекул может быть несколько клеток-мишеней.
7. Реакция метаболизма клеток-мишеней, принадлежащих к различным типам, на воздействие одной и той же сигнальной молекулы может быть не одинаковой.

В процессе реализации сигнальной молекулой своего регуляторного эффекта следует выделить следующие этапы:

1. Распознавание сигнала специфическим рецептором клетки-мишени.
2. Трансдукция регуляторного сигнала во внутреннее пространство клетки, сочетающееся с его усилением.
3. Восприятие регуляторного сигнала молекулой-мишенью, приводящее к соответствующим перестройкам её метаболизма.
4. Удаление («выключение») регуляторного сигнала сразу после реализации метаболического эффекта.
5. Следует помнить, что интеграция метаболических процессов достигается благодаря тому, что регуляторные сигналы способны распространяться (передаваться) по разным направлениям.

1. Направление сигнала: снаружи – внутрь. Связывание лиганда со специфическим рецептором приводит к изменению активности метаболических путей, перестройке клеточного скелета, изменению миграции клетки, активизации пролиферации и т. д. Большинство сигнальных молекул гидрофильны и не могут проходить сквозь мембрану клетки-мишени. Они связываются с мембранными (поверхностными) рецепторами. В противоположность им гидрофобные сигнальные молекулы и малые гидрофильные молекулы диффундируют сквозь цитоплазматическую мембрану и могут специфически взаимодействовать с внутриклеточными рецепторами, локализованными в цитоплазме или ядре.

2. Направление сигнала: изнутри – кнаружи. Внутриклеточные метаболические процессы могут, в свою очередь, влиять на аффинность мембранных рецепторов по отношению к их лигандам либо изменять паттерн (комплект) экспрессии мембранных рецепторов. В последнем случае это означает, что одним из вариантов ответа клетки-мишени на воздействие внешней сигнальной молекулы могут быть целенаправленная деградация и удаление с клеточной поверхности одних рецепторов и синтез, и появление рецепторов с другой специфичностью. Тем самым клетке-мишени сообщается способность воспринимать новый по своей природе регуляторный сигнал (лиганд).

Клетка в процессе своей жизнедеятельности в каждый момент времени, вынуждена контактировать одновременно с несколькими типами сигнальных молекул, которые поступают из различных источников во внеклеточное пространство. Помимо гормонов это могут быть цитокины, факторы роста, простагландины и другие биорегуляторы. Тем не менее каждый тип клетки запрограммирован на определенный ответ при воздействии **специфической комбинации внеклеточных сигнальных молекул**. Такая определенность клеточного ответа детерминирована тем, что **мембрана содержит набор (комплект, паттерн) определенных рецепторов**. Благодаря этому клетка имеет возможность **по-разному отвечать на воздействие различных комбинаций сигнальных молекул**. Иными словами, клетка имеет возможность «выбирать» из этого потока химических сигналов только те, которые важны для её жизнедеятельности в данном функциональном состоянии. Комплект рецепторов для данного типа клеток – некая «постоянная величина», он сформировался в ходе

эволюции. Количество же рецепторов и их аффинность к лигандам может изменяться, что является важным элементом регуляции метаболизма.

Один набор лигандов обеспечивает сигнализацию, необходимую для выживания клетки; другой набор лигандов запускает процесс роста клетки и её деление; третий набор лигандов необходим для включения её дифференциации. **Прекращение внешней сигнализации приводит к запуску программируемой гибели конкретной клетки – апоптозу.**

Таким образом, использование разными типами клеток различных комбинаций регуляторных сигналов позволяет организму тонко регулировать существование составляющих его клеток, **используя при этом сравнительно небольшой набор сигнальных молекул.**

Внеклеточные сигнальные молекулы воздействуют на клетки-мишени как на коротких, так и длинных дистанциях.

Короткие дистанции:

- **паракринная сигнализация**, при которой одни клетки выделяют сигнальные молекулы во внеклеточное пространство (не поступают в кровоток), которые действуют на соседние клетки, относящиеся к такому же типу;

- **аутокринная сигнализация** – передача сигнальной молекулы самой себе посредством рецепторов к этой молекуле, которые клетка несёт на своей собственной поверхности.

Длинные дистанции:

- **эндокринная сигнализация**, при которой химический сигнал (лиганд) синтезируется в специализированных клетках эндокринных желез, секретируется в кровоток и током крови доставляется к клеткам-мишеням.

Краткая история концепции системы первичных и вторичных мессенджеров

Согласно данной концепции, сигнальные молекулы, действующие на клетку извне, называют **первичными мессенджерами**. Они действуют во внеклеточном пространстве и внутрь клеток не проникают.

Сигнальные молекулы, которые синтезируются внутри клетки в ответ на действие первичных мессенджеров и осуществляют трансдукцию регуляторной информации по внутриклеточному пространству к исполнительным молекулам, называют **вторичными мессенджерами**. Они действуют внутри клетки.

Концепция о первичных и вторичных мессенджерах родилась в середине 60-х годов прошлого века благодаря многолетним исследованиям **Эрла Сазерленда** (рис. 69).



Рис. 69. Эрл Уилбур Сазерленд
(Earl Wilbur Sutherland)
1915–1974 гг.

С 1953 года Э. Сазерленд занимался изучением молекулярных механизмов передачи регуляторного сигнала от глюкагона или адреналина на гликогенфосфоорилазу печени и мышц.

В 1956–1957 гг. Сазерленд установил, что активность гликогенфосфорилазы увеличивается при её фосфорилировании и ингибируется при дефосфорилировании. Работая со срезами печени, Сазерленд показал, что глюкагон при добавлении в среду инкубации срезов активировал гликогенфосфорилазу, способствуя её фосфорилированию. Вскоре в исследованиях с очищенной гликогенфосфорилазой Сазерленд установил ранее неизвестный факт: некоторое увеличение активности этого фермента происходит в присутствии АТФ, который, как мы теперь знаем, является предшественником цАМФ. Помимо этого, Сазерленд установил, что сразу после добавления в среду инкубации срезов печени глюкагона или адреналина внутри клеток появляется некий термостабильный фактор, который по химическому строению представляет собой аденин-рибонуклеотид. Этот фактор был изолирован Сазерлендом, и оказалось, что под его влиянием в инкубируемом гомогенате печени активируется гликогенфосфорилаза **в отсутствие добавленных гормонов**. Вскоре было установлено, что этот термостабильный фактор является не чем иным, как цАМФ.

Этому событию способствовало то, что независимо от исследований Э. Сазерленда в 1959 году Дэвид Липкин (David Lipkin) выделил и установил химическую структуру молекулы цАМФ. Однако до работ Э. Сазерленда биологическая функция цАМФ оставалась неизвестной (рис. 70).

Открытие Сазерленда состояло в том, что он выяснил функцию цАМФ и установил её ключевую роль в механизме передачи регуляторного сигнала от гормонов адреналина и глюкагона (первичных мессенджеров) на внутриклеточный ферментативный каскад гликогенфосфорилазы клеток печени.

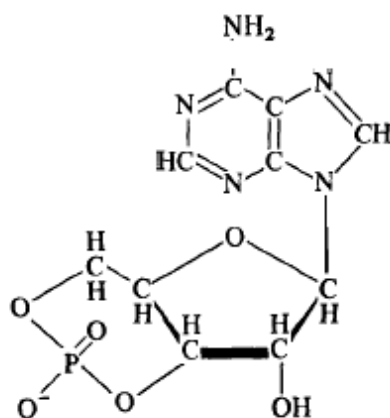


Рис. 70. Химическая структура циклического-3'5'-аденозинмонофосфата (цАМФ)

Завершающие этапы исследований Сазерленда охватили первую половину 60-х годов XX столетия. Свою **концепцию о первичных и вторичных мессенджерах** Э. Сазерленд опубликовал в 1966 году. Согласно этой концепции, цАМФ образуется внутри клеток под влиянием гормонов и далее переносит регуляторный сигнал к молекулам-мишеням внутри клетки, является медиатором между гормонами, синтезируемыми в организме млекопитающих, и внутриклеточными эффекторными белками, воспринимающими регуляторную информацию. цАМФ активирует протеинкиназу (киназу гликогенфосфорилазы), которая переводит неактивную гликогенфосфорилазу в её активную (фосфорилированную) форму.

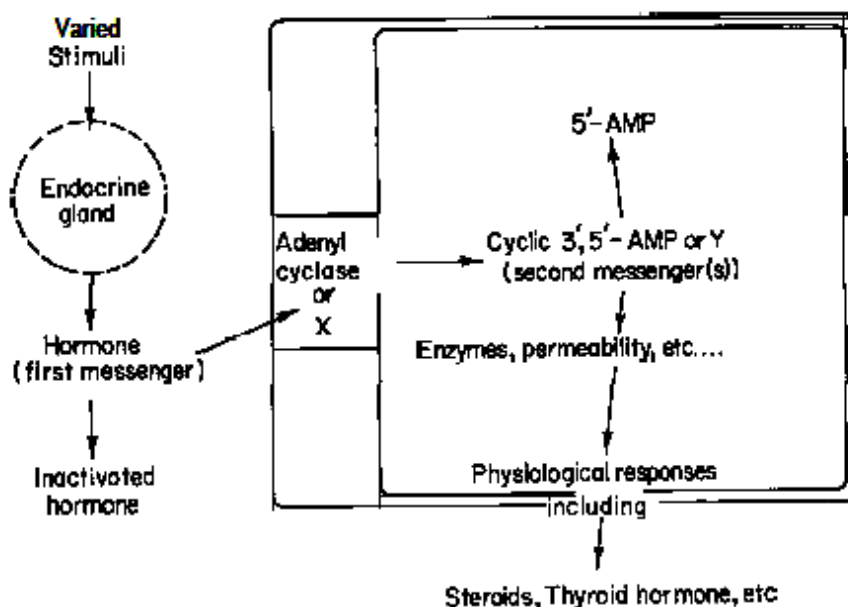


Рис. 71. Схема, иллюстрирующая концепцию первичного и вторичного мессенджеров. [Sutherland E. W. & Robison G. A. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmac. Rev.*, 1966, 18, 145–161]

На рис. 71 представлена схема, иллюстрирующая концепцию мессенджеров, которую Э. Сазерленд опубликовал в 1966 году. В статье Э. Сазерленд писал: *«Важным следствием взаимодействия гормона с рецептором на мембране определенных клеток является стимуляция аденилатциклазы, что приводит к повышению содержания цАМФ. цАМФ далее действует внутри клетки и изменяет активность одного или нескольких биохимических процессов. Поскольку разные типы клеток содержат различные ферменты, конечный результат изменения содержания цАМФ будет определяться типом клетки: активация фосфорилазы в печени, стимуляция стероидогенеза в коре надпочечников и т. д.»*

В 1971 году Э. Сазерленду была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине «...за открытия, касающиеся механизмов действия гормонов».

О корректности терминов «вторичный мессенджер» и «вторичный посредник» в свете современных знаний о природе сигнальной трансдукции

В настоящее время установлено, что в передачу регуляторного сигнала по цитоплазме вовлечены не только вторичные мессенджеры, являющиеся малыми, как правило, свободно диффундирующими молекулами, но и многочисленные специфические белки, которые образуют своеобразные «молекулярные конвейеры», обеспечивая каскадную передачу сигнала к исполнительной молекуле. Функционально обе группы молекул выполняют роль «связных» между активированными внешним стимулом рецепторами и внутриклеточными эффекторными молекулами, обеспечивающими клеточный ответ. Вместе с тем между ними есть принципиальная разница. Так, белки формируют «молекулярный конвейер», состоящий из нескольких участников (белок – белковые взаимодействия), способный, с одной стороны, чувствовать внешний сигнал и, с другой стороны, обладающий ферментативной активностью, которую модулирует внешний сигнал. Такие сигнальные белки выполняют несколько функций: заякоревывающую функцию, функции интеграции, модуляции и переноса сигнала. Малые же молекулы действительно являются молекулами-мессенджерами (от *англ.* «**messenger**» – посланник), осуществляющими непосредственный контакт между различными белками. Поэтому терминологически корректно именно малые молекулы-посланники называть «мессенджерами», а белки, формирующие сигнальные каскады и «конвейеры» из нескольких молекул, – «посредниками». Таким образом, в настоящее время термин «вторичный посредник» уже нельзя считать корректным. Пришло время вернуться к истокам – «первичный мессенджер» и «вторичный мессенджер», а посредник должен остаться посредником без лишнего смысла уточнения «вторичный».

Молекулы, являющиеся первичными мессенджерами, и их краткая характеристика

Первичные мессенджеры – естественные сигнальные биомолекулы, имеющие различное химическое строение, действующие на клетку путем высокоаффинного связывания с рецепторами (поверхностными или внутриклеточными), способные активировать механизм передачи сигнала внутрь клетки. По от-

ношению к воспринимающей сигнал клетке первичные мессенджеры являются внеклеточными сигнальными молекулами.

1. Гормоны. Синтезируются и выделяются в небольших количествах специализированными органами или клетками, существенно отдаленными от органов-мишеней. Оказавшись в кровотоке, со временем они разрушаются соответствующими ферментами. Некоторые из гормонов циркулируют по крови в форме комплексов со специфическими гормон-связывающими белками. Концентрация гормонов в кровотоке мала, что диктует необходимость рецепторам иметь высокую чувствительность к гормонам. Клеточные рецепторы, как поверхностные, так и внутриклеточные, обладают высокой специфичностью и сродством к своему гормону, что позволяет ему связываться с рецептором в течение миллисекунд.

2. Факторы роста. Эти молекулы несут митогенный сигнал, то есть стимулируют митоз и деление клеток. Как и для гормонов, для факторов роста у клеток есть специфические рецепторы, с высоким сродством связывающие свой лиганд. Наряду со стимуляцией (или подавлением) роста клеток, факторы роста способны инициировать апоптоз, дифференцировку клеток и экспрессию соответствующих генов. В отличие от гормонов, эффекты факторов роста могут длиться несколько дней. Факторы роста действуют, как правило, на небольшом расстоянии – на соседние клетки, то есть паракринно.

3. Цитокины. Это внеклеточные сигнальные белки сравнительно небольшой массы (10–30 кДа), которые в основном влияют на функции клеток иммунной системы и регулируют активность воспаления. К цитокинам относятся: интерфероны, ФНО- α , интерлейкины и многие другие. Хемокины – это цитокины, выделяемые клетками, которые привлекаются в очаг воспаления и ими активируются.

4. Нейромедиаторы. Их выделение и связывание происходят внутри синапсов. В пресинаптической клетке (нейроне) везикулы, содержащие нейромедиатор, секретируются в пространство синаптической щели путём экзоцитоза. Это важно, поскольку индивидуальный нейрон содержит небольшое количество медиатора (несколько везикул) и его эффективная концентрация в пределах синаптической щели быстро снижается. Нейромедиатор диффундирует через синаптическую щель и связывается со своими рецепторами на мембране пост-синаптической клетки (нейрона). Диффузия – медленный процесс, но «толщина» синаптической щели составляет менее 0,1 мкм, что вполне приемлемо для быстрой передачи химического сигнала между нервными клетками или нервной клеткой и мышцей (в нейро-мышечном контакте). Каким будет эффект медиатора (возбуждающим или тормозящим), определяется природой ионного канала, сопряженного с рецептором нейромедиатора.

5. Вазоактивные агенты. Эти соединения служат для повышения проницаемости стенок кровеносных сосудов в очаге воспаления для того, чтобы из кровотока туда проникли лейкоциты. К вазоактивным агентам относят: **гистамин** (секретируется базофилами и тучными клетками), **серотонин** (секретируется тромбоцитами) и провоспалительный медиатор – **брадикинин**.

Другое важное семейство вазоактивных соединений – **эйкозаноиды**. Они являются производными арахидоновой кислоты (5,8,11,14-эйкозановая кислота содержит 20 атомов углерода). В состав семейства эйкозаноидов входят: **простагландины, тромбоксаны и лейкотриены**. Они действуют на коротких расстояниях как мощные паракринные или аутокринные агенты как в норме, так и при патологии. При воспалении они ответственны за покраснение кожи, отёк и появление боли. Аспирин обладает противовоспалительным и болеутоляющим действиями, поскольку он ингибирует ключевой фермент синтеза простагландинов.

Сигнализация, опосредуемая рецепторами

Клетка отвечает только на тот регуляторный сигнал, для которого у неё есть специфический рецептор. Жизнедеятельность большинства типов клеток возможна лишь в условиях постоянного получения ими специфического сигнала для выживания. Исчезновение соответствующей сигнальной молекулы или нарушение её связывания с рецептором приводит к запуску программы клеточной гибели – апоптозу.

Получение клеткой сигнала от первичных мессенджеров обеспечивается особыми гликопротеинами – **рецепторами**, для которых первичные мессенджеры являются **лигандами**. Молекулы рецепторов обладают характерными свойствами:

1. Имеют высокую избирательность к **лиганду**.
2. Связывание лиганда нековалентно, и его эффект на клетку **обратим**.
3. Кинетика связывания лиганда с рецептором описывается кривой с насыщением, соответствующим состоянию полной занятости («оккупации») всех молекул рецепторов, число которых в клетке ограничено.
4. Рецепторы **обладают тканевой специфичностью**, которая отражает наличие или отсутствие данных функций в клетках органа-мишени.

Обратная регуляция сигнала, получаемого через рецепторы

Клетка, потерявшая способность «отключать» регуляторный сигнал после достижения эффекта, неизбежно погибает вследствие полной разбалансировки метаболизма. Известны три основных механизма инактивации («выключения») сигнала.

Во-первых, поглощение клеткой комплекса лиганд-рецептор путем эндоцитоза. Это наиболее распространенный механизм.

Во-вторых, десенсибилизация рецептора (снижение чувствительности рецептора к лиганду). Часто связана с фосфорилированием цитоплазматического домена рецептора. Это происходит в результате фосфорилирования рецептора, как правило, по остаткам серина и треонина с участием определенных протеинкиназ.

В-третьих, внутриклеточное разрушение эффекторной молекулы или молекул-активаторов.

Основы кинетики взаимодействия лигандов (первичных мессенджеров) с рецептором

В типичном случае гормоны оказывают физиологический эффект при концентрации менее 10^{-10} моль/л (или 6×10^{13} молекул в 1 л). Если принять, что клетка имеет в среднем диаметр около 12 мкм, то занимаемый ею объем составит 10^{-12} л. Этот объем внеклеточной жидкости будет содержать всего 60 молекул гормона.

Связывание гормона (**H**) с рецептором (**R**) нековалентно и всегда обратимо:



При достижении состояния равновесия скорости образования и диссоциации комплекса гормон-рецептор (**HR**) будут равны, что можно выразить как:

$$k_{on} [H][R] = k_{off} [HR],$$

где: k_{on} k_{off} – константы прямой и обратной реакций соответственно; **[H]** и **[R]** – концентрации свободного гормона и свободного рецептора соответственно.

С учетом того, что взаимодействие происходит с высоким сродством, преобладать будет образование комплекса **HR**, и равновесие реакции будет смещено вправо ($k_{on} \gg k_{off}$). Тогда константу равновесия (**K**) процесса можно выразить как:

$$K = \frac{[HR]}{[H][R]} = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Отсюда константу диссоциации (**K_D**) можно выразить уравнением:

$$K_D = \frac{[H][R]}{[HR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_D – константа диссоциации (размерность, моль/л). Константа обозначает концентрацию гормона, при которой занято 50 % рецепторов, при этом **[HR] = [R]**.

In vivo широко распространено явление **гетерогенности рецепторов по их сродству к лигандам**. Такая гетерогенность обусловлена, по меньшей мере, двумя причинами.

Во-первых, наличием различных субтипов рецептора, отличающихся по сродству к лиганду (детерминировано генетически).

Во-вторых, рецептор конкретного класса в результате регуляторных воздействий может принимать различные конформации, которым будет соответствовать либо низкая, либо высокая аффинность.

Такие изменения сродства рецепторов могут быть обусловлены внутриклеточными метаболическими процессами, которые в конечном итоге определяют не только аффинность, но и количество рецепторов, принадлежащих клетке.

Возможно также, что аффинность и количество рецепторов будут модулироваться самим процессом взаимодействия гормона с рецептором.

Принцип метода оценки аффинности рецептора

Для этой цели используют гормоны, меченные радиоактивным изотопом. К клеткам добавляют гормон в различных концентрациях для того, чтобы можно было достигнуть состояния насыщения всех молекул рецепторов гормоном. После соинкубации клеток и «меченого» гормона проводят разделение пулов свободных гормонов и гормонов, связавшихся с клетками, путем центрифугирования или фильтрованием. В супернатанте или фильтрате будут содержаться свободные гормоны; в осадке или в отфильтрованном материале – гормоны, связанные с клетками. Затем оба пула оценивают по уровню радиоактивности. Строят график в координатах: концентрация гормонов, связанных с клетками, от концентрации свободных гормонов. В относительно простых условиях (на каждом рецепторе только один сайт связывания с гормоном, и нет влияний на рецептор, приводящих к изменению его аффинности) можно получить уравнение для построения кривой связывания следующим путем.

Если общее содержание рецепторов в препарате изучаемых клеток обозначить как R_{tot} , то:

$$[R] = R_{tot} - [HR]$$

Подставив $[R]$ в уравнение, характеризующее K_D (см. страницу выше), получаем:

$$[HR] = R_{tot} \frac{[H]}{K_D + [H]}$$

При построении графика зависимости $[HR]$ от $[H]$ получаем линию, имеющую форму гиперболы (рис. 72 а):

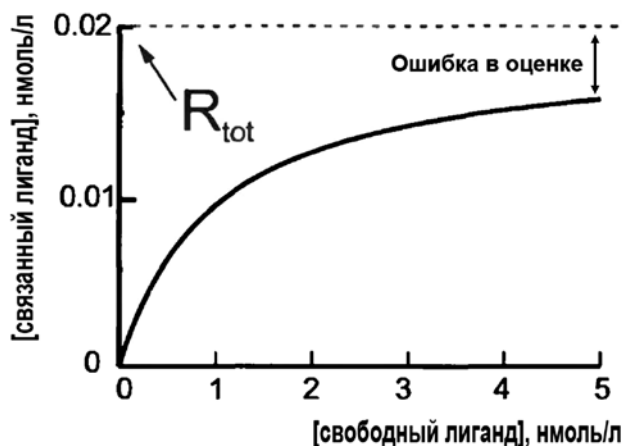


Рис. 72 а. График зависимости концентрации связанного с клеткой гормона (лиганда) от концентрации свободного лиганда. Линейная система координат

С большей точностью общую концентрацию рецепторов в системе $[R_{tot}]$ можно определить с помощью полулогарифмического графика (рис. 72 б):

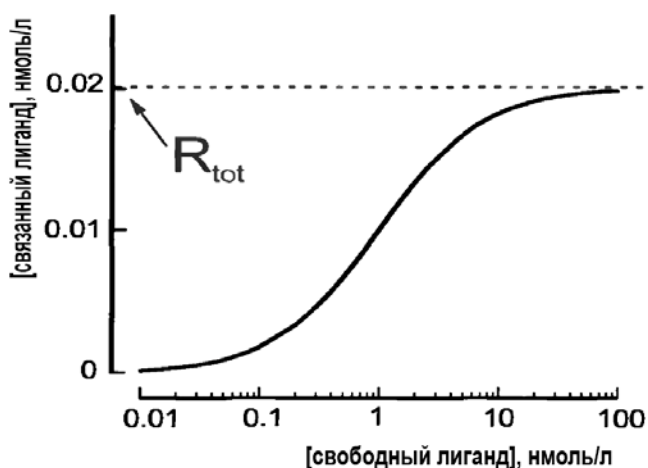


Рис. 72 б. Полулогарифмический график зависимости концентрации связанного с клеткой гормона (линейная шкала ординат) от концентрации свободного лиганда (логарифмическая шкала абсцисс)

Наряду с константой диссоциации (K_D), процесс взаимодействия гормона (лиганда) с рецептором характеризуется параметром EC_{50} . EC_{50} обозначает концентрацию гормона, которая вызывает полумаксимальный метаболический эффект. Таким образом, два этих показателя (K_D и EC_{50}) отражают разные направления в оценке клеточного ответа на действие гормона. Если K_D характеризует аффинность связывания гормона с рецептором в состоянии равновесия, то EC_{50} отражает метаболический результат действия регуляторного сигнала (гормона). **Важно помнить, что этот результат складывается из множества событий, включая изменения каталитической активности ферментов, что далеко не всегда строго линейно степени оккупации (степени занятости) рецепторов гормонами.** Исследования показали, что концентрация гормона, позволяющая получить полумаксимальный метаболический эффект, может быть в 100 раз меньше таковой, необходимой для 50 % насыщения рецепторов. Например, максимальная скорость окисления глюкозы в адипоцитах, стимулированная инсулином, получена при концентрации гормона, позволяющей занять только 2–3 % рецепторов.

Таким образом, **рецепторы не являются статичными компонентами клетки**, они всегда находятся в динамическом функциональном состоянии, на которое влияют как внешние, так и внутриклеточные факторы.

Молекулы, являющиеся вторичными мессенджерами, и их краткая характеристика

Вторичные мессенджеры – небольшие молекулы, быстро и в больших количествах синтезируются внутри клетки в ответ на активацию рецептора. **Служат для внутриклеточной передачи и усиления сигнала к исполнительным молекулам.** Действуют в течение короткого времени и после достижения эффекта инактивируются различными способами.

Основные свойства вторичных мессенджеров:

1. Имеют относительно небольшую молекулярную массу (по сравнению с биополимерами) и гидрофильны, что позволяет мессенджеру быстро диффундировать по цитоплазме.

2. Способны быстро разрушаться (после трансдукции сигнала к исполнительным молекулам) либо, как ионы Ca^{2+} , быстро откачиваться из цитоплазмы до достижения ими исходной концентрации – 10^{-7} М.

цАМФ был открыт первым из семейства вторичных мессенджеров, в которое сегодня включены следующие представители:

1. Циклический-3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ, рис. 70) синтезируется *аденилатциклазой*, которая связана с цитоплазматической мембраной. *Аденилатциклаза* активируется с помощью разновидности Gs-белка («s» от *stimulation*), который переходит в свою биоактивную форму вследствие активации рецептора, относящегося к классу рецепторов, сопряженных с G-белком. Синтез цАМФ происходит быстро, но не продолжительно. Мишенью цАМФ является *протеинкиназа А*. цАМФ инактивируется внутриклеточной *цАМФ-фосфодиэстеразой*, которая разрушает цАМФ до обычного АМФ.

С работой цАМФ-зависимых систем внутриклеточной сигнализации непосредственно связан механизм патогенного действия возбудителя холеры – кишечной бактерии *Vibrio cholerae*. Бактериальный токсин является ферментом, который, оказавшись в клетке кишечного эпителия, присоединяет АДФ к гетеротримерному G-белку (Gs). В результате этого происходит блокирование гидролиза ГТФ до ГДФ в нуклеотид-связывающем центре Gs. Это приводит к «фиксированию» белка Gs в активном состоянии: он перманентно стимулирует аденилатциклазу, и концентрация цАМФ в клетке нарастает. Как следствие этого, открытие всех цАМФ-управляемых каналов, и клетка теряет ионы совместно с водой, которая образует их гидратные оболочки. Происходит несовместимое с жизнью обезвоживание организма больного.

2. Циклический-3',5'-гуанозинмонофосфат (цГМФ, рис. 73) синтезируется двумя разновидностями гуанилатциклазы – **мембранной** и **растворимой в цитоплазме**. Активаторами связанного с мембраной фермента являются **артериальный натрийуретический фактор** и **кишечный пептид – гуанилин**. Лиганд растворимой формы – **внутриклеточный оксид азота (NO)**.

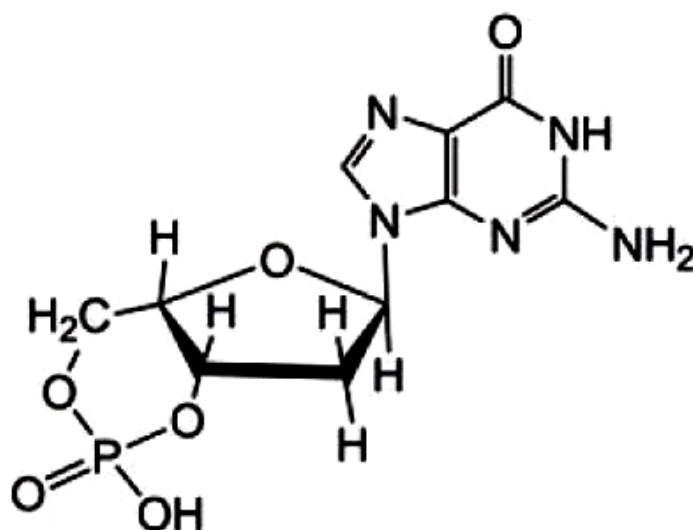


Рис. 73. Структура молекулы циклического-3',5'-гуанозин монофосфата (цГМФ)

3. Диацилглицерол (ДАГ). Образуется с участием **фосфолипазы С (ФЛазы С)**, которую активирует особая форма G-белка – **Gq** (рис. 74). В результате отщепления от мембранного **фосфатидилинозитолбисфосфата (ФИФ2)** его головки – **инозитола**. Вследствие **высокой гидрофобности** ДАГ остается внутри мембраны, где взаимодействует с серин-треониновой **протеинкиназой С (ПКС)** и активирует её. Регуляторный домен **ПКС** содержит особые структуры («цинковые пальцы»), образованные фрагментами пептидной цепи, богатыми цистеином, и содержащими 2 иона цинка. «Цинковые пальцы» участвуют в связывании ДАГ с **протеинкиназой С**. Неактивная **ПКС** находится в цитоплазме. В результате образования комплекса с Ca^{2+} киназа изменяет конформацию, что увеличивает её сродство к фосфатидилсерину (**ФС**): притягиваются противоположные заряды. Благодаря этому **ПКС** доставляется во внутриклеточный слой плазматической мембраны и удерживается там за счет ионных взаимодействий с несущими отрицательный заряд головками **ФС**, после чего активируется под влиянием ДАГ.

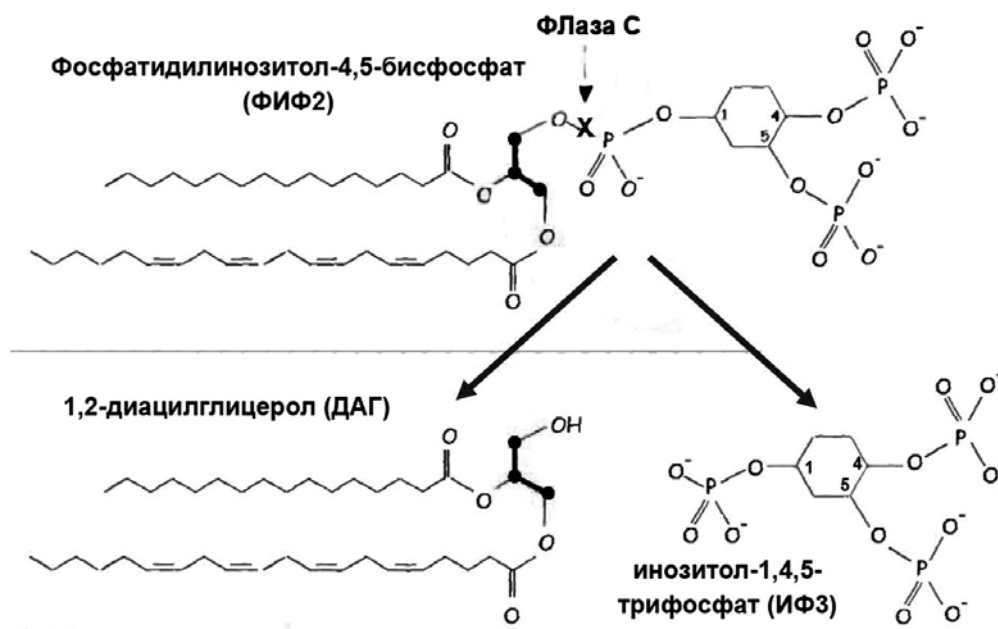


Рис. 74. Образование диацилглицерола и инозитолтрифосфата с участием фосфолипазы С

В молекуле ФИФ2 выделен углеродный «скелет» глицерола

4. Инозитол-3-фосфат (ИФ3) – второй продукт, образуемый **ФЛазой С** (рис. 74). **ИФ3** представляет собой отщепленный головной конец **ФИФ2**. Благодаря наличию отрицательного заряда **ИФ3** гидрофилен. Он диффундирует по цитоплазме и связывается с **ИФ3-чувствительными Ca^{2+} -каналами** мембран эндоплазматического ретикулума, стимулируя выход ионов Ca^{2+} в цитоплазму.

5. Ионы Ca^{2+} . Концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме поддерживается на низком уровне = 10^{-7} М. Это существенно меньше, чем во внеклеточном пространстве. Низкая концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме обеспечивается рабо-

той АТФ-зависимых Ca^{2+} -насосов, локализованных в мембранах эндоплазматического ретикулума, митохондрий и в цитоплазматической мембране. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (обычно до 10^{-6} М) сопровождается запуском многих метаболических процессов.

В клетках нервной системы деполяризация нервного волокна вызывает приток ионов Ca^{2+} , что стимулирует выделение нейромедиатора (ацетилхолина) в синаптическую щель. Ca^{2+} поступает в цитозоль из внеклеточного пространства посредством потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, которые открываются в ответ на деполяризацию мембраны.

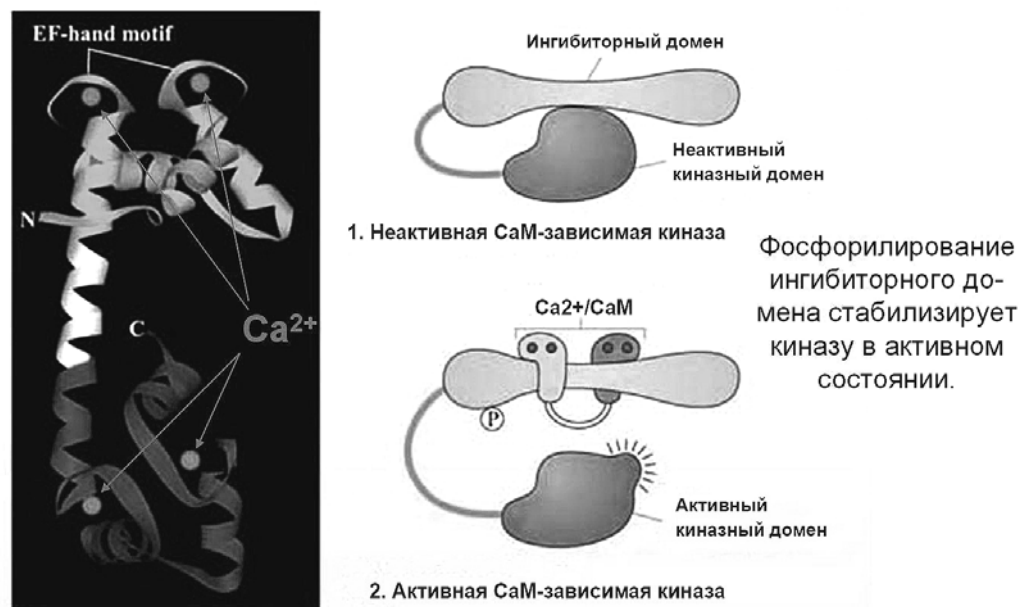


Рис. 75. Роль кальмодулина (CaM) в активации кальмодулин-зависимой протеинкиназы

В левой части рисунка представлена локализация Ca^{2+} -связывающих сайтов в молекуле CaM. Существуют специфические киназы, фосфорилирующие ингибиторный домен фермента после его связывания с CaM (правая часть рисунка). Это позволяет CaM-зависимой киназе сохранять активность даже в случае диссоциации CaM и ингибиторного домена. Полную инактивацию CaM-зависимой киназы вызывает специфическая фосфатаза, которая отщепляет фосфорильную группу от ингибиторного домена.

Во всех клетках повышение концентрации ионов Ca^{2+} происходит в ответ на связывание лиганда с рецепторами клеточной поверхности, относящимися к классу рецепторов, сопряженных с G-белком. В результате появления вторичного мессенджера – **инозитол-3-фосфата (ИФ3)** – ионы Ca^{2+} начинают поступать в цитозоль из эндоплазматического ретикулума. Ионы Ca^{2+} действуют:

а) прямо, непосредственно связываясь со специфическими сайтами в составе молекул протеинкиназ, образующих определенное семейство, представителем которого является **протеинкиназа C**;

б) опосредованно, взаимодействуя сначала с широко распространенным Ca^{2+} -связывающим белком **кальмодулином (СаМ)**. СаМ имеет 4 высокоаффинных центра связывания ионов Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} -СаМ активирует протеинкиназы, принадлежащие к другому семейству: к семейству **кальмодулин-зависимых протеинкиназ** (рис. 75).

Например, в мышечных клетках СаМ является активатором **киназы гликогенфосфорилазы b**. Это означает, что ионы Ca^{2+} необходимы не только для сокращения мышц, но они участвуют также в мобилизации запасов мышечного гликогена, способствуя обеспечению энергией процесс мышечной работы.

Следует также рассмотреть явление **осцилляции внутриклеточного кальция**. Взаимодействие между Ca^{2+} -каналами цитоплазматической и внутриклеточных мембран, кальциевыми насосами, а также кальций-связывающими белками клетки приводит к **осцилляциям ионов Ca^{2+}** , что следует понимать, как **периодические флуктуации (изменения) его концентрации** в цитоплазме. В невозбудимых (неэлектрогенных) клетках, то есть в таких, которым присущ только потенциал покоя, главным триггером («включателем») осцилляций ионов кальция является **инозитолтрифосфат (ИФ3)** (подробно см. лекцию 8). Триггер (от англ. *trigger* – спусковой крючок) в общем смысле – устройство, приводящее в действие (включающее) некую систему. Как было сказано выше, **ИФ3** образуется из мембранного **фосфатидилинозитол-бисфосфата (ФИФ2)** в результате активации **ФЛазы C**. Гидрофильный **ИФ3** выходит из плазматической мембраны в цитозоль и за несколько десятков секунд диффундирует к мембранам эндоплазматического ретикулума. В мембранах ретикулума находятся **ИФ3-чувствительные Ca^{2+} -каналы**, которые в ответ на связывание с **ИФ3** открываются, и ионы Ca^{2+} выходят в цитоплазму по градиенту концентрации. Происходит локальное повышение ионов Ca^{2+} , соответствующее позициям ИФ3-чувствительных Ca^{2+} -каналов в мембране ретикулума. Полагают, что ионы Ca^{2+} , вышедшие вблизи соответствующего участка мембраны ретикулума, диффундируют вдоль этой мембраны, что способствует повышению чувствительности Ca^{2+} -каналов к **ИФ3** и формирует перемещение **фронта « Ca^{2+} -волны»**. Благодаря этому генерируются всё новые точки выброса ионов из ретикулума. Таким образом, «**волна**» **кальциевой осцилляции** распространяется не только внутри клетки, но и по межклеточным щелевым контактам в соседние клетки.

Активация **ФЛазы C** и образование **ИФ3** происходят в ответ на взаимодействие ряда гормонов и факторов роста с поверхностными рецепторами клетки. Важно помнить, что эти первичные мессенджеры влияют главным образом не на амплитуду повышения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , а **увеличивают частоту её флуктуации**: от одного колебания в минуту до нескольких колебаний в секунду. Установлено, что Ca^{2+} -зависимые эффекты гормонов и факторов роста прямо пропорциональны частоте флуктуации цитоплазматического Ca^{2+} . Полагают, что при высокой частоте осцилляций увеличивается вероятность насыщения кальцием Ca^{2+} -связывающих белков. Диссоциация Ca^{2+} из высокоаффинных сайтов кальций-связывающих белков происходит за минуты, в то время как Ca^{2+} в цитоплазме осциллирует существенно быстрее. В этом

причина того, что кальций-связывающие белки воспринимают «частотную составляющую» и трансформируют её в медленно развивающиеся (минуты – часы) изменения метаболизма. Этот механизм схематично представлен на рис. 76:

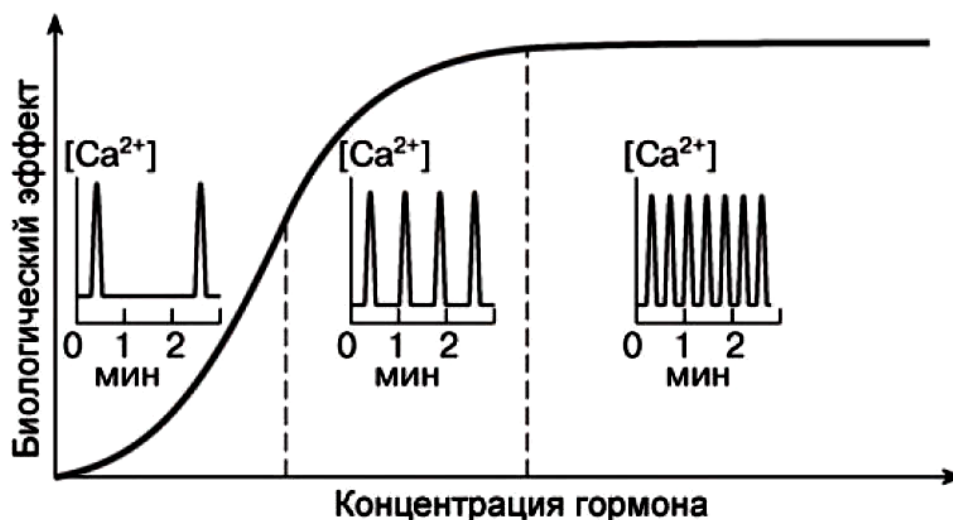


Рис. 76. Зависимость частоты флуктуации концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и величины биологического эффекта, вызываемого ионами Ca^{2+} , от концентрации гормона

На маленьких графиках показано увеличение частоты флуктуаций внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} .

6. Оксид азота (NO). Факт, согласно которому NO является вторичным мессенджером, был установлен в 1987 году благодаря работам Роберта Ферчготта (Robert Furchgott), который изучал механизм участия эндотелиальных клеток в расширении кровеносных сосудов. Первоначально Ферчготт выделил «сосудорасширяющий эндотелиальный фактор» и вскоре установил, что этот фактор является оксидом азота. Его открытие позволило объяснить известное не одно десятилетие терапевтическое действие нитроглицерина при стенокардии. Нитроглицерин в кровотоке медленно распадается, образуя NO, который и расширяет коронарные сосуды.

NO образуется в результате окисления аргинина, катализируемого уникальным ферментом – **NO-синтазой**. **NO-синтаза** существует в трех изоформах: две формы конститутивные – **eNOS** (эндотелий сосудов) и **nNOS** (нервная система) – и одна – индуцибельная (**iNOS**). Последняя появляется при воспалительных, иммунных и некоторых других реакциях в макрофагах, а по некоторым данным – и в ряде других клеток (например, в гепатоцитах). Индуцибельная форма **NOS** начинает проявлять активность по прошествии 6–8 часов после воздействия на клетку и продуцирует в 100–1000 раз больше NO, чем конститутивные формы.

Оксиду азота принадлежит своеобразный «рекорд» – он имеет самую маленькую молекулярную массу среди известных молекул – вторичных мессенджеров. **NO** – газообразное соединение, которое является свободным радика-

лом (имеет неспаренный электрон), что придает ему высокую реакционную способность. Он обладает всеми свойствами классического вторичного мессенджера: хорошо растворим в воде и липидах, быстро диффундирует, не депонируется и является короткоживущей молекулой (время жизни около 6–10 секунд). При участии кислорода и воды **NO** превращается в нитраты и нитриты. Благодаря способности легко пересекать мембрану и попадать в соседние клетки без участия рецепторов **NO** может действовать как аутокринно (в той же клетке), так и паракринно (диффундирует в окружающие клетки).

Мишенью NO является растворимая (цитоплазматическая) *гуанилатциклаза*. Необычность этого фермента заключается в том, что он катализирует образование вторичного мессенджера – цГМФ, но активируется другим вторичным мессенджером – NO. Мишенью цГМФ, в свою очередь, является *протеинкиназа G (PKG)*.

Два основных способа передачи сигнала от активированного лигандом рецептора на внутриклеточную исполнительную молекулу

1. Передача сигнала путем фосфорилирования – дефосфорилирования. Первое происходит с участием протеинкиназ, второе – с участием протеинфосфатаз. Протеинкиназы фосфорилируют либо остатки тирозина, либо остатки серина и треонина. Существует небольшое количество протеинкиназ, способных фосфорилировать все три остатка аминокислот (тирозина, серина и треонина).

Основные функции фосфорилирования в процессе передачи регуляторного сигнала:

а) Фосфорилирование **изменяет конформацию белков**, что у ферментов вызывает изменение активности (в т. ч. – активация изначально неактивных киназ). Каждая фосфатная группа приносит с собой два отрицательных заряда.

б) Фосфорилирование (особенно это характерно для фосфорилирования остатков тирозина) создает в молекулах белков **«стыковочные участки»**, в качестве которых и служат фосфорилированные остатки тирозина (фосфотирозины). Эти участки распознаются другими белками, которые содержат особые **«узнающие домены» – SH2-домены**. Белки, содержащие SH2-домены, «узнают» фосфотирозины, принадлежащие другим белкам (белок-белковые взаимодействия), и связываются с ними. Так, в процесс передачи сигнала вовлекаются все новые белки (белок-белковые взаимодействия в трансдукции сигнала внутри клетки). Часто одна киназа специфически фосфорилирует другую киназу, активируя её. По такому принципу формируются **киназные каскады** (например, киназный каскад в составе **МАПК сигнального пути**).

Роль дефосфорилирования

Как киназы специфичны для определенных аминокислот, так и специфичны протеинфосфатазы: **тирозиновые фосфатазы и серин-треониновые фосфатазы**. Как правило, специфичность фосфатаз менее выражена, чем у протеинкиназ.

2. Передача регуляторного сигнала через ГТФ-связывающие белки: гетеротримерные G-белки и мономерный белок Ras (от Rat sarcoma). Оба белка **активны**, когда они связаны с ГТФ, и **неактивны**, когда связаны с ГДФ. Само название (**G-белки**) произошло от guanine nucleotides.

а) G-белки. Это гетеротримеры, состоящие из α -, β - и γ -субъединиц, связанных между собой нековалентно. **G-белки** связаны с внутренним монослоем плазматической мембраны. **G-белки** участвуют в передаче сигнала от активированного лигандом **рецептора, сопряженного с G-белком** (G protein-coupled receptor – **GPCR**). Результатом активации GPCR становится замена ГДФ в составе α -субъединицы на ГТФ, переход субъединицы в активную конформацию и её отсоединение от димера β, γ -субъединиц. Благодаря существованию нескольких форм α -субъединицы, последние могут выполнять различные функции: активировать (G_s) или ингибировать (G_i) **аденилатциклазу**, активировать **фосфолипазу C** (G_q) и др.

G-белки обладают **собственной ГТФазной активностью**, что лежит в основе механизма инактивации α -субъединицы **G-белков**. В результате расщепления ГТФ в составе субъединицы и замены ГТФ на ГДФ **передача сигнала «выключается»**.

б) Мономерные G-белки (малые ГТФазы). Эти белки, подобно гетеротримерным G-белкам, связаны с внутренним монослоем плазматической мембраны. **Мономерные G-белки** в активном состоянии также связаны с ГТФ. Гидролиз ГТФ до ГДФ с участием собственной ГТФазной активности инактивирует белок, и передача сигнала с его участием прекращается.

Представителями этого семейства белков являются: **Ras** – участвует в стимуляции роста и дифференциации клетки; **Rho** – необходим для формирования активного цитоскелета; **Rab** – обеспечивает транспорт эндоцитозных пузырьков в клетке; **ARF** – формирование эндоцитозных пузырьков; **Ran** – необходим для транспорта белков в ядро клетки.

В частности, **белок Ras** является ключевым элементом в запуске пролиферации клеток в ответ на сигнал, доставляемый факторами роста. Факторы роста действуют посредством связывания с рецепторами, обладающими собственной тирозинкиназной активностью или рецепторными тирозинкиназами (receptor tyrosine kinase – **RTK**). В результате активации белок **Ras** привлекает (рекрутирует) из цитозоля неактивную **киназу Raf**, **связывается с ней** и активирует фосфорилированием. **Киназа Raf** – первая из трёх киназ, которые образуют **МАПК сигнальный путь (каскад)**. Этот путь обеспечивает рост и пролиферацию клеток, а также поддерживает их жизнеспособность. Ряд причин может приводить к нарушению работы этого сигнального пути, что сопровождается его перманентной стимуляцией. Результат – неконтролируемое размножение клеток, что является причиной возникновения некоторых видов опухолей.

Основные структурные элементы мембранных рецепторов (рецепторов клеточной поверхности)

Рецепторы клеточной поверхности являются трансмембранными гликопротеидами. Распознав специфический лиганд (первичный мессенджер) и связавшись с ним, рецептор изменяет свою конформацию, что означает его переход в активированную форму. Только после активации рецептора становится возможной передача регуляторного сигнала внутрь клетки на исполнительную молекулу, что происходит с помощью того или иного вторичного мессенджера либо белков-посредников.

Мембранные рецепторы содержат три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный (цитоплазматический) домены.

Внеклеточный домен. Его формирует N-конец полипептидной цепи, функция которого состоит в распознавании молекулы первичного мессенджера и её связывании.

Трансмембранный домен. Состоит из одной или нескольких α -спиралей. Например, ацетилхолиновый рецептор формирует трансмембранную пору или ионный канал. В результате связывания лиганда трансмембранный домен меняет свою конформацию, влияя далее на конформацию внутриклеточного домена. В случае лиганд-чувствительного ионного канала на короткое время создаётся конформация, позволяющая пропустить специфический ион.

Внутриклеточный (цитоплазматический) домен. В формировании участвует C-конец полипептидной цепи. Функция домена состоит в передаче полученного регуляторного сигнала непосредственно на внутриклеточные элементы, что реализуется двумя путями:

- цитоплазматический домен формирует контакт с внутриклеточными сигнальными белками-посредниками, которые доставляют сигнал к месту – к исполнительной молекуле;
- цитоплазматический домен либо связывается с внутриклеточным ферментом и активирует его, либо в цитоплазматическом домене «включается» собственная ферментативная активность.

Классификация рецепторов клеточной поверхности или рецепторов клеточной мембраны, опосредующих метаболическую регуляцию

Унифицированной классификации рецепторов клеточной поверхности (подобно Классификации ферментов) не существует. В литературе встречается несколько довольно близких версий классификации рецепторов. Порядковая нумерация классов рецепторов во всех версиях произвольная. Мы предлагаем следующую версию классификации, охватывающую все известные типы рецепторов:

1. Рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein-coupled receptors – GPCR), или семиспиральные рецепторы. Второй вариант названия исходит из того, что полипептидная цепь молекулы рецептора семикратно пересекает клеточную мембрану в поперечном направлении, а трансмембранные участки цепи являются α -спиралями.

2. Каталитические рецепторы обладают **собственной тирозин- и серин/треонин-протеинкиназной активностью** либо **гуанилатциклазной активностью**.

3. Рецепторы не каталитические. После связывания и активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозинowymi протеинкиназами и активировать их.

4. Регулируемые ионные каналы (лиганд-активируемые или лиганд-чувствительные ионные каналы).

Рассмотрим детально каждый из 4-х классов рецепторов клеточной поверхности.

1 класс. Рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein-coupled receptors – GPCR), или семиспиральные рецепторы.

Молекула рецептора образована одной полипептидной цепью, 7 раз пронизывающей мембрану. Во внеклеточную среду обращен N-конец полипептидной цепи рецептора, в сторону цитоплазмы – С-конец, который образует цитозольный домен рецептора, не обладающий каталитической активностью. Трансмембранные фрагменты (домены) представляют собой α -спирали, состоящие из 20–28 гидрофобных аминокислот, что достаточно для пересечения толщины мембраны. Строение GPCR схематично представлено на рис. 75 и 76.

GPCR – наиболее эволюционно древний класс рецепторов. Для них известно около тысячи различных лигандов. К числу **GPCR** относятся также «орфан-рецепторы» (от *англ. orphan* – сирота). Это группа идентифицированных рецепторов, но лиганды для них не установлены. Типичные лиганды **GPCR**: адреналин, норадреналин, пептидные гормоны (в т. ч. глюкагон), а также нейропептиды, дофамин и опиоиды.

После активации рецептора его цитоплазматический домен обретает способность взаимодействовать с гетеротримерными **G-белками**, которые связаны с внутренним липидным слоем плазматической мембраны, и активировать их. **G-белки** состоят из трех субъединиц: α -, β - и γ -.

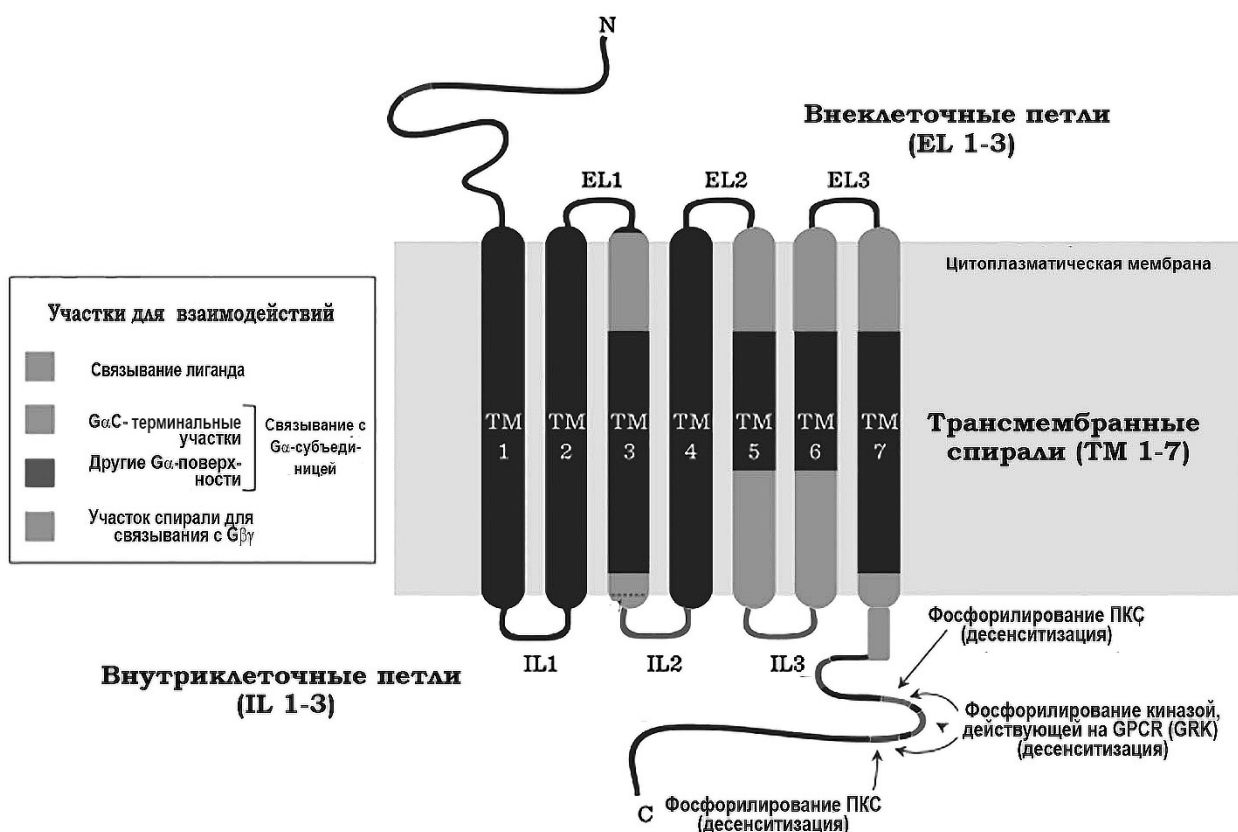


Рис. 77. Плоскостная модель строения GPCR

В связывании лиганда участвуют несколько обращенных во внеклеточное пространство оконечностей трансмембранных спиралей: **TM3, TM5, TM6** и **TM7** (на схеме отображены светло-серым тоном). Во взаимодействии с G-белком участвуют несколько обращенных во внутриклеточное пространство оконечностей трансмембранных спиралей: **TM3, TM5, TM6** и **TM7** (на схеме обозначены светло-серым тоном) – и две внутриклеточные петли: **IL2** и **IL3**. Десенситизация GPCR происходит в результате фосфорилирования остатков серина и треонина, принадлежащих трем специальным сайтам в составе цитозольного домена рецептора. Фосфорилирование двух из этих сайтов происходит под действием **протеинкиназы C (PKC)**. Третий сайт фосфорилируется с участием другой протеинкиназы – **GRK**. Её название можно перевести с английского как киназа, действующая на GPCR.

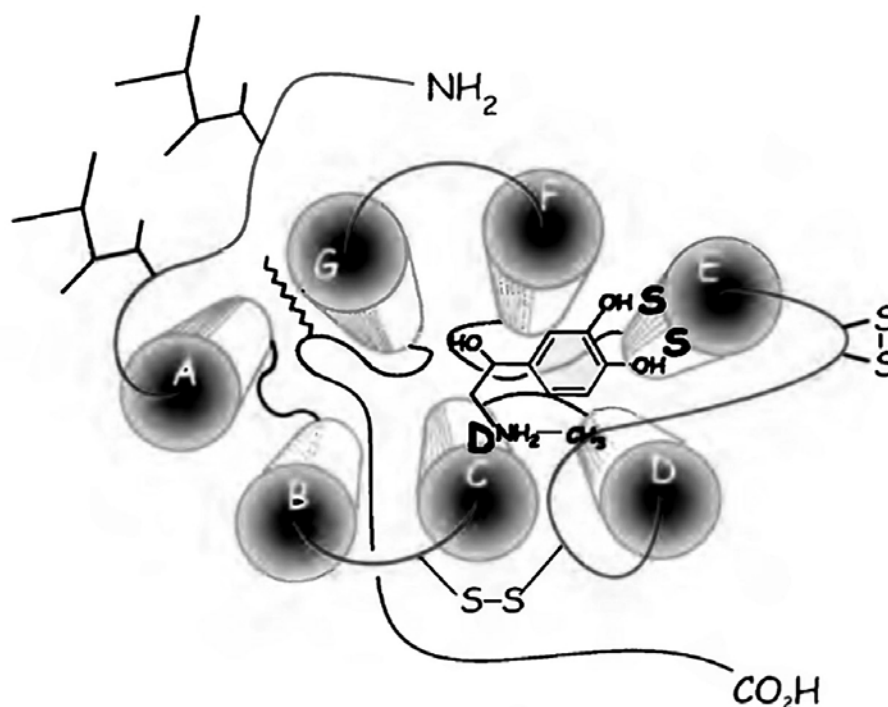


Рис. 78. Трехмерная модель строения GPCR

Плоскость страницы соответствует наружной поверхности клеточной мембраны. Во внеклеточное пространство обращен N-конец полипептидной цепи, С-конец – во внутриклеточное пространство. Цилиндры – трансмембранные α -спиральные участки (домены) цепи. Латинскими буквами обозначена последовательность α -спиральных участков в первичной структуре полипептидной цепи рецептора. Показаны обращенные во внеклеточное пространство сайты молекулы рецептора, участвующие в связывании адреналина.

Активация **G-белков** приводит к диссоциации α -субъединицы от β, γ -димера. Основную роль оказывает α -субъединица. Её важнейшие разновидности:

а) **Gs-** и **Gi-белки** (содержат **G α s-** и **G α i-**субъединицы; от «s» – **stimulation** и «i» – **inhibition** соответственно). Стимулируют и ингибируют соответственно **аденилатциклазу**, которая синтезирует цАМФ.

б) **Gq-белок** (содержит **G α q-**субъединицы). Он активирует **Флазу C**, которая, воздействуя на фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (**ФИФ2**), образует два продукта – вторичных мессенджера: диацилглицерол (**ДАГ**) и инозитол-3,4,5-трифосфат (**ИФ3**).

2 класс. Каталитические рецепторы обладают собственной **тирозин-** или **серин-треонинкиназной** активностью (**рецептор-ассоциированные киназы**), а также **рецепторы с гуанилатциклазной активностью**.

Это вторая по численности группа рецепторов после GPCR. Рецепторы имеют один трансмембранный домен. В результате связывания с лигандом конформация всей молекулы рецептора меняется, что приводит к димеризации рецептора и «включению» во внутриклеточных доменах собственной ферментативной активности.

2 а. Рецепторы с тирозинкиназной активностью. Важнейшие лиганды: **инсулин** и различные **факторы роста**. Характерное проявление активации этих рецепторов и изменения конформации состоит в образовании **димеров** (димеризация рецепторов). Исключение составляет **рецептор инсулина** – изначально является димером, состоит из α -субъединицы (обеспечивают распознавание и связывание гормона) и β -субъединицы. В димере инсулинового рецептора субъединицы соединены -S-S- мостиками.

Возможно как формирование **гомодимеров** (позволяет достигнуть простое усиление сигнала), так и **гетеродимеров** – когда димер формируют два разных подтипа рецепторов, относящихся к одному классу. Этим достигается увеличение числа внутриклеточных сигнальных путей, запускаемых одним лигандом.

В результате димеризации рецепторов и изменения конформации, в цитозольных доменах «включается» тирозинкиназная активность. Далее происходит **перекрёстное аутофосфорилирование** остатков тирозина цитозольных доменов. В результате на их поверхности появляются фосфотирозины («стыковочные участки», или «докинг-участки»), по которым связываются различные внутриклеточные сигнальные белки-посредники, содержащие **SH2-домены** (от *англ. Src homology domain*), «узнающие домены», которые различают остатки фосфотирозина.

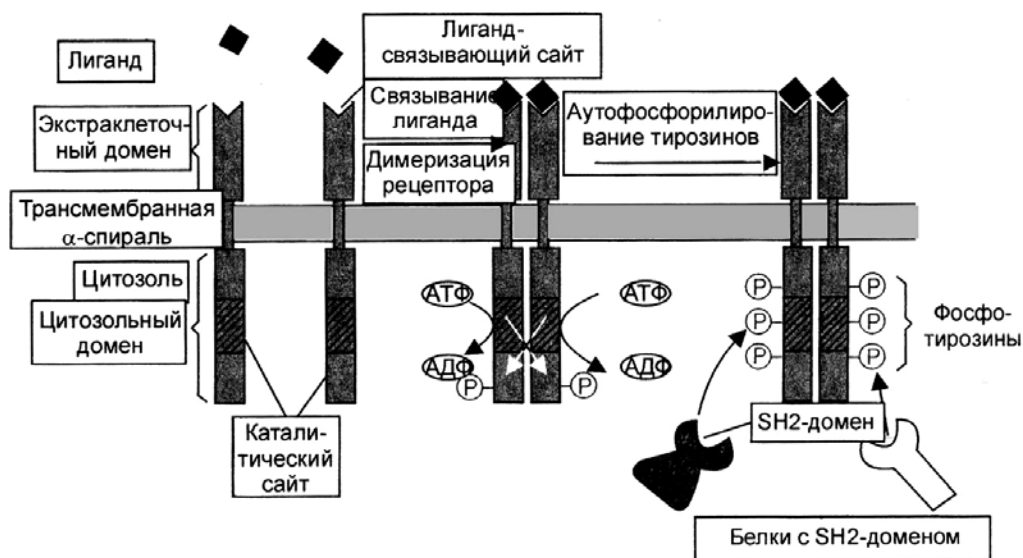


Рис. 79. Схема активации рецепторов с тирозинкиназной активностью
[Пальцев М.А., Иванов А.А., 2003]

Подробная характеристика «узнающих доменов» представлена ниже в специальном разделе на с. 169–172.

Тирозинкиназную активность рецептора можно «выключить» в результате фосфорилирования его цитоплазматического домена по остаткам **серина** и **треонина** под действием **протеинкиназ A и C**.

2 б. Рецепторы с гунилатциклазной (ГЦ) активностью. Рецептор катализирует синтез вторичного мессенджера цГМФ (гуанозин-3'5'-

монофосфата). Рецептор локализован в цитоплазматической мембране. Активностью *гуанилатциклазы* обладает его цитозольный домен (рис. 80):

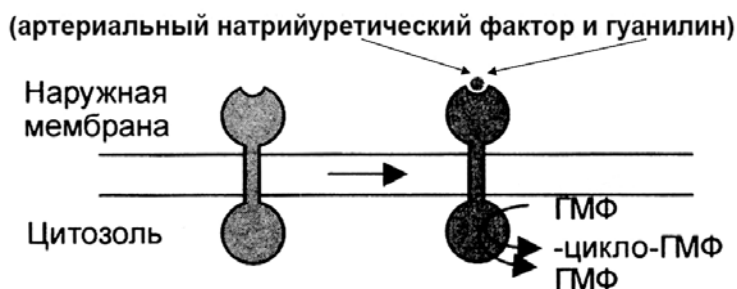


Рис. 80. Схема функционирования рецепторной гуанилатциклазы
[Пальцев М.А. и др., 2003]

Рецептор имеет две изоформы.

Изоформа I: лигандом является **артериальный натрийуретический фактор (АНФ)**. АНФ высвобождается из эндотелиоцитов предсердий, когда существенно увеличивается объем перекачиваемой сердцем крови. АНФ действует на клетки собирательных трубочек почек и увеличивает в них концентрацию цГМФ. В результате почки усиливают выделение ионов Na^+ и вместе с ними воды. Потеря воды снижает объем крови, что ослабляет стимул, вызвавший выделение АНФ.

В кровеносных сосудах цГМФ действует на гладкую мускулатуру, вызывает **вазодилатацию**.

Изоформа II: лигандом является **гуанилин**. Это пептид, выделяемый эпителиоцитами кишечника. Гуанилин регулирует выделение ионов Cl^- в кишечнике. **Рецептор гуанилина** способен взаимодействовать с **эндетоксином *E. coli*** и других грамотрицательных бактерий. В результате усиливается секреция ионов Cl^- , что уменьшает реабсорбцию воды из кишечника и приводит к возникновению диареи.

цГМФ активирует **цГМФ-зависимую протеинкиназу (PKG, ПКГ)**, которая фосфорилирует в белках-мишенях остатки **серина** и **треонина**. Разрушается цГМФ под действием специфической **цГМФ-фосфодиэстеразы**.

3 класс. Рецепторы не каталитические. Типичными лигандами для этого класса рецепторов являются цитокины, вследствие чего их называют также **рецепторами цитокинов**. Связывание лиганда с рецептором изменяет его конформацию и вызывает димеризацию. После активации лигандом цитозольные домены рецептора приобретают способность нековалентно взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами – происходят **рекрутирование внутриклеточных киназ и их активация**. К числу таких киназ относятся:

- Тирозиновая **киназа Src** (прикреплена к внутреннему слою цитоплазматической мембраны).
- Тирозиновая **киназа**, носящая название **Янус-киназа (*Janus kinase* – JAK)**. В неактивированной цитокином клетке эта киназа в нефосфорилированной (неактивной форме) нековалентно ассоциирована с цитоплазматическим доменом неактивированного лигандом рецептора. Изменение конформации ци-

топлазматического домена рецептора в результате его активации лигандом сообщает домену рецептора способность запускать процесс **аутофосфорилирования JAK**, в результате которого происходит активация киназы. Отличительной чертой строения всех представителей семейства **Янус-киназ** от остальных тирозиновых киназ млекопитающих является наличие **двух доменов: киназного (JH1) и псевдокиназного (JH2)**. Этот факт и послужил основанием для названия фермента именем **двуликого древнегреческого бога Януса**. Строение псевдокиназного домена имеет существенное сходство с киназным доменом, но в нём отсутствуют остатки определенных аминокислот, отвечающие за **фосфотрансферазную (каталитическую) активность**. По-видимому, функция псевдокиназного домена заключается в регуляции каталитической активности **JAK**.

Киназы **Src** и **JAK** фосфорилируют остатки **тирозина** в составе цитозольных доменов рецептора. Фосфотирозины необходимы для связывания внутриклеточных белков-посредников (имеющих **SH2-домены**), которые передают сигнал «вниз по течению» к исполнительным молекулам.

Запускаемый цитокином сигнальный путь JAK-STAT. Неактивный внутриклеточный белок **STAT** (signal transducer and activator transcription) находится в цитоплазме в форме неактивного (нефосфорилированного) мономера. После активации рецептора и **JAK** последняя фосфорилирует остатки тирозина на цитозольных доменах рецептора. Белки **STAT**, благодаря наличию в их составе **SH2-доменов**, связываются с этими фосфотирозинами, что создаёт условия для фосфорилирования **STAT** под действием **JAK**. Таким образом, **JAK** сначала фосфорилирует остатки тирозина в рецепторе, а затем в составе белка **STAT**. Активированный фосфорилированием **STAT** образует **гомодимер**, который проникает в ядро и вызывает экспрессию специфических генов (рис. 81):

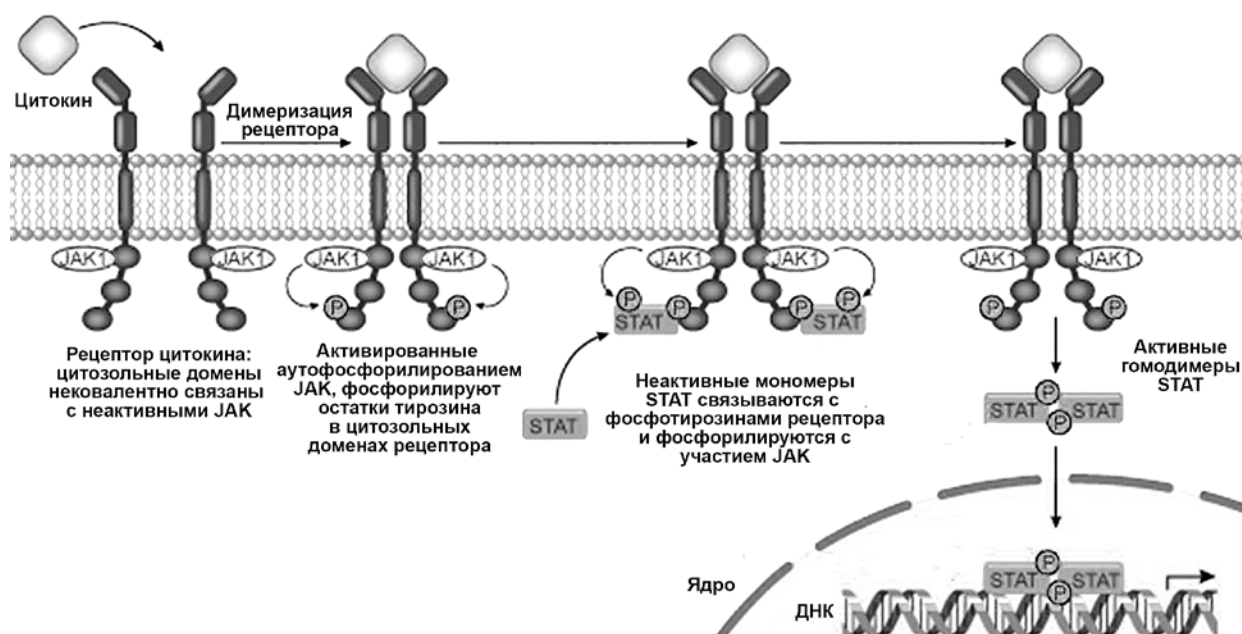


Рис. 81. Схема активации JAK-STAT сигнального пути под влиянием цитокина

4 класс. Регулируемые ионные каналы (лиганд-активируемые ионные каналы или каналы, сопряженные с рецептором). Типичным примером может служить **н-ацетилхолиновый рецептор**.

Молекула рецептора имеет бочкообразный силуэт и образована пятью субъединицами (**2 α , β -, γ - и δ -субъединицы**). В состав каждой субъединицы входит по 4 α -спирали. Их С- и N-концы обращены в цитоплазму. **Субъединицы окружают одну трансмембранную пору**. Есть два участка для связывания двух молекул **ацетилхолина**, расположенных на двух α -субъединицах со стороны поры. Ниже расположена «заслонка», образуемая α -спиралью. При связывании с ацетилхолином рецептор претерпевает конформационную перестройку, что вызывает смещение «заслонки» – пора открывается, и ионы Na^+ входят в цитоплазму. Ионные каналы открываются на несколько миллисекунд, но за это время через каналы проходит поток ионов со скоростью 10 млн ионов/с (рис. 82):

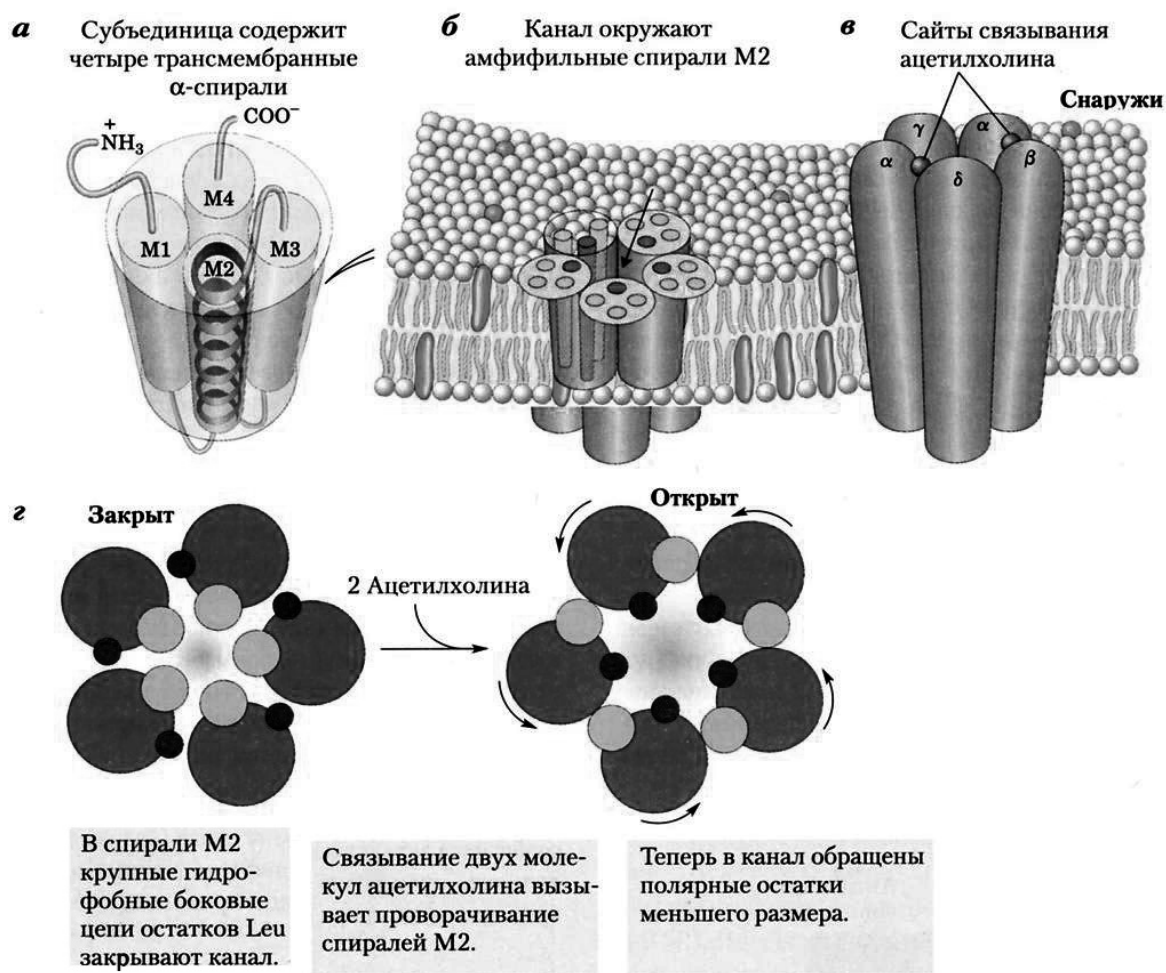


Рис. 82. Схема работы ионного канала, регулируемого н-ацетилхолином [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Связывание лиганда приводит к повороту спирали M2, что увеличивает диаметр канала – открывается проход для ионов

Основные механизмы активации мембранных рецепторов

1. Конформационная перестройка. Наиболее характерна для **GPCR** и **лиганд-активируемых ионных каналов**.
2. Конформационная перестройка, сочетающаяся с димеризацией. Наиболее характерна для **рецепторов с собственной ферментативной активностью** и **не каталитических рецепторов**.

Основные механизмы инактивации мембранных рецепторов

1. Деградация лиганда. Например, **холинэстераза** разрушает ацетилхолин, связанный с рецептором.
3. Секвестрация лиганда. Лиганд связывается с внеклеточным белком, содержащим лиганд-связывающий домен. Такой белок удаляет лиганд с рецептора.
4. Инактивация или десенситизация рецептора. **GPCR** может быть фосфорилирован по остаткам серина и треонина в цитозольном домене при помощи внутриклеточной **протеинкиназы С**. По фосфорилированным участкам получает возможность связываться внутриклеточный белок аррестин. Комплекс рецептор-аррестин уже не способен передавать сигнал «вниз по течению» (рис. 83). Комплекс рецептор-аррестин поглощается клеткой путём эндоцитоза.

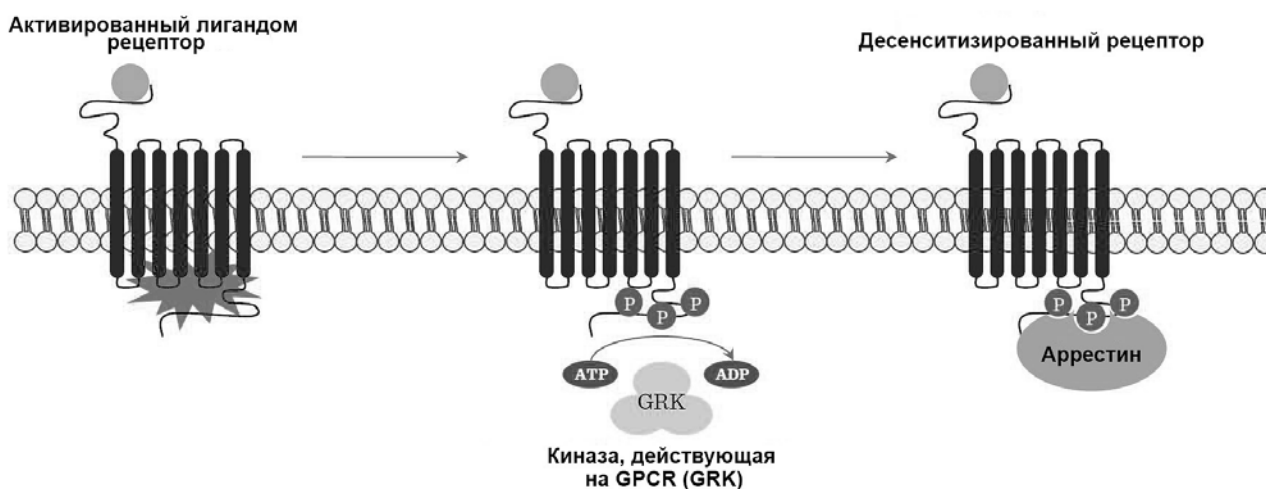


Рис. 83. Схема десенситизации (инактивации) рецептора, сопряженного с G-белком (GPCR)

Основные структурные элементы внутриклеточных рецепторов и механизм их активации лигандом

Внутриклеточные рецепторы связывают малые липофильные молекулы, которые легко преодолевают барьер цитоплазматической мембраны, это стероидные и тиреоидные гормоны, а также витамин D. Локализация: цитоплазма, поверхность ядра и внутриядерное пространство.

Основными элементами внутриклеточных рецепторов являются:

- домен для распознавания и связывания лиганда,
- ДНК-связывающий домен,

- домен активации транскрипции.

В отсутствие лигандов рецепторы находятся в неактивной конформации (поддерживается с помощью ингибирующих белков-шаперонов, относящихся к семейству белков теплового шока (Heat shock proteins)). Связывание лиганда индуцирует активную конформацию рецептора, что сопровождается диссоциацией ингибирующего белка. Активированный лиганд-рецепторный комплекс диффундирует в ядро, где связывается с участком ДНК посредством своего ДНК-связывающего домена. Помимо этого, лиганд-рецепторный комплекс способен связываться с другими белками – белками-коактиваторами транскрипции. Участок ДНК, с которым связывается комплекс лиганд-рецептор, является промотер-регионом таргетного гена и называется **гормон-респонсивным элементом (hormone response element – HRE, рис. 84)**:

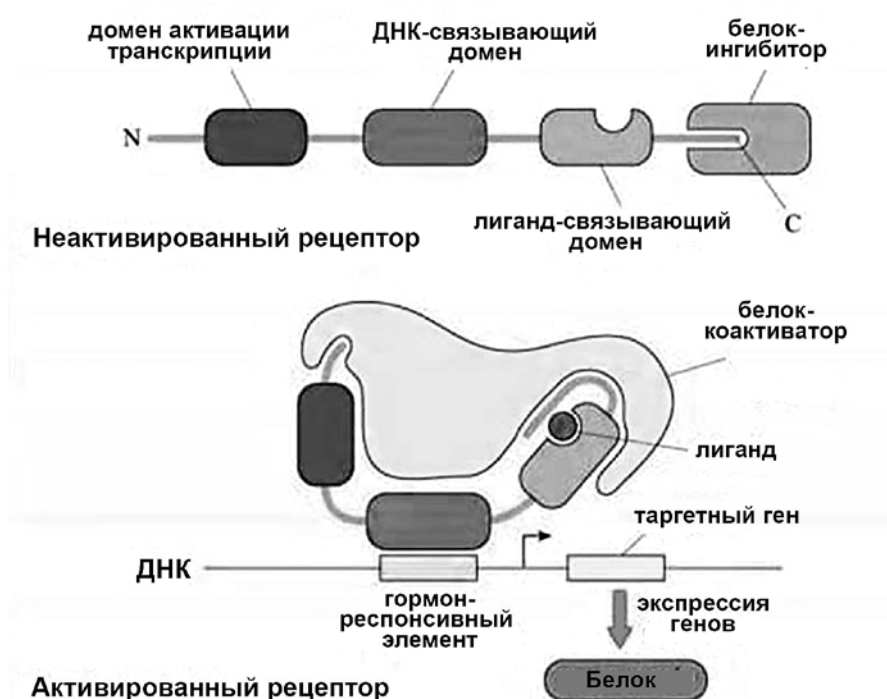


Рис. 84. Структура внутриклеточного рецептора и механизм его активации лигандом

SH2-, SH3- и PH-домены белков-посредников

На внутриклеточном этапе передачи регуляторного сигнала от мембранных рецепторов до исполнительных молекул (ферменты, транскрипционные факторы и др.), помимо вторичных мессенджеров, действует группа специфических белков-посредников, или промежуточных белков. Их функция состоит в том, чтобы **направлять белок-белковые взаимодействия**, которые параллельно с вторичными мессенджерами опосредуют внутриклеточную сигнальную трансдукцию в рамках определенных сигнальных путей. Прежде всего, это сигнальные пути, которые берут свое начало от рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью (рецепторных тирозинкиназ), от рецепторов цитокинов (не

обладающих собственной каталитической активностью) и от рецепторов, сопряжённых с G-белком. Точнее, от β, γ -комплекса, освобождаемого в результате активации гетеротримерного G-белка, выражающейся в его диссоциации на β, γ -комплекс и α -субъединицу.

Среди известных белков-посредников следует выделить те, которые в своем составе содержат особые домены. Эти домены служат для высокоаффинного связывания белков-посредников с определенными мотивами в составе других белков (таргетных белков), формируя тем самым «цепочку» из промежуточных белков – передатчиков сигнала. Полагают, что благодаря этим белок-белковым взаимодействиям происходит как направление сигнала, так и сопряжение между отдельными белками с каталитической активностью, что необходимо для трансдукции регуляторного сигнала. Среди известных доменов, прежде всего, следует рассмотреть домены, которые обозначают как SH2-домены, SH3-домены и РН-домены. Каждый из доменов представлен несколькими классами, отличающимися по своей связывающей специфичности. Специфичность определяется составом аминокислотных остатков, образующих связывающий мотив в составе таргетных белков. Известные белки-посредники (промежуточные белки) можно разделить по крайней мере на две группы:

1. Белки-посредники с каталитической активностью. Помимо различных комплектов из вышеупомянутых доменов, эти белки содержат каталитический домен (протеинкиназный, ФЛазный и др.).

2. Белки-посредники, которые не обладают каталитической активностью. Содержат только различные комплекты из SH2-, SH3- и РН-доменов. Такие белки можно назвать **адаптерными белками**. Они не участвуют непосредственно в передаче сигнала, но обеспечивают образование необходимых для сигнальной трансдукции белок-белковых комплексов, которые «сопрягают», например, цитозольный домен мембранного рецептора с внутриклеточной протеинкиназой.

SH2-домены (Src homology 2 domain), или домены сарк-гомологии-2. Домен назван в связи с тем, что впервые был обнаружен в составе Src-онкопротеинов (произносится «сарк», сокращенно от «саркома»). SH2-домен – структурно консервативный глобулярный белковый домен, состоящий из примерно 100 аминокислот, который локализован в составе N-конца полипептидной цепи белка-посредника.

Функция SH2-доменов состоит в высокоспецифичном распознавании в составе таргетных белков коротких аминокислотных последовательностей (мотивов), содержащих остаток фосфорилированного тирозина (фосфотирозина). Домен образует гидрофобный карман, посредством которого происходит его связывание с фосфотирозином.

Типичным примером белка, содержащего SH2-домен, является протоонкогенная нереперторная тирозиновая *протеинкиназа Src*. Её киназный домен расположен вблизи SH2-домена. Протеинкиназа, помимо SH2-домена, содержит в своем составе также другой тип домена – SH3-домен.

SH3-домены (Src homology 3 domain), или домены сарк-гомологии-3. Это малые белковые домены, состоящие из приблизительно 60 аминокислот и рас-

положенные в составе С-конца полипептидной цепи. Домены служат для распознавания и связывания с богатым пролином коротким мотивом таргетных белков. Мотив представляет собой левозакрученную полипролиновую спираль и взаимодействует с гидрофобным карманом SH3-домена. Как и SH2-домены, SH3-домены широко представлены в адаптерных белках и белках-посредниках с каталитической активностью, в том числе в *киназах* семейства **Src**. SH3-домены участвуют в передаче сигнала от рецепторов с тирозинкиназной активностью. Функции SH3-домена изучены в меньшей степени, чем SH2-домена. Типичный пример адапторного белка, содержащего SH3-домен, – белок Grb2.

Примеры белков-посредников, содержащих SH2- и SH3-домены

1. Белки-посредники с каталитической активностью:

- цитоплазматические *тирозинкиназы* семейства **Src** (один SH2- и два SH3-домена);
- **Флаза C γ** (два SH2-домена и SH3-домен);
- GAP – белок-активатор ГТФазы в белке Ras (SH2-домен и SH3-домен);
- регуляторная субъединица в составе *фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК)* (два SH2-домена и SH3-домен).

2. Адаптерные белки-посредники:

- белок Grb2, связывающийся с рецепторными тирозинкиназами (SH2-домен, два SH3-домена).

Из сказанного выше следует, что практически все белки-посредники содержат SH2-домены (в N-конце полипептидной цепи) и SH3-домены (в С-конце полипептидной цепи) в разном количественном соотношении. Эти два типа доменов выполняют функцию «сцепляющих устройств», которые, благодаря своей связывающей специфичности, исключают ошибочную ориентацию белков-посредников в составе комплексов из промежуточных белков – передатчиков сигнала.

РН-домены (pleckstrin homology domain), или домены плекстриновой гомологии. Название произошло от белка плекстрина, в составе которого были впервые обнаружены эти домены. РН-домен состоит из приблизительно 120 аминокислот. Аминокислотные последовательности РН-доменов разных белков-посредников имеют малое сходство, но образуемые ими третичные структуры гомологичны. РН-домены в составе белков-посредников распознают и связываются с мембранными фосфатидилинозитолами, инозитоловое кольцо которых фосфорилировано по разным позициям: с фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом, фосфатидилинозитол-3,4-бифосфатом и фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом. Показано, что β, γ -субъединица, освобождаемая при диссоциации активирующегося гетеротримерного G-белка, может связываться с РН-доменом в составе **Флазы C β** и активировать её. В целом РН-домены в составе белков-посредников обеспечивают привлечение (рекрутирование) сигнальных белков из цитоплазмы в мембрану и связывание со специфическими сайтами мембраны, что необходимо для их активации.

Примеры белков-посредников, содержащих РН-домены (в том числе SH2- и SH3-домены):

- GAP – белок-активатор *ГТФазы* в белке Ras (один РН-домен; SH2-домен и SH3-домен);
- SOS/GEF (один РН-домен);
- *Флаза С γ* (один РН-домен, два SH2-домена и SH3-домен);
- *ПКВ* (один РН-домен);
- белок IRS-1.

Заключение

Клетка в процессе своей жизнедеятельности в каждый момент времени контактирует с несколькими типами сигнальных молекул. Каждый тип клетки запрограммирован на определенный ответ при воздействии специфической комбинации внеклеточных сигналов. Такая определенность клеточного ответа детерминирована тем, что мембрана содержит набор (комплект, паттерн) определенных рецепторов. Благодаря этому клетка имеет возможность по-разному отвечать на воздействие различных комбинаций сигнальных молекул. Комплект рецепторов для данного типа клеток – некая «постоянная величина», которая сформировалась в ходе эволюции. Количество же рецепторов и их аффинность к лигандам могут изменяться, что является важным элементом регуляции метаболизма.

Концепция о первичных и вторичных мессенджерах родилась в середине 60-х годов прошлого века благодаря многолетним исследованиям Эрла Сазерленда. Он открыл функцию цАМФ и установил её ключевую роль в механизме передачи регуляторного сигнала от гормонов адреналина и глюкагона (первичных мессенджеров) на внутриклеточный ферментативный каскад гликогенфосфоорилазы клеток печени.

В природе взаимодействия первичных мессенджеров с их рецепторами имеется много общего с природой процесса взаимодействия каталитического центра фермента со своим субстратом.

Первичные мессенджеры – сигнальные молекулы естественного происхождения, действующие на клетку путем высокоаффинного связывания с рецепторами (поверхностными или внутриклеточными), способные активировать механизм передачи сигнала внутрь клетки. Вторичные мессенджеры – относительно небольшие гидрофильные молекулы, быстро и в больших количествах синтезируются внутри клетки в ответ на активацию рецептора первичным мессенджером. Они служат для внутриклеточной передачи и усиления сигнала к исполнительным молекулам.

Существуют два способа передачи сигнала от активированного лигандом рецептора на внутриклеточную исполнительную молекулу: путем фосфорилирования – дефосфорилирования белков по остаткам тирозина, серина и треонина и посредством ГТФ-связывающих белков: гетеротримерных G-белков и мономерных G-белков (малых ГТФаз).

Мембранные рецепторы содержат в своем составе три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный (цитоплазматический) домены.

Рецепторы клеточной поверхности, опосредующие метаболическую регуляцию, можно разделить на 4 класса:

1. Рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein-coupled receptors – GPCR), или семиспиральные рецепторы.
2. Каталитические рецепторы обладают собственной тирозин- и серин/треонин-протеинкиназной активностью либо гуанилатциклазной активностью.
3. Рецепторы не каталитические. После связывания и активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозинowymi протеинкиназами и активировать их.
4. Регулируемые ионные каналы (лиганд-активируемые или лиганд-чувствительные ионные каналы).

Внутриклеточные рецепторы, опосредующие метаболическую регуляцию, связывают малые липофильные молекулы, легко преодалевающие барьер цитоплазматической мембраны (стероидные и тиреоидные гормоны, а также витамин D). Основными элементами внутриклеточных рецепторов являются: домен для распознавания и связывания лиганда, ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

ЛЕКЦИЯ 8

ТЕМА: СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА И ФОСФОИНОЗИТОЛОВОЙ СИСТЕМЫ ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ

План лекции:

1. Два сигнальных пути, запускаемые активацией GPCR: путь цАМФ и путь, опосредованный фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров.
2. Природа гетеротримерного G-белка и механизм его активации.
3. Аденилатциклаза, строение и механизм активации.
4. Строение и активация цАМФ-зависимой протеинкиназы А, белки, заякоривающие протеинкиназу А (АКАР), и цАМФ-зависимая регуляция транскрипции генов.
5. Усиление (амплификация) гормонального сигнала.
6. Механизмы прекращения сигнализации по пути цАМФ.
7. Путь передачи регуляторного сигнала, опосредованный фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров.
8. Роль фосфолипазы С в образовании двух вторичных мессенджеров липидного происхождения.
9. Характеристики вторичных мессенджеров: инозитол-1,4,5-трифосфата и 1,2-диацилглицерола.
10. Протеинкиназа С, структура (неактивная и активная конформации) и механизм активации.
11. Характеристика трёх подсемейств протеинкиназы С.
12. Эффект форболового эфира.
13. Механизмы прекращения передачи сигнала по пути, опосредованному фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров.

Заключение

Циклический 3'5'-аденозинмонофосфат (цАМФ)

Внутриклеточная концентрация цАМФ увеличивается до 20 крат в течение нескольких секунд в ответ на влияние обширной группы гормонов, действующих посредством рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). Молекулярная организация GPCR представлена в лекции 7. К числу гормонов, действующих посредством GPCR, относятся: адреналин (β -адренорецептор), адренокортикотропный гормон (АКТГ), глюкагон, тиреотропный гормон (ТТГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), дофамин, вазопрессин, нейропептиды и множество других. В механизме передачи сигнала с помощью этого типа рецепторов участвуют гетеротримерные G-белки, которые подробно были охарактеризованы также в лекции 7.

В результате связывания GPCR со своим лигандом в молекуле рецептора индуцируются определенные конформационные перестройки, переводящие его в активированную форму. Благодаря этому цитоплазматический домен активированного GPCR приобретает способность взаимодействовать с гетеротримерным G-белком.

Активация рецептора GPCR запускает **два сигнальных пути**, опосредованные **G-белком**:

1. путь передачи регуляторного сигнала посредством цАМФ, или путь цАМФ;
2. путь передачи регуляторного сигнала, опосредованный Ca^{2+} /фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров.

Механизм активации G-белка

G-белок – гетеротример, состоящий из α -субъединицы и комбинированной β, γ -субъединицы, которая действует как единый комплекс. В геноме млекопитающих содержится около 16 генов, кодирующих α -субъединицы, и несколько генов, кодирующих β, γ -субъединицы. Их комбинация обеспечивает всё многообразие метаболических эффектов, опосредуемых G-белком, в разных типах клеток.

Важнейшая характеристика гетеротримерных G-белков – присутствие в их α -субъединице центра связывания гуаниловых нуклеотидов: ГДФ и ГТФ. Если с G-белком связан ГТФ (комплекс G-ГТФ), то это соответствует его активированному состоянию «включено». Если в нуклеотидсвязывающем центре присутствует ГДФ (комплекс G-ГДФ), то эта форма соответствует состоянию «выключено».

Центральное событие при передаче сигнала от активированного GPCR к G-белку состоит в том, что цитоплазматический домен рецептора, благодаря изменившейся конформации, приобретает способность взаимодействовать с G-белком, запуская процесс обмена ГДФ, исходно связанного с G-белком, на присутствующий в среде ГТФ. Обмен ГДФ на ГТФ в G-белке сопровождается его активацией, которая вызывает диссоциацию тримерной молекулы G-белка на две функциональные субъединицы: α -субъединицу, содержащую ГТФ (G-ГТФ), и β, γ -комплекс. Далее, в зависимости от вида G-субъединицы, что определяется типом сигнальной системы, $G\alpha$ взаимодействует со своим эффекторным белком и активирует его.

G-белки обладают собственной ГТФазной активностью: гидролизуют ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата. Спустя несколько минут после активации **аденилатциклазы**, катализирующей образование цАМФ из АТФ, собственная ГТФаза в составе активной α -субъединицы превращает ГТФ в ГДФ. Это индуцирует «самосборку» гетеротримерного G-белка (неактивного, поскольку образуется комплекс G-ГДФ), и проведение сигнала от гормона прерывается в результате «самовыключения» G-белка.

Путь передачи регуляторного сигнала посредством G-белка и цАМФ, или путь цАМФ

Если α -субъединица в G-белке представлена её α_s (от *англ. stimulating*) или α_i (от *англ. inhibiting*) разновидностями, то активация G-белка будет вызывать, соответственно, стимуляцию или ингибирование **аденилатциклазы**, фермента, катализирующего образование цАМФ из АТФ:



Аденилатциклаза является трансмембранным белком. Полипептидная цепь содержит 12 сегментов, пересекающих мембрану в поперечном направлении (M1 и M2), и цитозольный сегмент, обозначаемый как С-сегмент. N- и С-концы полипептидной цепи фермента обращены в сторону цитоплазмы. Области C1 и C2 цитозольного сегмента участвуют в формировании каталитического центра (рис. 85):

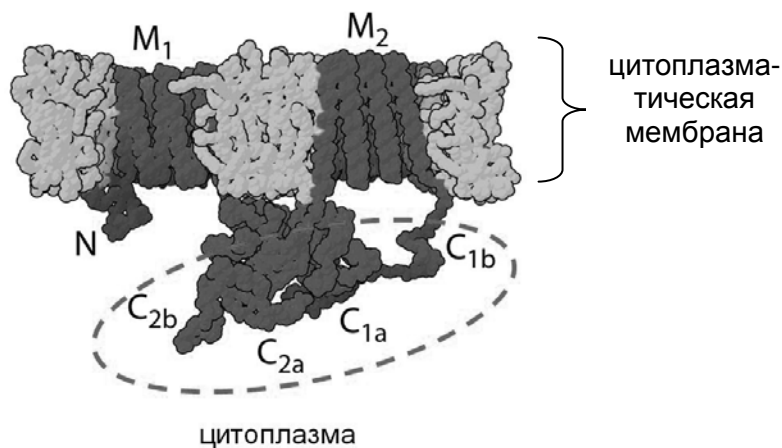


Рис. 85. Структура молекулы аденилатциклазы

В результате взаимодействия активированной α_s -субъединицы с **аденилатциклазой** в цитоплазме быстро увеличивается концентрация цАМФ.

Механизм увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ в мышечной клетке под влиянием повысившейся концентрации адреналина можно представить следующей схемой (рис. 86).

Быстрое снижение до исходного уровня внутриклеточной концентрации цАМФ происходит под влиянием **фосфодиэстеразы цАМФ**, которая обладает групповой субстратной специфичностью и катализирует превращение цАМФ в АМФ, который не является вторичным мессенджером. Активаторами **фосфодиэстеразы цАМФ** являются ионы Ca^{2+} и цГМФ.

Иными словами, цАМФ образуется в пределах секундных интервалов времени. Если не происходит постоянное образование всё новых комплексов **гормон-рецептор**, ответ также быстро прекращается. Реакции, запускаемые цАМФ, быстрые, но скоротечные.

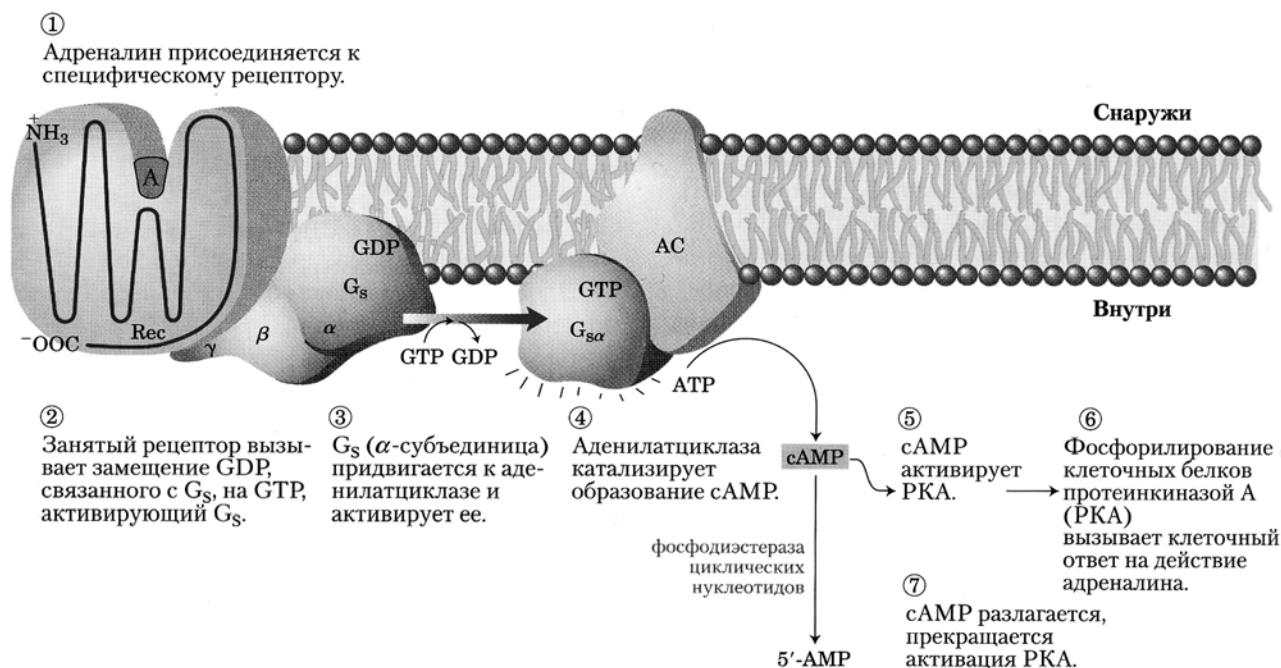


Рис. 86. Механизм повышения внутриклеточной концентрации цАМФ под влиянием адреналина [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Протеинкиназа А

Основной молекулой-мишенью для цАМФ является **цАМФ-зависимая протеинкиназа А (PKA)**, активируемая цАМФ. В каждом типе клеток присутствует собственный набор **протеинкиназ А** и киназ-активируемых регуляторных путей. Благодаря этому одна система передачи информации способна контролировать одновременно несколько специфических метаболических процессов.

PKA состоит из 2 регуляторных (**R**) и 2 каталитических (**C**) субъединиц. Тетрамерный комплекс R_2C_2 неактивен: аутоингибирующий домен в составе R-субъединицы занимает субстрат-связывающие центры в каждой из C-субъединиц. В результате связывания цАМФ с каждой из R-субъединиц они претерпевают конформационные перестройки, из-за которых **комплекс R_2C_2 диссоциирует**, освобождая две активированные каталитические C-субъединицы. Активированная **PKA** распознает в белках-мишенях особые **консенсусные последовательности аминокислот** и фосфорилирует там остатки серина и треонина.

Белки, регулируемые путем цАМФ-зависимого фосфорилирования, выполняют в клетках разнообразие функций. Например, под влиянием адреналина в цитоплазме клеток скелетных мышц повышающаяся концентрация цАМФ стимулирует **PKA**, которая путем фосфорилирования неактивной формы **гликогенфосфоорилазы-*b*** переводит фермент в активную **форму-*a***, чем быстро запускает мобилизацию глюкозы из гликогена, обеспечивая мышцы энергией (реакция «сражайся или убегай»). Аналогичен механизм мобилизации глюкозы из гликогена в гепатоцитах под влиянием гормона глюкагона.

Наряду с растворимой формой **PKA** в клетке могут существовать **протеинкиназы PKA**, «заякоренные» в определенном внутриклеточном компартмен-

те с помощью белков-адаптеров, называемых **белками, заякоривающими киназу А**, – **A-kinase anchor proteins (AKAP)**. Такой белок одним своим доменом связывается с R-субъединицей ПКА, а другим – с какой-либо внутриклеточной структурой, например с микротрубочками и актиновыми микрофиламентами клеточного скелета, с Ca^{2+} -каналами, с мембранами митохондрий или ядра. Таким образом, благодаря белкам **AKAP**, содержащимся в различных типах клеток, цАМФ получает возможность стимулировать фосфорилирование белков в составе любых компартментов. «Привязка» **ПКА** к определенным внутриклеточным структурам позволяет достигать максимально быстрого ответа на повышение концентрации цАМФ.

Важно помнить, что разные гормоны способны стимулировать синтез цАМФ и приводить к одинаковому ответу разных типов клеток. Например, адреналин и глюкагон стимулируют расщепление гликогена, соответственно, в клетках скелетных мышц и гепатоцитах. С другой стороны, различные типы клеток могут по-разному отвечать на увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ в ответ на действие одного и того же гормона. Так, цАМФ опосредует эффект адреналина, действующего посредством β -адренорецепторов. При этом в скелетных мышцах активируется расщепление гликогена, в то время как в жировой ткани (в адипоцитах) стимулируется липолиз (гидролиз резервного триацилглицерола).

цАМФ-зависимая регуляция транскрипции генов

цАМФ способна регулировать транскрипцию некоторых генов, имитируя эффекты стероидных и тиреоидных гормонов, и тем самым вносить долговременные изменения в жизнедеятельность клетки. Гены, регулируемые цАМФ, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**. Это специфические последовательности, которые после их стимуляции действуют в качестве **энхансеров транскрипции**. Стимуляция упомянутых элементов происходит с участием специфической ПКА, фосфорилирующей белок, который **связывает цАМФ-чувствительные элементы – cAMP response element-binding protein (CREB)**. CREB после своей активации выступает в роли транскрипционного фактора. Гены, транскрибируемые при участии CREB, различны в зависимости от типа клеток (рис. 87).

Регуляторный эффект β, γ -комплекса

В результате активации гетеротримерного G-белка и диссоциации $G\alpha$ -ГТФ субъединицы освобождается **β, γ -комплекс**. Этот комплекс способен активировать внутриклеточную серин-треониновую **протеинкиназу Src**, которая далее может активировать **протеинкиназу Raf**, являющуюся первым ферментом в киназном каскаде **митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК)**.

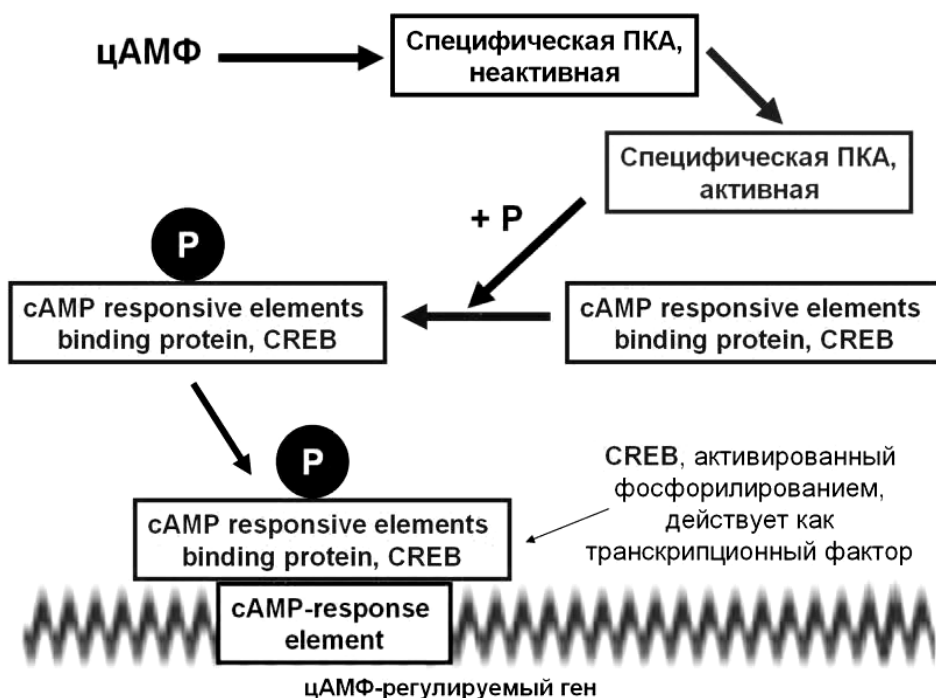


Рис. 87. Участие цАМФ в регулировании транскрипции генов

Изложенный выше материал можно представить следующей обобщающей схемой (рис. 88):

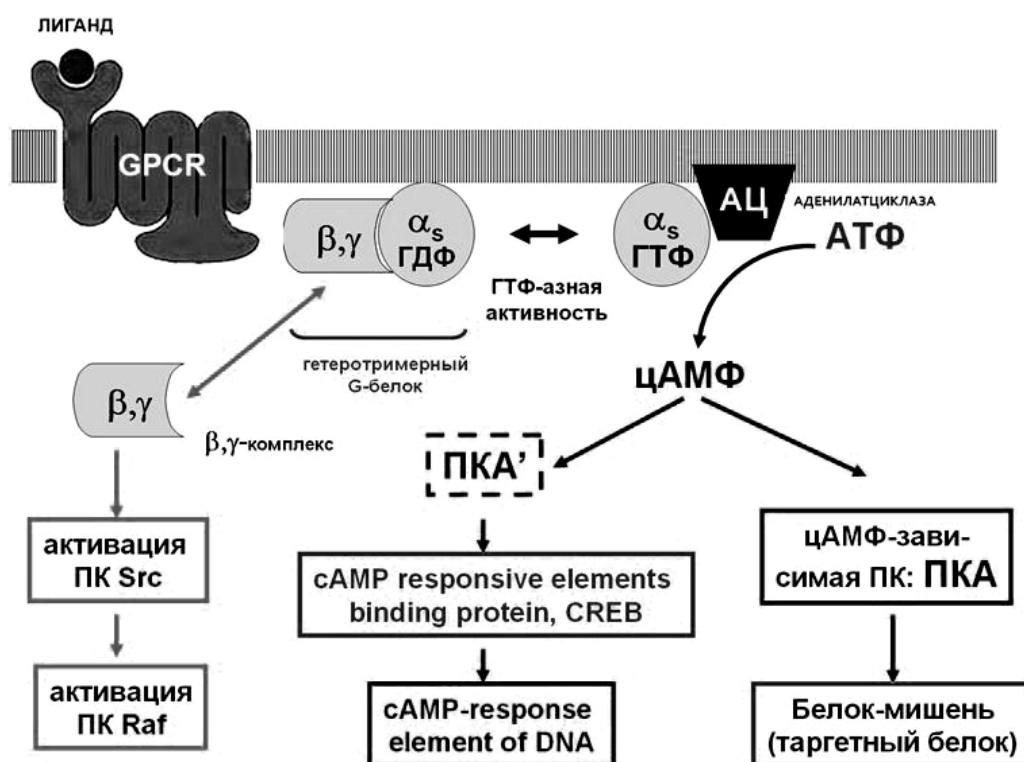


Рис. 88. Пути передачи регуляторного сигнала посредством составляющих гетеротримерный G-белок субъединиц (α-субъединицы и β,γ-комплекса)

Усиление (амплификация) гормонального сигнала в пути: GPCR→G-белок → эффекторный белок

Принцип усиления гормонального сигнала состоит в следующем. Одна молекула гормона активирует одну молекулу GPCR, который активирует несколько G-белков. Каждая молекула G-белка стимулирует синтез множества молекул цАМФ. Каждая молекула цАМФ активирует 1 молекулу *ПКА*, но каждая из них активирует множество эффекторных белков (например, множество молекул *гликогенфосфорилазы*). Суммарный итог каскада – усиление гормонального сигнала на несколько порядков. Для некоторых типов клеток коэффициент усиления (амплификации) сигнала может достигать значений порядка 10^5 – 10^6 .

Механизмы прекращения сигнализации по пути цАМФ

1. Включение собственной ГТФазной активности α -субъединицы наступает через несколько минут после активации рецептором Gs-белка. Замена ГТФ на ГДФ в составе α -субъединицы приводит к потере её активности и самосборке неактивного гетеротримерного G-белка.

2. Снижение концентрации лиганда (гормона) в крови приводит к диссоциации комплекса гормон-GPCR.

3. GPCR, находящийся в форме комплекса с гормоном, фосфорилируется по остаткам серина и треонина в составе цитозольного домена специфической ПКС, что лишает домен способности контактировать с G-белком и активировать его. Окончательная инактивация рецептора происходит с участием белка аррестина: комплекс фосфорилированный рецептор – аррестин поглощается клеткой путем эндоцитоза.

4. цАМФ разрушается с участием специфической *фосфодиэстеразы*:



Образующаяся в итоге молекула АМФ лишена свойств вторичного мессенджера.

5. Специфические *протеинфосфатазы* дефосфорилируют белки, активированные с участием *ПКА*.

Путь передачи регуляторного сигнала, опосредованный фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров

Сигнальный путь фосфатидилиглицерола/ Ca^{2+} является вторым направлением передачи регуляторного сигнала внутрь клетки от гормонов, действующих посредством рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR).

Стимуляция GPCR может приводить к активации G-белка, содержащего α_q -субъединицу (Gq). Gq-ГТФ субъединица активирует связанную с цитоплазматической мембраной *фосфолипазу C (ФЛазу C)*, точнее, её разновидности: *ФЛазы C β и γ* . Эти фосфолипазы специфичны по отношению к *фосфатидили-*

нозитол-4'5'-бисфосфату (ФИФ2) – минорному фосфолипиду цитоплазматической мембраны, локализованному в её внутреннем слое (рис. 89):

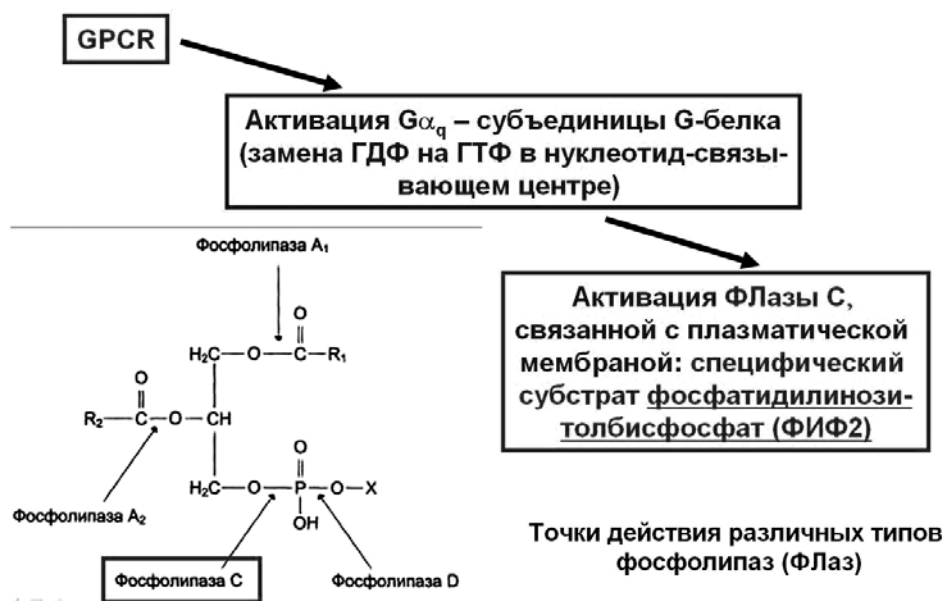


Рис. 89. Механизм активации *ФЛазы С* посредством Gq -ГТФ субъединицы гетеротримерного G-белка и точки действия различных типов фосфолипаз

В результате воздействия *ФЛазы С* на **ФИФ2** образуются два продукта, каждый из которых является вторичным мессенджером (рис. 90):

1. Гидрофильный **инозитол-1'4'5'-трифосфат (ИФ3)**.
2. Гидрофобный, остающийся в мембране **1,2-диацилглицерол (ДАГ)**.

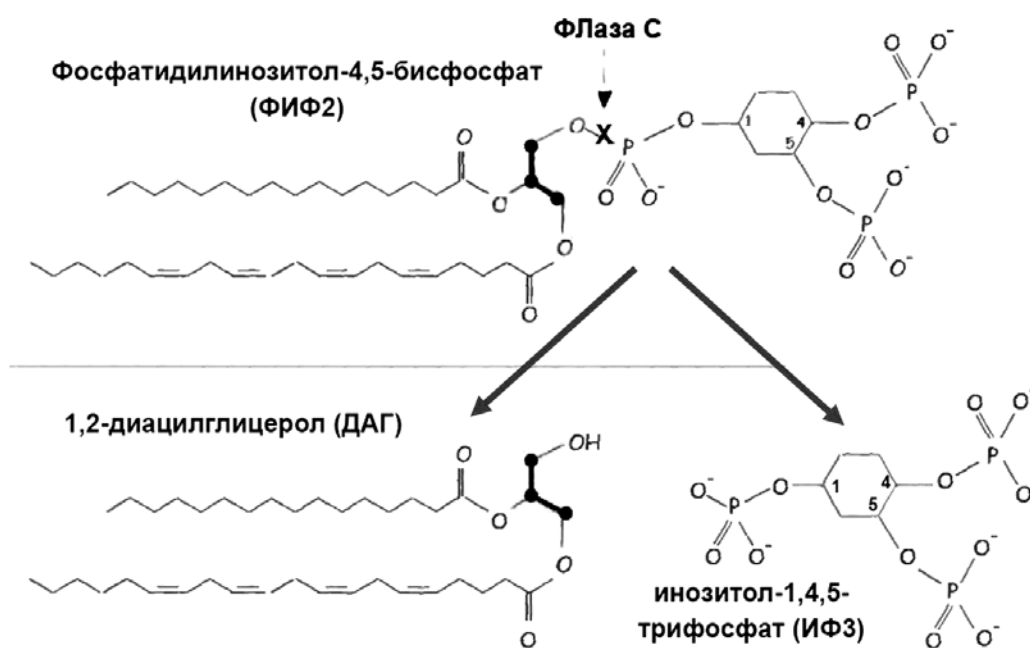


Рис. 90. Два продукта деятельности *ФЛазы С*: 1,2-диацилглицерол (ДАГ) и инозитол-1'4'5'-трифосфат (ИФ3)

Вторичный мессенджер инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3). Молекула **ИФ3** гидрофильна благодаря шести отрицательным электрическим зарядам, которые сообщают ему три фосфорильные группы. **ИФ3** переходит в цитоплазму клетки и активирует **инозитолтрифосфат-управляемые Ca^{2+} -каналы (inositol trisphosphate-gated calcium channels)** в мембране эндоплазматического ретикулума (в миоцитах – саркоплазматического ретикулума). Эти каналы называют также инозитолтрифосфат-чувствительными Ca^{2+} -каналами (рис. 91):

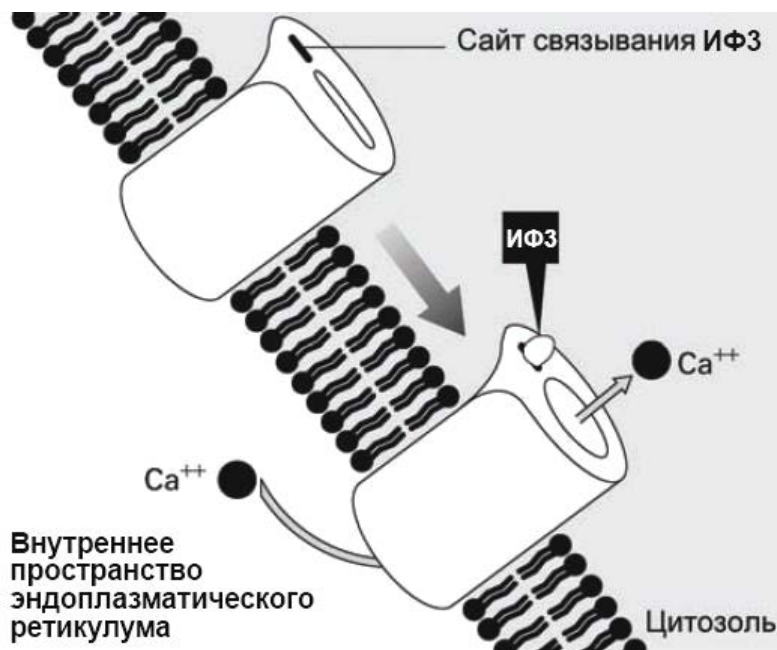


Рис. 91. Схема инозитолтрифосфат-управляемого Кальциевого канала

Канал открывается на 1–2 секунды, обеспечивая выброс ионов Ca^{2+} в цитоплазму вдоль градиента концентрации. Увеличение концентрации ионов до величины 10^{-6} М является сигналом для активации целого ряда Ca^{2+} -зависимых ферментов и в первую очередь для активации серин-треониновой **протеинкиназы С (ПКС)**.

Для поддержания кальциевого гомеостаза избыток ионов Ca^{2+} своевременно удаляется. При этом молекулы ИФ3 дефосфорилируются цитозольными специфическими фосфатазами и отделяются от Ca^{2+} -каналов, которые в результате этого закрываются. Далее АТФ-зависимые кальциевые насосы возвращают ионы Ca^{2+} внутрь эндоплазматического и саркоплазматического ретикулумов. В цитоплазме достигается исходная концентрация ионов Ca^{2+} – менее 10^{-7} М.

Вторичный мессенджер 1,2-диацилглицерол (ДАГ). ДАГ является гидрофобной молекулой, в силу чего остается во внутреннем слое цитоплазматической мембраны, где он встречается с рекрутируемой из цитоплазмы неактивной **ПКС** и активирует её. In vivo активация **ПКС** происходит только под действием ДАГ в присутствии повышенной концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Таким образом, эффекты ИФ3 и ДАГ в процессе активации **ПКС** являются синергичными. Именно повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме вы-

зывает транслокацию (перенос) неактивной **ПКС** из цитоплазмы к внутреннему слою цитоплазматической мембраны – к месту её активации.

ПКС, структура и механизм активации. **ПКС** является мономером с молекулярной массой 77 кДа. Полипептидная цепь включает 670–690 аминокислотных остатков и состоит из двух компактных доменов. Один из них гидрофобный **регуляторный**, второй гидрофильный **каталитический**. Регуляторный домен **ПКС** располагается ближе к С-концу, киназный (каталитический) домен находится на N-конце полипептидной цепи. Для полной активации **ПКС** требуются: ДАГ, ионы Ca^{2+} и связь с мембранным фосфатидилсерином. Неактивная **ПКС** растворена в цитоплазме. В ответ на повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме под влиянием ИФЗ **ПКС** изменяет свою конформацию и переносится во внутренний слой плазматической мембраны, где удерживается за счет ионных взаимодействий с несущей отрицательный электрический заряд головкой фосфатидилсерина. Активная **ПКС** фосфорилирует остатки серина и треонина в молекулах-мишенях (рис. 92).

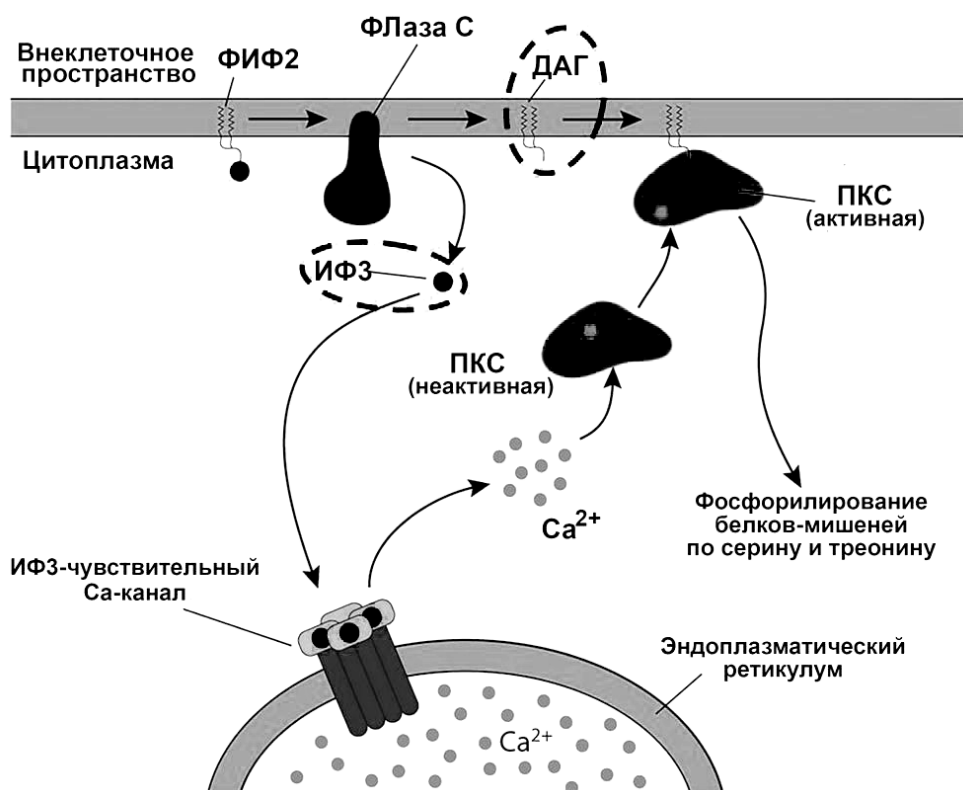


Рис. 92. Схема активации протеинкиназы С

Молекула **ПКС** существует в двух конформациях: **неактивной** и **активной**. При низких концентрациях ионов Ca^{2+} и в отсутствие ДАГ киназа находится в цитоплазме в растворимом состоянии и имеет **неактивную конформацию**. При этом псевдосубстратный домен связан с субстрат-связывающим сайтом, что не позволяет субстрату взаимодействовать с ферментом. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} способствует связыванию ионов с участком полипептидной цепи фермента, локализованным между доменами **С2** и **С3**, что позволяет молекуле **ПКС** притягиваться и присоединяться к несущей отрицательный

заряд головке фосфатидилсерина во внутреннем слое клеточной мембраны. Взаимодействие прикрепившейся к мембране неактивной **ПКС** с ДАГ вызывает перестройку конформации молекулы киназы. Она выражается в **диссоциации псевдосубстратного домена и освобождении субстрат-связывающего сайта**, который получает возможность свободно взаимодействовать с молекулами-мишенями киназы – молекула **ПКС** приобретает **активную конформацию (активируется)** (рис. 93). Такой тип регуляции активности ферментов называют **интрастерической регуляцией**.

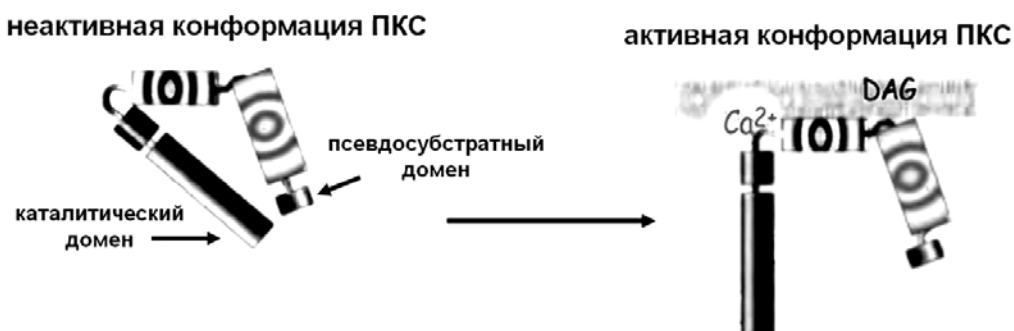


Рис. 93. Схема изменения конформации молекулы *протеинкиназы С* в результате присоединения ионов Ca^{2+} и образования контакта с отрицательно заряженной головкой фосфатидилсерина клеточной мембраны.
 DAG – ДАГ (диацилглицерол)

Для **ПКС** характерен длительный период активности, которая может сохраняться в условиях, когда первоначальный сигнал пропал или снизилась концентрация ионов Ca^{2+} . Причина – постоянное образование дополнительного количества ДАГ из фосфатидилхолина с участием **ФЛазы С**. Гидролиз ДАГ инактивирует **ПКС**.

Обширное семейство **ПКС** делят на **три подсемейства** в зависимости от сходства первичной структуры (доменов) и способа активации (рис. 94):

- а) **Классические формы ПКС** (активируются ДАГ и ионами Ca^{2+} , нуждаются в фосфатидилсерине, активируются форболовыми эфирами). Изоформы: α , β , γ .
- б) **Новые формы ПКС** (активируются ДАГ, нуждаются в фосфатидилсерине, но независимы от ионов Ca^{2+}). Изоформы: δ , ϵ , η .
- в) **Атипичные формы ПКС** (нуждаются в фосфатидилсерине, но не чувствительны к ДАГ и ионам Ca^{2+}). Изоформы: λ , τ , ζ , μ .

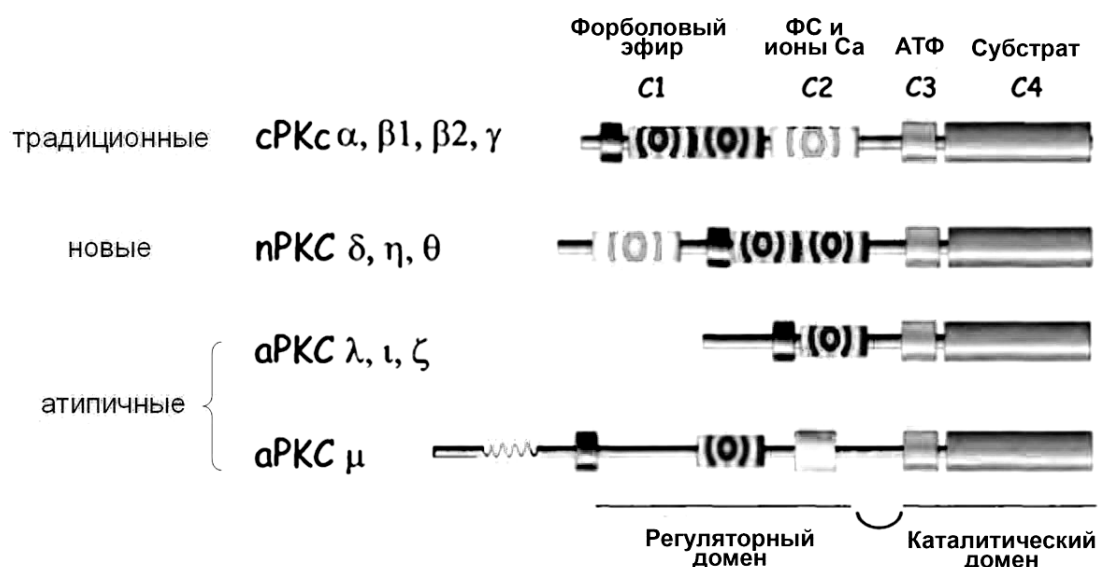


Рис. 94. Схема структуры трех подсемейств *PKC*

Буквами **C1–C4** обозначены консервативные домены и указаны молекулы, с которыми взаимодействуют эти домены. **C** доменом **C1** также связывается естественный активатор *PKC* – диацилглицерол (ДАГ). Маленькими прямоугольниками (крайние слева) на каждой схеме обозначены *псевдосубстратные домены*. **ФС** – фосфатидилсерин.

В одном типе клеток могут присутствовать разные подсемейства *PKC*. Эти подсемейства киназы участвуют в широком круге процессов, лежащих в основе жизнедеятельности клетки: в клеточном делении (модуляция активации **Ras-Raf-МАПК-сигнального пути**, отвечающего за стимуляцию митозов и пролиферацию клеток), в секреции, экзоцитозе, транспорте ионов, сокращении гладкой мускулатуры, экспрессии генов и др.

Одна из изоформ *атипичной PKC* (*PKC-ζ*) способна запускать сигнальный путь, опосредуемый ядерным транскрипционным фактором **kB (NFkB)**. **NFkB** присутствует во всех клетках организма человека и животных. **NFkB** активирует экспрессию более 250 генов, кодирующих белки, которые участвуют в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза, воспалительной и аутоиммунной реакций и др. **NFkB** – гетеродимер (например, белки **p50** и **p65**). В покоейся клетке **NFkB** находится в цитоплазме в неактивной форме – комплекс **p50-p65-IkB**. **IkB** является ингибирующим белком. Под действием *PKC-ζ* активируется киназа **IKK (IkB kinase)**. Эта киназа является субстратом для *PKC-ζ*. **IKK** фосфорилирует ингибитор **IkB**, который сразу же покидает гетеродимер, и **NFkB** становится активным транскрипционным фактором. Сигнальный путь, опосредуемый **NFkB**, срабатывает в течение считанных минут, поскольку не требует синтеза белка de novo: транскрипционный фактор всегда присутствует в цитоплазме (в неактивной форме). Такой срочный ответ необходим для своевременной реакции клетки на воздействие различных патогенов или повреждающих факторов.

Отдельно следует сказать о том, что мощными активаторами классической формы **ПКС** являются **форбол** и его **эфиры** – соединения растительного происхождения. В своё время использование форболовых эфиров внесло существенный вклад в изучение механизмов функционирования **ПКС** и запускаемых ею сигнальных путей. Наиболее часто используют эфир **форбол-12-миристат-13-ацетат** (рис. 95):

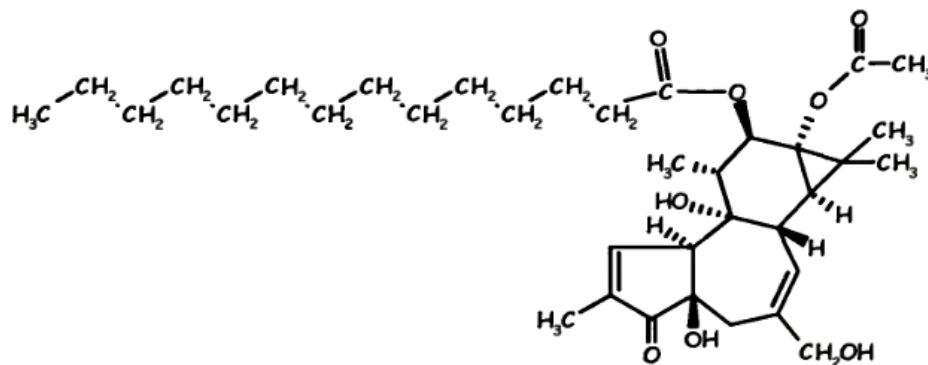


Рис. 95. Структура форбол-12-миристат-13-ацетата

Форболовый эфир связывается с регуляторным доменом **ПКС** и **активирует её в концентрациях, на три порядка меньших, чем естественный активатор – ДАГ**. Благодаря чуждой животной клетке химической структуре форболовые эфиры разрушаются *in vivo* крайне медленно. В итоге в присутствии форболового эфира сигнальная система **оказывается в перманентно включенном состоянии – пролиферация клеток перестает быть контролируемой**. В этом причина выраженной способности форболовых эфиров провоцировать развитие злокачественных опухолей. Эти соединения – **мощные опухолевые промоторы**.

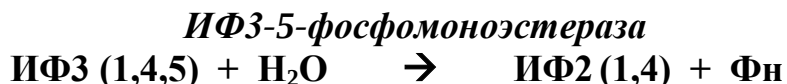
Механизмы прекращения передачи сигнала по пути, опосредованному фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров

Если какая-либо сигнальная система останется во включенном (активированном) состоянии и после того, как действие внешнего сигнала уже прекратилось, то последствия для клетки, как правило, оказываются фатальными. Отсюда чрезвычайно важной является безупречность работы механизмов, своевременно выключающих сигнальную систему, то есть сразу после того, как регуляторный сигнал будет исполнен. Выше уже упоминались форболовые эфиры, являющиеся соединениями-ксенобиотиками по отношению к организму животных и человека, которые активируют **ПКС** в концентрации, существенно ниже той, при которой действует единственный естественный активатор киназы – ДАГ. Естественными ингибиторами ПКС являются спермин и сфингозин.

Прекращение передачи сигнала посредством фосфоинозитоловой системы вторичных мессенджеров происходит по двум основным направлениям: инактивация (разрушение) вторичных мессенджеров и дефосфорилирование молекул-мишеней **протеинкиназы С**.

I. Инактивация вторичных мессенджеров.

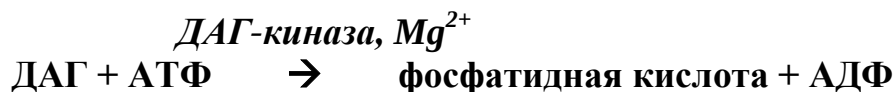
Действие ИФЗ прекращается с помощью фосфатаз, дефосфорилирующих это соединение:



ИФЗ-5-фосфомоноэстераза связана с плазматической мембраной. Последовательное трёхэтапное дефосфорилирование ИФЗ приводит к образованию циклического спирта – инозитола, который лишен свойств мессенджера, но может служить субстратом для синтеза фосфатидилинозитола.

Действие ДАГ может быть ограничено согласно двум механизмам:

1) Воздействием **ДАГ-киназы**, локализованной в цитоплазматической мембране. Под её влиянием происходит фосфорилирование ДАГ до фосфатидной кислоты:



В клетке таким путем до 30% ДАГ может превратиться в фосфатидную кислоту.

2) Воздействием ДАГ-липазы, осуществляющей гидролиз мессенджера с отщеплением арахидоновой кислоты в два этапа:



На следующем этапе происходит расщепление 2-арахидоноил-глицерола на арахидоновую кислоту и глицерол.

В итоге концентрация мессенджера снижается до нуля. Однако важно, что продукты этих путей деградации ДАГ сами по себе играют существенную роль в жизнедеятельности клетки. Так, фосфатидная кислота может участвовать в регуляции входа ионов Ca^{2+} в клетку из внеклеточного пространства. Арахидоновая кислота, освобождаемая из ДАГ с участием ДАГ-липазы, и её производные формируют отдельную группу сигнальных молекул: простагландинов и эйкозаноидов (лейкотриенов и тромбоксанов).

Снижение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме до исходного уровня приводит к подавлению активности внутриклеточных ферментов, стимулируемых ПКС.

II. Дефосфорилирование эффекторных белков протеинкиназы С.

Эти реакции катализируют специфические **протеинфосфатазы**. Многие эффекторные молекулы переходят в неактивную форму в результате их дефосфорилирования, и достигнутый эффект аннулируется.

Заключение

Внутриклеточная концентрация цАМФ увеличивается до 20 крат в течение нескольких секунд в ответ на влияние обширной группы гормонов, действующей

щих посредством рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). Активация GPCR посредством активации G-белка запускает два сигнальных пути: первый – путь передачи регуляторного сигнала, опосредованный цАМФ, или путь цАМФ; второй – путь передачи регуляторного сигнала, опосредованный фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров.

В механизме передачи сигнала с помощью GPCR участвуют гетеротримерные G-белки, состоящие из α -, β - и γ -субъединиц. Цитоплазматический домен активированного GPCR осуществляет обмен ГДФ, связанного с G-белком, на ГТФ, что вызывает активацию G-белка, которая выражается в диссоциации тримерной молекулы G-белка на две функциональные субъединицы: α -субъединицу, содержащую ГТФ (G-ГТФ), и β, γ -комплекс. Если α -субъединица представлена её α_s -разновидностью, то активация G-белка будет вызывать стимуляцию **аденилатциклазы**, катализирующей синтез цАМФ. Быстрое снижение до исходного уровня внутриклеточной концентрации цАМФ происходит под влиянием фосфодиэстеразы цАМФ, которая катализирует превращение цАМФ в АМФ.

Основной молекулой-мишенью для цАМФ является **цАМФ-зависимая протеинкиназа А (ПКА)**. В каждом типе клеток присутствует собственный набор **ПКА**. Благодаря этому одна система передачи информации способна контролировать одновременно несколько специфических метаболических процессов. **ПКА** состоит из 2 регуляторных (R) и 2 каталитических (C) субъединиц (R_2C_2), которые изначально неактивны. При связывании цАМФ с каждой из R-субъединиц комплекс R_2C_2 диссоциирует, и активированная **ПКА** фосфорилирует в белках-мишенях остатки серина и треонина.

Наряду с растворимой формой **ПКА** в клетке существуют **ПКА**, «заякоренные» в определенных внутриклеточных компартментах с помощью белков-адаптеров, называемых белками, заякоривающими киназу А, – A-kinase anchor proteins (АКАР). «Привязка» **ПКА** к определенным внутриклеточным структурам позволяет достигать максимально быстрого ответа на повышение концентрации цАМФ.

цАМФ также способна регулировать транскрипцию некоторых генов, имитируя эффекты стероидных и тиреоидных гормонов. Гены, регулируемые цАМФ, содержат цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements). Стимуляция упомянутых элементов происходит с участием специфической ПКА, фосфорилирующей белок, который связывает цАМФ-чувствительные элементы – cAMP response element-binding protein (CREB). CREB после активации превращается в транскрипционный фактор.

Механизмы прекращения сигнализации по пути цАМФ заключаются в:

- включении собственной ГТФазной активности α -субъединицы, приводящей к замене ГТФ на ГДФ в её составе и самосборке неактивного гетеротримерного G-белка;
- диссоциации комплекса гормон-GPCR при снижении концентрации гормона в крови;

- фосфорилировании цитозольного домена по остаткам серина и треонина, что лишает домен способности контактировать с G-белком;
- разрушении цАМФ с помощью специфической фосфодиэстеразы;
- дефосфорилировании белков, активированных **ПКА**, катализируемом специфическими протеинфосфатазами.

Путь, опосредованный фосфоинозитоловой системой вторичных мессенджеров, является вторым направлением передачи регуляторного сигнала внутрь клетки от гормонов, действующих посредством GPCR. Стимуляция GPCR активирует G-белок, содержащий α_q -субъединицу (**Gq**). Gq-ГТФ субъединица активирует мембранную **фосфолипазу C**, специфичную к фосфатидилинозитол-4'5'-бисфосфату (ФИФ2). В результате воздействия **ФЛазы C** на ФИФ2 образуются два продукта, каждый из которых является вторичным мессенджером: гидрофильный инозитол-1'4'5'-трифосфат (ИФ3) и гидрофобный, остающийся в мембране 1,2-диацилглицерол (ДАГ). ИФ3 переходит в цитоплазму и взаимодействует с ИФ3-чувствительными Ca^{2+} -каналами в мембране эндоплазматического ретикулума (в миоцитах – саркоплазматического ретикулума). Канал открывается, обеспечивая выброс ионов Ca^{2+} в цитоплазму. ДАГ встречается с рекрутируемой из цитоплазмы неактивной **ПКС** и активирует её. In vivo активация **ПКС** происходит только под действием ДАГ в присутствии повышенной концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

Молекула **ПКС** содержит регуляторный и каталитический домены. Неактивная **ПКС** растворена в цитоплазме. В ответ на повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме под влиянием ИФ3 **ПКС** изменяет свою конформацию и переносится во внутренний слой плазматической мембраны, с которой связывается за счет ионных взаимодействий с несущим отрицательный заряд фосфатидилсерином. Активная **ПКС** фосфорилирует в молекулах-мишенях остатки серина и треонина. При низких концентрациях ионов Ca^{2+} и в отсутствие ДАГ **ПКС** находится в цитоплазме в растворимом состоянии и имеет неактивную конформацию, обусловленную тем, что псевдосубстратный домен связан с субстрат-связывающим сайтом. Связывание ионов Ca^{2+} с ферментом позволяет ему присоединяться к внутреннему слою клеточной мембраны. Последующее взаимодействие неактивной ПКС с ДАГ вызывает диссоциации псевдосубстратного домена и освобождение субстрат-связывающего сайта – молекула **ПКС** приобретает активную конформацию.

Обширное семейство **ПКС** делят на три подсемейства в зависимости от сходства первичной структуры (доменов) и способа активации:

- классические формы **ПКС**, включающие изоферменты α , β , γ ;
- новые формы **ПКС**, включающие изоферменты δ , ϵ , η ;
- атипичные формы **ПКС**, включающие изоферменты λ , τ , ζ , μ .

В одном типе клеток могут присутствовать разные подсемейства **ПКС**, которые участвуют в разнообразных процессах, лежащих в основе жизнедеятельности клетки.

Форболовый эфир, являясь соединением растительного происхождения, способен связывается с регуляторным доменом **ПКС** и активировать её в кон-

центрациях, на три порядка меньших, чем естественный активатор – ДАГ. В присутствии форболового эфира сигнальная система оказывается в перманентно «включенном» состоянии – пролиферация клеток перестает быть контролируемой, что провоцирует злокачественный рост и является опухолевым промо-тором.

Прекращение передачи сигнала посредством фосфоинозитоловой системы вторичных мессенджеров происходит по двум основным направлениям: инактивация (ферментативное разрушение) вторичных мессенджеров ИФ3 и ДАГ и дефосфорилирование молекул-мишеней **ПКС**.

ЛЕКЦИЯ 9

ТЕМА: СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ИНСУЛИНА

План лекции:

1. Митоген-активируемая протеинкиназа (МАПК) – основной путь трансдукции пролиферативного сигнала.
2. Адапторные белки – строение и функции.
3. Механизм активации белка Ras.
4. Молекулярная организация сигнального пути МАПК.
5. Механизмы «выключения» митогенной сигнализации.
6. Другие пути передачи митогенного сигнала: JAK-STAT-сигнальный путь и сигнализация посредством ядерного транскрипционного фактора NFkB.
7. Сигнальные пути инсулина. Строение рецептора инсулина и механизм его активации.
8. Регуляция инсулином активности гликогенсинтазы в печени и мышцах.
9. Механизм обеспечения трансмембранной доставки глюкозы в инсулин-зависимые клетки.
10. Регуляция инсулином активности глюконеогенеза в печени.

Заключение

Митоген-активируемая *протеинкиназа* (МАП-киназа, МАПК), или **mitogen-activated protein kinase (MAPK)**

Одним из элементов адаптации метаболизма клеток к изменившимся условиям существования является запуск пролиферативных процессов. Сигнальный путь MAPK – основной путь передачи пролиферативного сигнала внутрь клетки от внешних митогенов, то есть факторов, стимулирующих митозы. Проллиферативный сигнал несут следующие **митогены**:

- цитокины (интерлейкины, интерфероны, ФНО и др.);
- факторы роста;
- некоторые гормоны (инсулин);
- медиаторы воспаления.

Сигнальный путь действует во всех типах клеток. Путь активен в период развития, роста и формирования тканей и органов (в том числе в функционировании стволовых клеток), когда необходимо запустить интенсивное деление клеток. Путь инактивируется в полностью дифференцированных и неделящихся клетках. При необходимости репарации поврежденной ткани сигнальный путь *MAPK* снова активируется.

Помимо пути *МАПК* (*MAPK*), эффекты митогенов могут быть переданы на исполнительные молекулы посредством **ПКС**, а также посредством **JAK-**

STAT-сигнального пути, ядерным транскрипционным фактором κB (NF κB) и др.

Некоторые виды опухолей возникают при нарушении регуляции МАПК-сигнального пути. Так, мутации генов, кодирующих цитоплазматический домен рецепторных тирозиновых киназ (посредством которых на клетку воздействуют митогены), нарушают киназную активность рецептора и формирование на нем связывающих участков, что вызывает аномальный клеточный ответ, приводящий к заболеванию – бесконтрольному росту мутантных клеток (опухоль). Многие онкогены вызывают мутацию генов, кодирующих рецепторы факторов роста.

МАПК-сигнальный путь назван по имени последней из трёх киназ, которые образуют киназный каскад, – **митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК), или *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). МАПК (MAPK) имеет второе название: *extracellular signal-regulated kinase* (ERK).**

В состав МАПК-каскада входят три киназы: ***Raf*, *MEK* и *ERK* (MAPK).** По этой причине сигнальный путь МАПК называют также **Ras-Raf-MEK-ERK-сигнальным путем (Ras-Raf-MEK-ERK pathway).** Белок **Ras** упомянут в названии пути в связи с тем, что **Ras** является активатором первой киназы каскада – **протеинкиназы *Raf*.**

Механизм активации рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью (рецепторных тирозиновых киназ), и формирование начального этапа сигнального пути *MAPK*

Сигнальный путь *MAPK* запускают факторы роста (**тромбоцитарный фактор роста, фактор роста эпидермиса и др.**), некоторые гормоны (**инсулин**), а также **интерфероны, интерлейкины и ФНО- α .** Все вышеперечисленные первичные мессенджеры являются лигандами **рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью (рецепторных тирозиновых киназ).** Внеклеточный N-концевой домен рецептора характеризуется высокой степенью вариабельности, что обеспечивает возможность специфического взаимодействия с широким кругом лигандов.

Связывание лиганда с рецептором вызывает его димеризацию, приводящую к сближению цитоплазматических доменов рецептора и изменению их конформации, что вызывает активацию собственной тирозинкиназы, которая является неотъемлемой частью домена. На долю тирозинкиназы приходится около 250 аминокислот, которые располагаются в центре домена. Активированная тирозинкиназа запускает процесс перекрёстного аутофосфорилирования цитозольных (каталитических) доменов по остаткам тирозина по типу положительной обратной связи (рис. 96).

В результате активации собственной тирозинкиназы в цитоплазматических доменах рецептора происходят два важных события:

а) В составе доменов образуются фосфорилированные остатки тирозина (фосфотирозины), которые служат сайтами связывания (докинг-пунктами) для специфических цитозольных адаптерных белков-посредников, участвующих в передаче регуляторного сигнала внутри клетки.

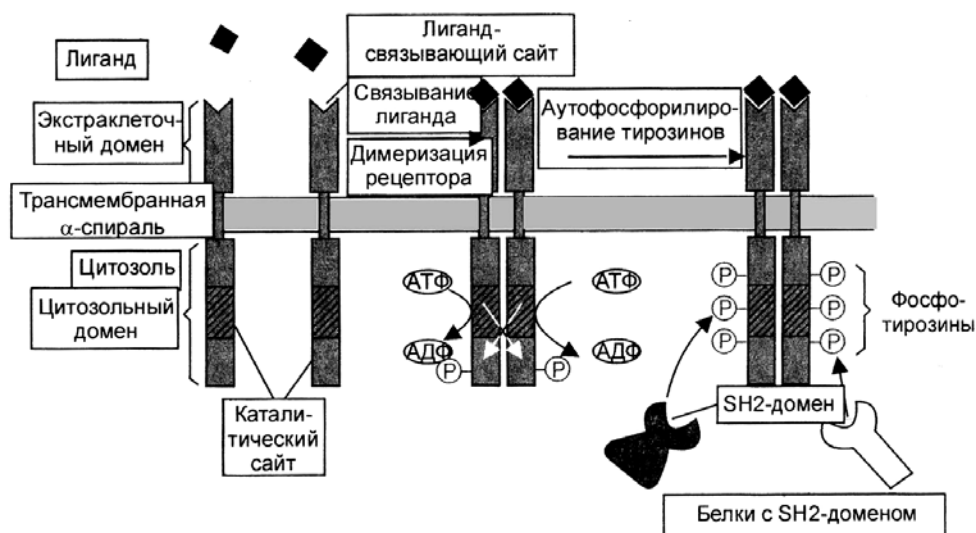


Рис. 96. Схема активации рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью (рецепторных тирозиновых киназ)
[Пальцев М.А. и др., 2003]

б) Активная собственная тирозиновая протеинкиназа цитоплазматических доменов обеспечивает фосфорилирование остатков тирозина в составе специфических цитоплазматических белков – участников проведения регуляторного сигнала внутри клетки.

Иными словами, цитоплазматические домены рецептора приобретают способность рекрутировать («притягивать») различные адапторные белки (как связанные с мембраной, так и растворенные в цитоплазме) и активировать их, инициируя, тем самым, различные каскады передачи регуляторных сигналов внутри клетки, опосредуемые протеинкиназами.

На дистанции от рецептора до каскада протеинкиназ, фосфорилирующих и активирующих транскрипционные факторы, а также ряд других белков, функционируют несколько адапторных белков-посредников, важнейшими из которых являются два **адапторных белка**:

- 1) белок **Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)**;
- 2) малый **G-белок (мономерный G-белок, малая ГТФаза)**, или белок **Ras** (от **Rat sarcoma**). По этой причине сигнальный путь МАРК называют также **путь Ras/МАРК (Ras/MAPK pathway)**.

Белок **Grb2**, как и ряд других внутриклеточных адапторных белков, содержит два типа особых доменов: **SH2-** и **SH3-домены**. **SH2-домены** распознают фосфотирозины в составе рецептора и специфически связываются с ним. Название **SH2-домена** происходит от **Src homology domain**, обозначающего гомологию с доменом цитозольной тирозинкиназы, кодируемой онкогеном **src** (произносится «сарк»). В составе **SH2-домена** есть «карман», с помощью которого происходит взаимодействие белка с фосфотирозиновым остатком рецептора. **SH2-домены** различных адапторных белков связываются с аминокислотными последовательностями, окружающими специфичный фосфотирозиновый остаток. **SH2-домены** весьма консервативны. Тем не менее, это не мешает

обеспечивать специфичность их взаимодействия с фосфорилированными остатками тирозина других белков в составе сигнальных каскадов. Белок **Grb2**, помимо одного **SH2-домена**, содержит два **SH3-домена**, которые распознают и связываются с **богатыми пролином участками** в составе других белков. **Grb2** участвует в передаче сигнала от рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью: от **рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР)** или **рецептора инсулина**. Ингибирование белков **Grb2** приводит к подавлению пролиферации многих типов клеток. Белок **Grb2** своим **SH2-доменом** присоединяется к фосфотирозину на цитоплазматическом домене рецептора, а за счет **SH3-домена** – к другим сигнальным молекулам, расположенным «вниз по течению». Прежде всего, это **белок, обменивающий гуаниновые нуклеотиды, – guanine nucleotide exchange factor (GEF)**, который необходим для активации следующего «вниз по течению» белка – **Ras**, участвующего в проведении митогенного сигнала. Детальный механизм активации **Ras** будет изложен ниже.

Белок **Ras** является представителем семейства **мономерных G-белков** или «**малых**» **ГТФаз**, экспрессирующихся во всех типах клеток. Белки **Ras** активно участвуют в пролиферации, дифференцировке, трансформации и апоптозе клеток, опосредуя действие митогенных и ростовых сигналов в цитоплазме и ядре. Белок **Ras** – ключевой компонент (активатор *киназы **Raf***) первой киназы протеинкиназного каскада, входящего в состав сигнального пути **MAPK**.

Адапторные белки, помимо **SH2- и SH3-доменов**, могут содержать в своём составе другие домены, например **РН-домены** (от **plextrin homology – домен плекстриновой гомологии**), которые выполняют аналогичные функции.

Следует подчеркнуть, что функция адапторных белков состоит в том, что они, благодаря присутствию в их составе **SH2-, SH3- и РН-доменов**, имеют способность одним своим концом связываться с фосфотирозинами на цитоплазматическом домене рецептора, а другим концом взаимодействовать с белками, расположенными «вниз по течению», которые участвуют в дальнейшей внутриклеточной сигнальной трансдукции (белок-белковые взаимодействия). Иными словами, **эти белки обеспечивают строгую последовательность** в формировании «цепочки» из конкретных участников различных сигнальных путей. Именно с учетом этого их более корректно называть «посредниками», но не «мессенджерами». В состав многих белковых комплексов входят несколько протеинкиназ, которые последовательно активируют друг друга, формируя протеинкиназный каскад, ярким примером которого служит **МАПК-сигнальный** путь. В результате реализуется каскад последовательных актов фосфорилирования, обеспечивающий многократное усиление первоначального сравнительно слабого регуляторного сигнала.

Структура и механизм активации белка Ras

Ras связан с внутренним слоем цитоплазматической мембраны. Как и **гетеротримерный G-белок**, обеспечивающий сигнализацию по пути цАМФ, белок **Ras** активен, если он образует комплекс с ГТФ, и неактивен, если происхо-

дит замена ГТФ на ГДФ (гидролиз ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата) (рис. 97):

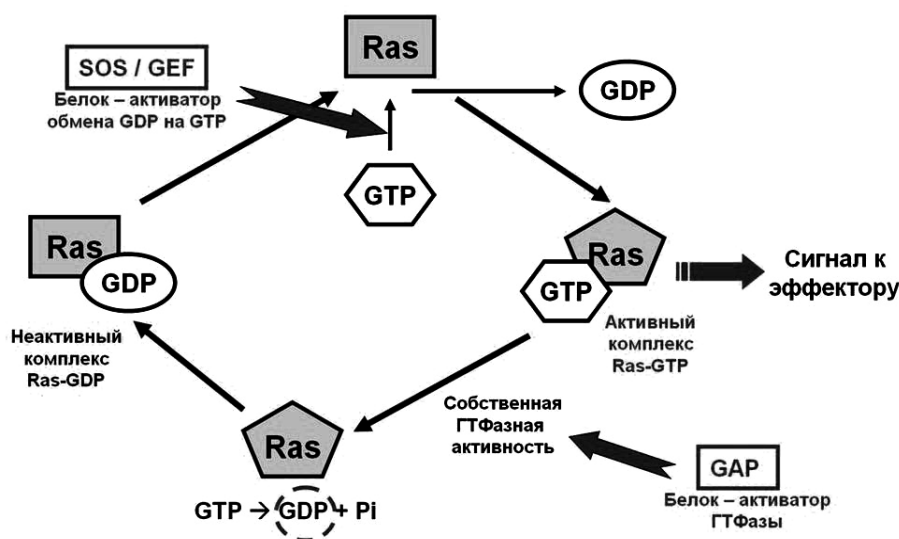


Рис. 97. Схема процесса активации-инактивации белка Ras (ГТФазный цикл)

Гуанозин-связывающий регион белка **Ras** имеет выраженную гомологию с подобным регионом в гетеротримерных **G-белках**. **Ras** постоянно циркулирует между своими активной и неактивной формами. Механизм процесса следующий. Связывание фактора роста со своим рецептором (с рецепторной тирозинкиназой) в конечном итоге индуцирует образование **активного комплекса Ras-ГТФ**. Активатором процесса является **белковый фактор, обменивающий гуаниновые нуклеотиды (guanine nucleotide exchange factor = GEF)**. Под его влиянием осуществляется замена ГДФ на ГТФ. Важно помнить, что фактор **GEF** имеет второе название – **SOS** (от Son of Sevenless – названия мутации белка **GEF** у дрозофил) – и часто обозначается как **GEF/SOS**. Гидролиз ГТФ приводит к образованию **неактивного комплекса Ras-ГДФ**. Собственная ГТФазная активность белка **Ras** сравнительно слабая. Для усиления гидролиза ГТФ существует регуляторный белок **GAP (GTPase-activating protein)**. **GAP** связывается с комплексом **Ras-ГТФ** и увеличивает его ГТФазную активность более, чем в 100 раз. Таким образом, белок **Ras** активируется под действием белка **GEF/SOS** и инактивируется под влиянием другого белка – **GAP**. Схема активации-инактивации белка **Ras** (ГТФазный цикл) представлена на рис. 97.

Белок **Ras** имеет в клетке несколько мишеней. К наиболее значимым следует отнести: **серин-треониновую протеинкиназу Raf**, являющуюся первой киназой киназного каскада, который составляет собственно **MAPK** сигнальный путь, а также **фосфатидилинозитол-3-киназу (ФИЗК)**, **ПКС** и другие белки, вовлекающие белок **Ras** во множество внутриклеточных сигнальных путей.

Тирозинкиназная активность цитозольных доменов рецептора может быть инактивирована в результате фосфорилирования этих доменов по определенным остаткам **серина** и **треонина**. Такое фосфорилирование обеспечивают другие протеинкиназы, например **ПКА** и **ПКС**.

Молекулярная организация сигнального пути *МАПК*

Последовательность событий от момента взаимодействия митогена с рецептором до включения сигнального пути *МАПК* можно условно разделить на три этапа:

1 этап. Взаимодействие митогена со специфическим рецептором и активация рецепторной тирозиновой киназы. Аутофосфорилирование цитозольных доменов рецептора по остаткам тирозина приводит к созданию сайтов связывания (докинг-пунктов) для адапторных белков, содержащих **SH2-домены**.

2 этап. Активация белка Ras. К фосфотирозинам цитоплазматических доменов присоединяется адапторный белок **Grb2** с помощью своего **SH2-домена**. Этот же белок, благодаря своему второму домену – **SH3-домену**, специфически связывается с цитозольным белком **GEF/SOS** и формирует активный комплекс **Grb2-GEF/SOS**. Далее этот комплекс взаимодействует с белком **Ras**, прикрепленным к внутреннему слою цитоплазматической мембраны и находящимся в неактивной форме. Активированный фактор **GEF/SOS** катализирует обмен ГДФ, связанного с **Ras**, на ГТФ. В итоге белок **Ras** переходит в активную форму – **Ras-ГТФ**.

Связанная с мембраной мутантная форма **GEF/SOS** способна перманентно активировать белок **Ras**.

3 этап. Активация киназного каскада, составляющего сигнальный путь *МАПК*. Активированный **Ras** связывается с N-концевым доменом цитозольной серин-треониновой *протеинкиназы* **Raf**, фиксирует её в примембранной области и активирует **Raf**. Название киназы **Raf** происходит от названия гена, выделенного из ретровируса, который трансформирует культуру фибробластов в опухолевые клетки – клетки вирус-индуцированной фибросаркомы: **Rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)**. Киназа **Raf** – первая киназа в составе каскада из трех ферментов, который составляет сигнальный путь *МАПК*. В общем виде эти этапы можно схематично представить следующим образом (рис. 98).

Важно подчеркнуть, что большое количество процессов сигнальной трансдукции, в которую вовлечены этапы белок-белковых взаимодействий, протекает на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны, т. е. там, где пространство ограничено двумерным пространством. Вероятность столкновения молекул в двумерном пространстве значительно выше, чем в трехмерном пространстве цитозоля.

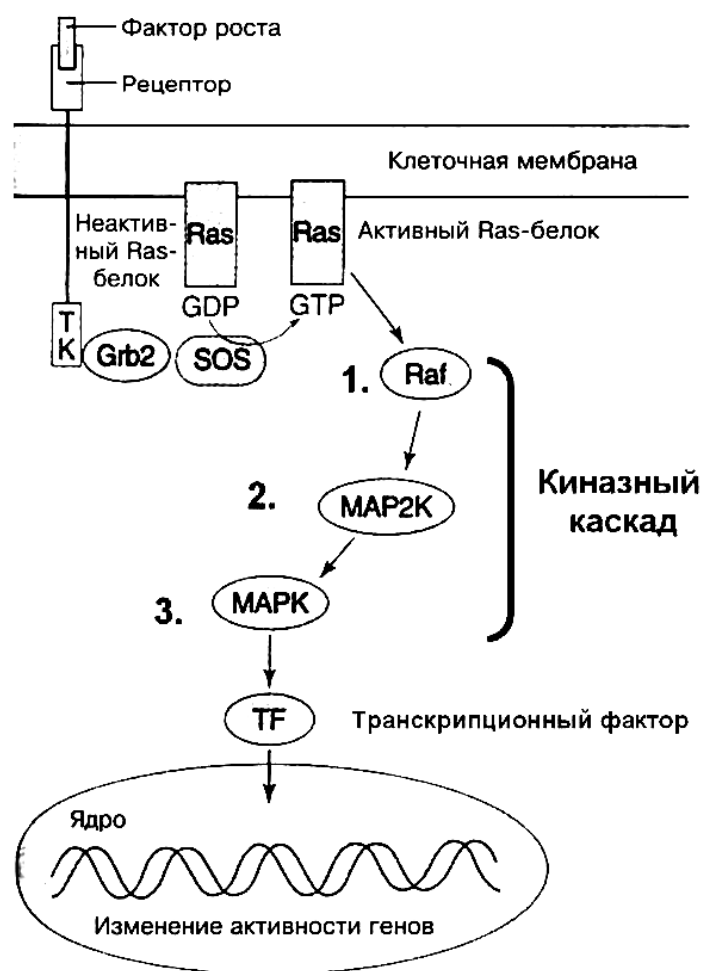


Рис. 98. Молекулярная организация сигнального пути *МАПК*
[Пальцев М.А. и др., 2003]

Сигнальный путь назван по имени последней (на схеме № 3) киназы: митоген-активируемой протеинкиназой (МАПК). МАПК (МАРК) является серин-треониновой протеинкиназой. МАРК непосредственно активируется с участием лежащей «выше по течению» тирозин-треониновой киназы, получившей название киназы МАР киназы (МАР2К, на схеме № 2).

Киназа Raf может быть активирована не только с помощью белка Ras (Ras-ГТФ), но и с помощью протеинкиназы C, например, в случае её активации под действием **форболового эфира** (рис. 99).

Мутантная форма белка **Ras** с нарушенной ГТФазной активностью не гидролизует ГТФ, оставаясь в перманентно активном состоянии, и, следовательно, постоянно активирует **МАП-киназный** каскад, что заставляет клетки делиться даже при отсутствии факторов роста. Такая **мутантная форма белка Ras** обнаружена в 20 % раковых клеток человека.

Следует отдельно пояснить терминологию, используемую при обозначении киназ, составляющих ферментативный каскад. Каждая из киназ имеет **двойные (альтернативные) названия или обозначения**, которые сложились по мере исследования сигнального пути **МАПК**.

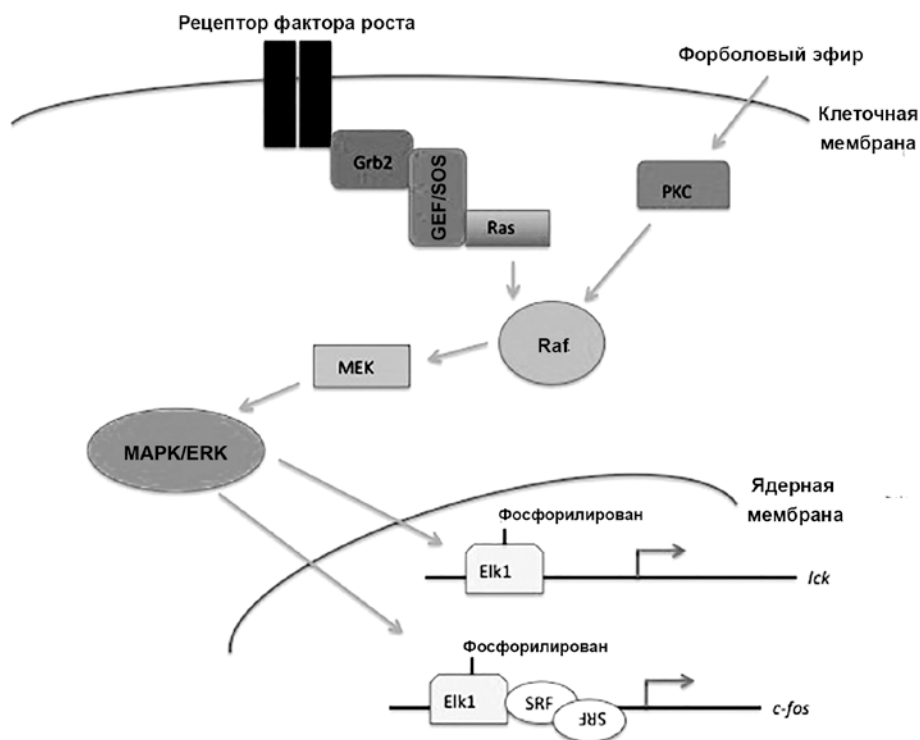


Рис. 99. Два пути активации протеинкиназы Raf

c-fos, c-mys и пр. – онкогены, которые вызывают бласттрансформацию – серию митотических делений.

Киназа № 1: **Raf**, серин-треониновая протеинкиназа. Альтернативное название – **киназа киназы МАП-киназы**, или **МАПЗК**.

Киназа № 2: **MEK** (**Mitogen Extracellular Signal-Regulated Kinase**), тирозин-треониновая протеинкиназа. Альтернативное название – **киназа МАП-киназы**, или **МАП2К**.

Киназа № 3: **ERK** (**Extracellular Signal-Regulated Kinase**), серин-треониновая протеинкиназа. Альтернативное название – **митоген-активируемая протеинкиназа**, или **МАПК**.

Итогом запуска сигнального пути МАПК является то, что активированная **МАП-киназа (ERK)** фосфорилирует и активирует таким способом **множество белковых субстратов**, включая ряд **транскрипционных факторов**. Так, активированная **МАПК/ERK** проникает в ядро, где фосфорилирует и активирует этим транскрипционный фактор **Elk1**. Далее **Elk1** присоединяет белок **SRF** (**se- rum response factor – сывороточный фактор ответа**), и этот комплекс (**Elk1-SRF**) активирует гены, необходимые для деления клетки. В целом сигнальный путь МАПК представлен на рис. 100:

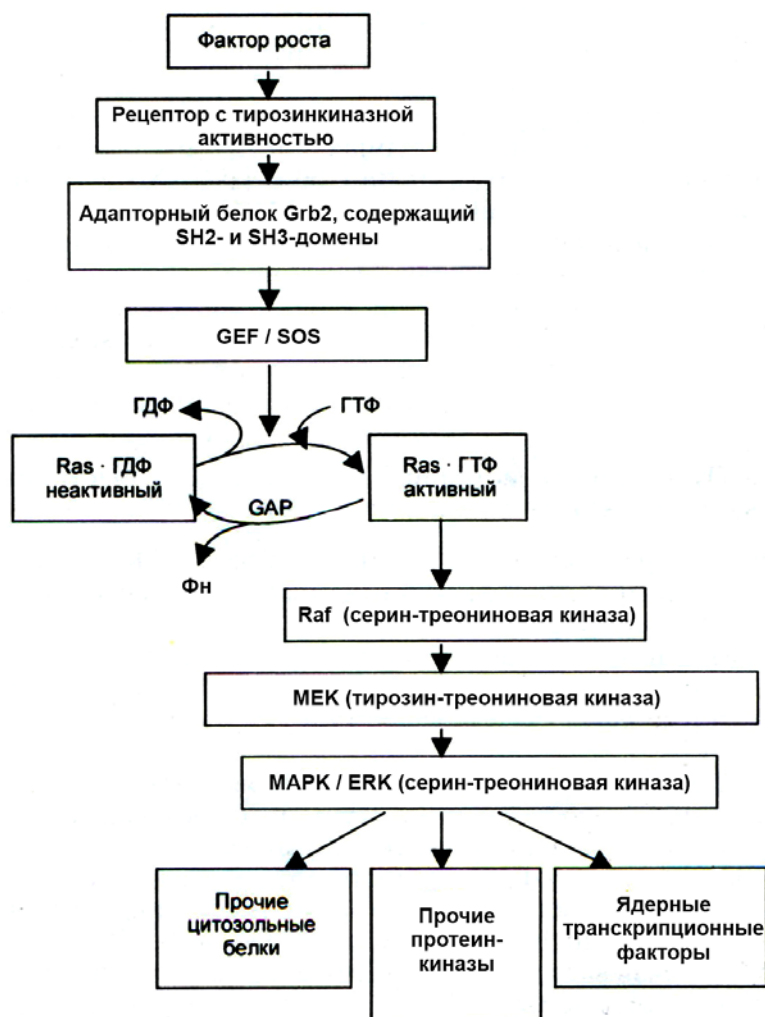


Рис. 100. Схема сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) [Пальцев М.А. и др., 2003]

Полагают, что биологический смысл существования киназного каскада состоит в следующем:

1. Необходимость сохранения специфики регуляторного сигнала. **МАПК** – активный фермент, имеющий множество мишеней, следовательно нуждается в жёсткой регуляции. Поэтому **MEK** – единственный активатор для **МАПК**. Объединение трех киназ в единый каскад – один из способов сохранить специфику сигнала.

2. Строгая **последовательность** в активации членов киназного каскада – создание условий для **усиления сигнала**.

3. Продолжительность действия регуляторного сигнала способна существенно повлиять на конечный результат. Так, рецептор, обладающий собственной тирозинкиназной активностью, и белок **Ras** сравнительно **быстро инактивируются** под действием **тирозинфосфатазы** и **GAP** соответственно. В то же время **каскад МАПК** остаётся активным на протяжении гораздо большего времени.

4. Регуляторный сигнал необходимо **передать из одного компартмента клетки (плазматическая мембрана) в другой** – в ядро. Сигнальный путь **МАРК** не использует в своей работе молекулы – вторичные мессенджеры. **МАРК/ERK** – единственный белок, непосредственно проникающий в ядро после своей активации.

Основные механизмы «выключения» митогенной сигнализации:

- диссоциация комплекса лиганд-рецептор;
- дефосфорилирование цитозольных доменов рецептора с участием внутриклеточных фосфопроteinфосфатаз;
- фосфорилирование цитозольных доменов рецептора по остаткам серина и треонина с участием протеинкиназ A и C;
- с участием прочих специфических фосфо-(тирозин-серин-треонин)-фосфатаз удаление остатков фосфорной кислоты из внутриклеточных белков (адаптерных и промежуточных протеинкиназ), что отменяет эффекты их активации, обусловленные фосфорилированием.

Другие пути передачи митогенного сигнала

Наряду с сигнальным путем **МАРК**, митогенный (пролиферативный) сигнал может быть также передан другими способами.

1. JAK-STAT-сигнальный путь. В то время как сигнальный путь **МАРК** берёт начало от активированного рецептора, обладающего тирозинкиназной активностью, митогенная сигнализация, исходящая от **цитокинов**, опосредуется рецепторами другого класса – **некаталитическими рецепторами** (называемыми также **рецепторами цитокинов**). Активация рецептора выражается в изменении его конформации и димеризации, что придает его цитозольным доменам способность взаимодействовать с внутриклеточными тирозиновыми протеинкиназами и **активировать их**. К числу таких киназ, прежде всего, относятся тирозиновые *киназы* **Src** (прикреплена к внутреннему слою цитоплазматической мембраны) и **Янус-киназа (JAK)**, которая в неактивной форме нековалентно ассоциирована с цитоплазматическим доменом рецептора. Обе киназы подробно рассмотрены в лекции 7. **Активированные рецептором киназы Src и JAK** фосфорилируют остатки **тирозина** в составе цитозольных доменов рецептора, создавая этим сайты для связывания внутриклеточных белков-посредников, имеющих **SH2-домены**, которые передают сигнал «вниз по течению» к исполнительным молекулам. Для **JAK-STAT-сигнального пути** таким посредником является **белок STAT** (signal transducer and activator of transcription). В неактивной форме он находится в форме мономера в цитоплазме и не фосфорилирован. После появления фосфотирозинов на цитозольных доменах рецептора белки **STAT** связываются с этими фосфотирозинами благодаря наличию в их составе **SH2-доменов**. Это создаёт условия для фосфорилирования **STAT** с участием **JAK**. Активированные фосфорилированием **STAT** отделяются от рецептора и образуют **гомодимер**, который проникает в ядро и вызывает экспрессию специфических генов. Типичным примером инициации двух разных сигнальных путей, несущих пролиферативный сигнал, является сигнала-

лизация цитокином **эритропоэтином**. **Эритропоэтин** способен формировать гетеродимеры из некаталитических рецепторов, каждый из которых обладает специфическими свойствами. Это позволяет с помощью одного цитокина запускать два разных митогенных сигнальных пути: **сигнальный путь МАПК** и **сигнальный путь JAK-STAT**, обеспечивающий созревание эритроцитов (рис. 101):

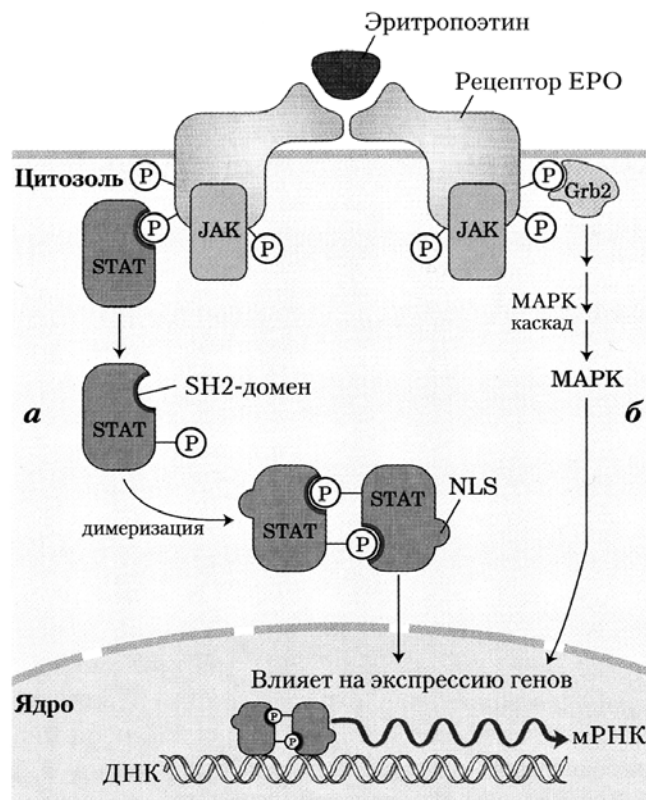


Рис. 101. Цитокин эритропоэтин запускает два разных митогенных сигнальных пути путём образования гетеродимера из некаталитических рецепторов со специфическими свойствами [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

***а** – сигнальный путь **JAK-STAT**, который активирует синтез белков, необходимых для созревания эритроцитов;*

***б** – сигнальный путь **МАПК**.*

2. Митогенная сигнализация посредством ядерного транскрипционного фактора κB (nuclear factor kappa B – NF κ B). Неактивный NF κ B (одна из версий гетеродимера: белки p105 и p50) существует в цитоплазме в форме комплекса с белком-ингибитором (IkB). Активация рецепторов факторов роста или цитокинов фосфорилирует киназу IKK ингибиторного белка IkB. Активированная киназа фосфорилирует ингибитор IkB, который диссоциирует из комплекса, а NF κ B переходит в активное состояние: белки p105 и p50 проникают в ядро и активируют определенные гены (рис. 102):

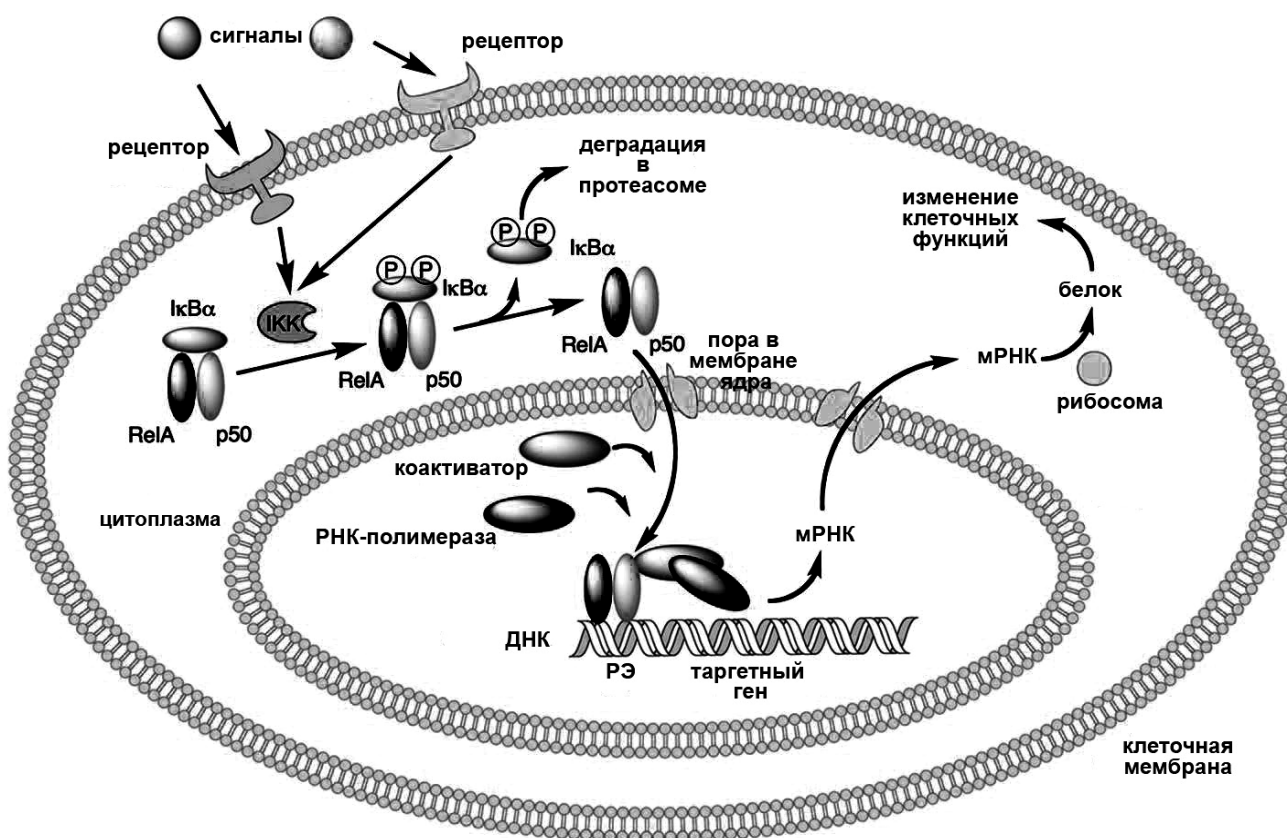


Рис. 102. Схема трансдукции митогенного сигнала посредством ядерного транскрипционного фактора *kB* (NFkB)

RelA и *p50* – один из вариантов составляющих гомодимера **NFkB**, находящегося в неактивной форме, поскольку он связан с белком-ингибитором **IkB**. **IKK** – киназа белка-ингибитора **IkB**. **РЭ** – респонсивный элемент в составе молекулы ДНК, с которым связывается активированный **NFkB**.

Сигнализация посредством транскрипционного фактора **NFkB** отличается чрезвычайной быстротой ответа, поскольку не требует синтеза белка de novo. Готовый к активации комплекс **p105/p50/IkB** всегда в достаточном количестве присутствует в цитоплазме клеток.

Сигнальные пути инсулина

Сигнал от инсулина внутри клетки поступает:

- к инсулин-чувствительным метаболическим ферментам;
- в ядро, влияя на транскрипцию различных генов.

Строение рецептора инсулина и механизм его активации

Рецептор инсулина относится к классу рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью. В отличие от других представителей рецепторов этого класса, для которых димеризация является итогом активации специфическим лигандом, инсулиновый рецептор изначально является димером.

Он состоит из 2 α - и 2 β -субъединиц. Две внеклеточные α -субъединицы рецептора содержат гормон-связывающий домен (рис. 103):

Рецептор инсулина

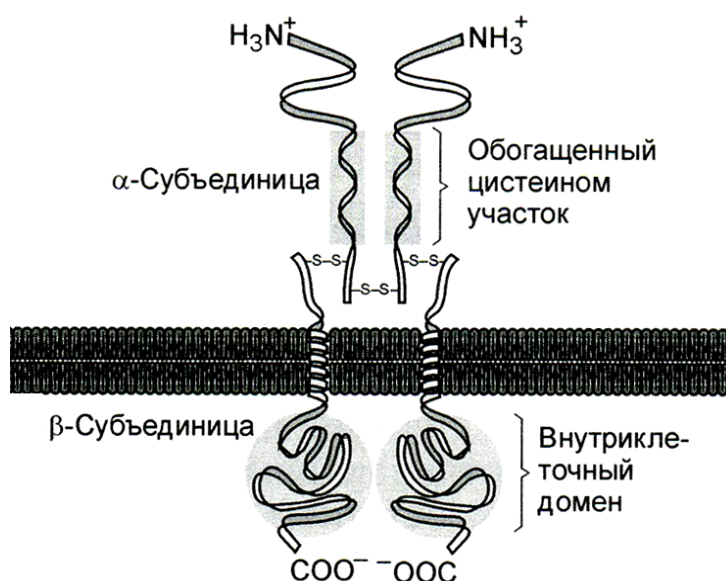


Рис. 103. Схема строения рецептора инсулина [Пальцев М.А. и др., 2003]

В результате связывания инсулина с двумя α -субъединицами рецептор активируется, что приводит к определенным конформационным перестройкам его β -субъединиц. Это происходит благодаря запуску **перекрестного аутофосфорилирования**, когда одна β -субъединица фосфорилирует вторую β -субъединицу (и наоборот) по трем остаткам тирозина. В результате этого в каждом цитоплазматическом домене открывается активный центр тирозинкиназы. Рецептор приобретает способность фосфорилировать остатки тирозина в составе других белков.

Активированный рецептор инсулина фосфорилирует по тирозину молекулу **субстрата рецептора инсулина-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1)**. IRS-1 с помощью своих фосфотирозинов связывается с адапторным белком **Grb2** посредством присутствующего в нём **SH2-домена**. Grb2 содержит второй домен – **SH3-домен**, обладающий высоким сродством к областям других белков, богатых пролином. С помощью **SH3-домена** белок **Grb2** связывается со следующим белком – **GEF/SOS**. Комплекс **Grb2-GEF/SOS** взаимодействует с белком **Ras**, осуществляя обмен гуаниновых нуклеотидов в его нуклеотид-связывающем центре: происходит замена **ГДФ** на **ГТФ**, что обеспечивает белку **Ras** активную конформацию (**Ras-ГТФ**).

Активированный **Ras** связывается с протеинкиназой **Raf-1**, являющейся первой протеинкиназой в сигнальном каскаде **МАПК** и активирует её. В этом каскаде каждая из протеинкиназ последовательно активирует следующую путем её фосфорилирования. Так, **киназа Raf-1** активирует **киназу MEK**, фосфорилируя её по остаткам серина; **киназа MEK** активирует **киназу МАПК (ERK)**,

фосфорилируя её по остаткам треонина и тирозина. Активированная **МАПК (ERK)** проникает в ядро, где фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор **Elk1**. Далее, **Elk1** присоединяет белок **SRF (serum response factor – сывороточный фактор ответа)**, и комплекс **Elk1/SRF** активирует гены, необходимые для деления клетки (рис. 104):

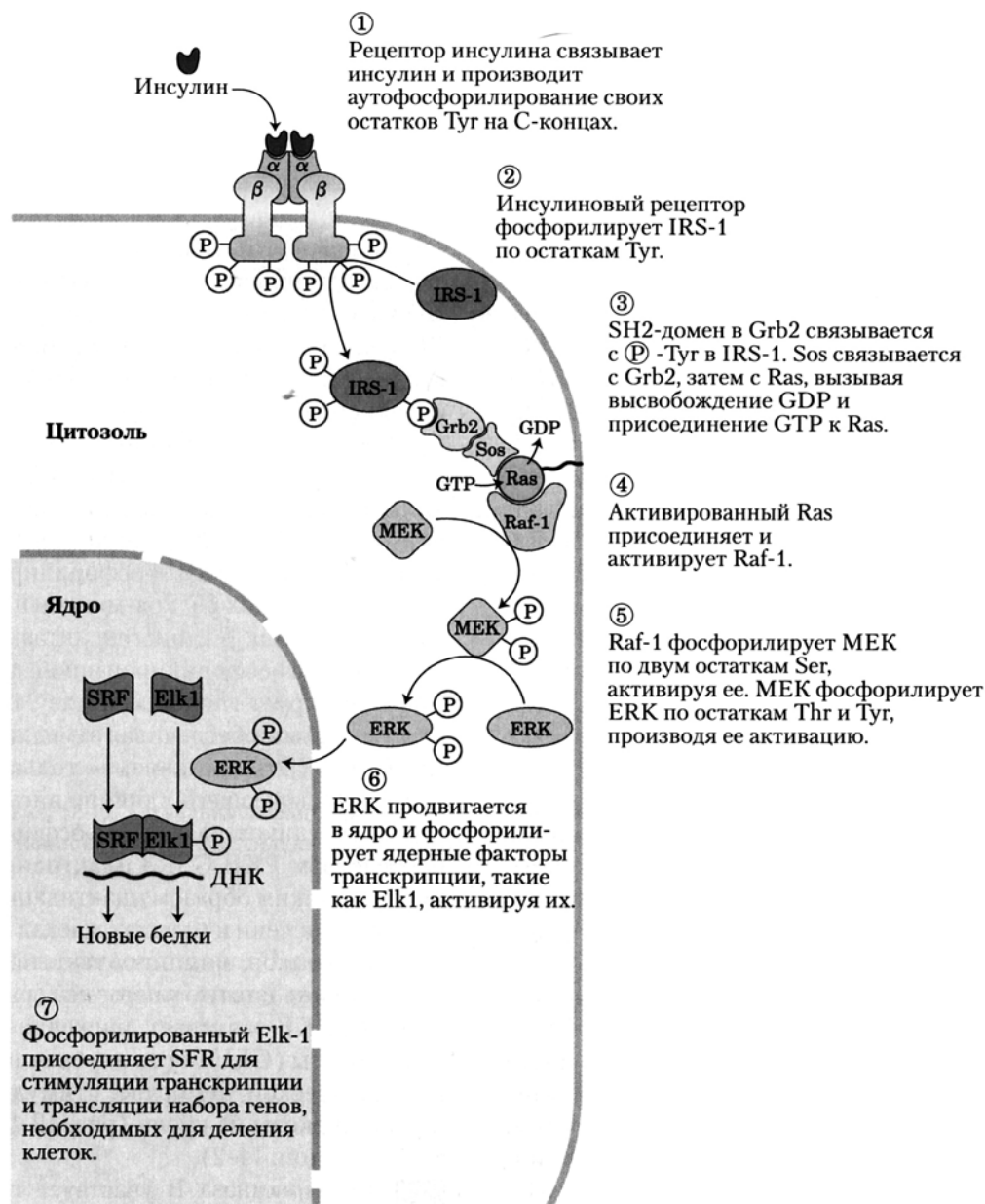


Рис. 104. Регуляция инсулином экспрессии генов
[Нельсон Д., Кокс М., 2011]

Регуляция инсулином активности гликогенсинтазы в печени и мышцах

На уровне активированной инсулиновым рецептором молекулы **IRS-1** происходит «разветвление» сигнальных путей. Так, **IRS-1** может взаимодействовать также с особой киназой – **фосфоинозитид-3-киназой (ФИЗК)** – благодаря наличию в её составе **SH2-домена**. Активированная таким образом **ФИЗК** фосфорилирует мембранный **фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2)** в

положении 3 инозитола, в результате чего образуется **фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат (ФИФ3)**. Молекула **ФИФ3** остается во внутреннем листке плазматической мембраны. Её несущая отрицательные заряды головка обращена в сторону цитоплазмы и служит **начальным пунктом собственного киназного каскада**. Так, с **ФИФ3** связывается протеинкиназа **PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1)**, которая, в свою очередь, связывает и активирует **протеинкиназу В (ПКВ)** путем её фосфорилирования по остаткам серина и треонина.

Одной из мишеней **ПКВ** является **киназа 3-гликогенсинтетазы (GSK3)**, которая активна в нефосфорилированной форме. В отсутствие сигнала инсулина **GSK3** фосфорилирует **гликогенсинтетазу** и этим инактивирует её, подавляя синтез гликогена. Когда **GSK3** фосфорилируется с помощью **ПКВ**, **GSK3** теряет свою активность. В результате этого **гликогенсинтетаза** перестает фосфорилироваться и остается в активной (нефосфорилированной) форме – синтез гликогена усиливается. Благодаря этому **инсулин стимулирует синтез гликогена в мышцах и печени** (рис. 105):

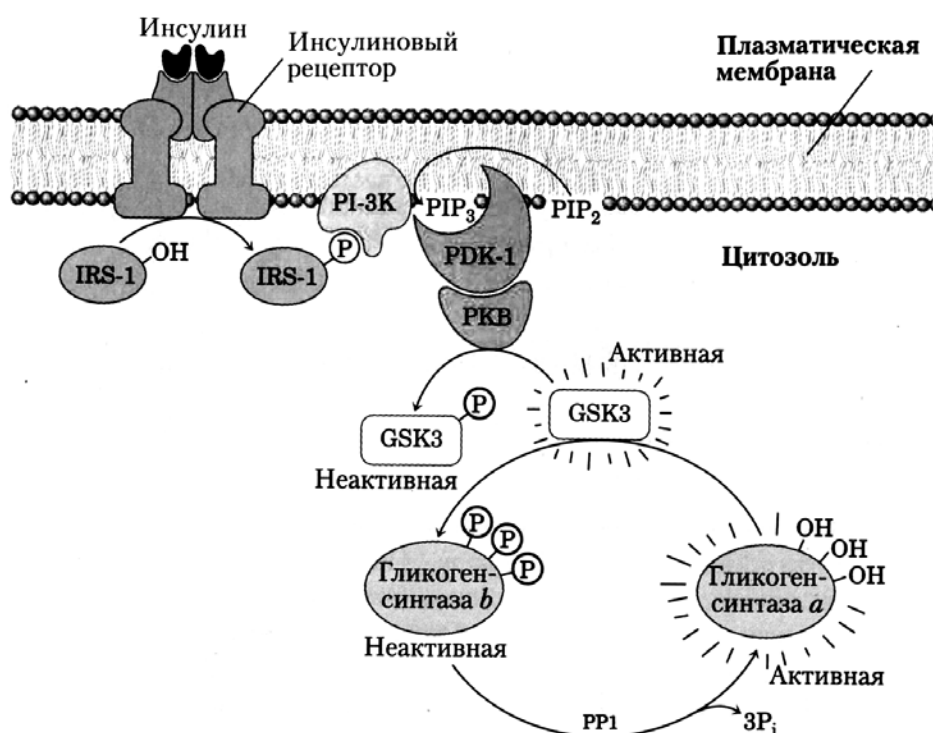


Рис. 105. Регуляция инсулином активности гликогенсинтазы в мышцах и печени [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора-1; **PI-3K** – фосфатидилинозитол-3 киназа; **PIP₂** – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; **PIP₃** – фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат; **PDK-1** – фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1; **ПКВ** – протеинкиназа В; **GSK3** – киназа-3 гликогенсинтазы; **PP1** – фосфопротеинфосфатаза-1.

Роль активированной инсулином протеинкиназы В в механизме транспорта глюкозы через мембрану инсулин-зависимых клеток

Другим эффектом активированной **ПКВ** является **запуск экзоцитоза цитоплазматических везикул, содержащих ГЛЮТ4**, благодаря чему транспортер встраивается в плазматическую мембрану, что стимулирует поглощение глюкозы из крови мышцами и другими инсулин-зависимыми клетками (рис. 106):

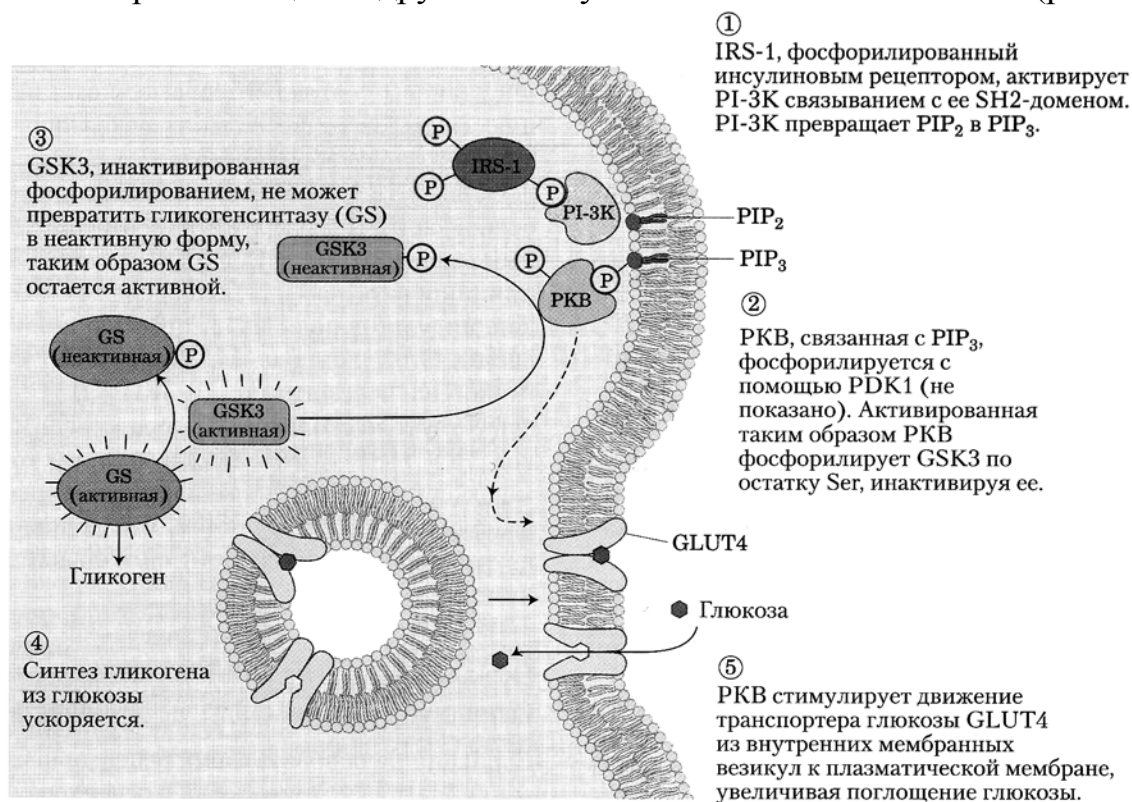


Рис. 106. Роль активируемой инсулином протеинкиназы В в стимуляции синтеза гликогена и транспорте глюкозы из крови в инсулин-зависимые клетки [Нельсон Д., Кокс М., 2011]

IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора-1; **PI-3K** – фосфатидилинозитол-3 киназа; **PIP_2** – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; **PIP_3** – фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат; **PKB** – протеинкиназа В; **GSK3** – киназа-3 гликогенсинтазы; **GS** – гликогенсинтаза; **GLUT4** – ГЛЮТ4.

ПКВ фосфорилирует по 5 остаткам тирозина белок **AS160**. Активированный **AS160** посредством **GEF/SOS** переводит неактивный белок **Rab** (ещё один представитель семейства малых **G-белков**) в активную конформацию. Активный **Rab** участвует в обеспечении переноса **ГЛЮТ4-содержащих везикул** из цитозоля в плазматическую мембрану.

Механизм подавления инсулином синтеза ферментов глюконеогенеза

Активированная инсулином **ПКВ** проникает в ядро, где фосфорилирует инсулин-респонсивный транскрипционный фактор **FOXO1 (forkhead box protein O1)** по остаткам серина и треонина. В результате этого фосфорилированный **FOXO1** диссоциирует с инсулин-респонсивных участков генов, кодирующих ключевые ферменты глюконеогенеза: **фосфоенолпируваткарбоксикиназу** и **глюкозо-6-фосфатазу**, вследствие чего активность глюконеогенеза в печени

снижается. Покинувший ядро фосфорилированный **FOXO1** в цитоплазме подвергается протеолитической деградации.

Следует подчеркнуть, что единичный рецептор инсулина, действуя через разные представители белков семейства **IRS**, способен «включить» несколько разных сигнальных путей посредством соответствующих белков-посредников, содержащих **SH2-домены**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) является основным путём передачи пролиферативного сигнала внутрь клетки от внешних митогенов – факторов, стимулирующих митозы: цитокинов (интерлейкинов, интерферонов, ФНО и др.), факторов роста, гормона инсулина и медиаторов воспаления. Сигнальный путь действует во всех типах клеток. Путь неактивен в дифференцированных и неделящихся клетках, но активируется в случае необходимости репарации поврежденной ткани. Эффекты митогенов могут быть переданы также посредством протеинкиназы C, JAK-STAT-сигнального пути и ядерного транскрипционного фактора NF κ B.

Все вышеперечисленные первичные мессенджеры являются лигандами рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью (рецепторных тирозинкиназ). Активированный митогеном рецептор осуществляет передачу сигнала внутрь клетки посредством формирования «цепочки» адапторных белков в последовательности Grb2 $\rightarrow$ Ras. После активации белка Ras последний активирует киназу Raf – первую из трёх киназ, составляющих киназный каскад, что служит для усиления регуляторного сигнала. Происходят последовательные акты фосфорилирования Raf $\rightarrow$ MEK $\rightarrow$ МАПК (ERK). Итогом запуска сигнального пути МАПК является то, что активированная МАПК (ERK) фосфорилирует множество белковых субстратов, включая ряд транскрипционных факторов, активирующих гены, необходимые для деления клетки.

JAK-STAT-сигнальный путь берёт начало от активированного рецептора, относящегося к другому классу: некаталитического рецептора, или рецептора цитокинов. Ключевую роль во внутриклеточной передаче сигнала играет особая киназа – Янус-киназа (JAK), которая активирует белки STAT, фосфорилированные формы которых в виде гомодимеров проникают в ядро и вызывают экспрессию специфических генов. Рецепторы цитокинов, формируя димер в процессе своей активации, способны образовывать гетеродимер, тем самым обеспечивая одновременный запуск двух разных митогенных сигнальных путей с помощью одного цитокина (например, сигнальные пути МАПК и JAK-STAT).

Сигнализация посредством транскрипционного фактора NF κ B отличается чрезвычайной быстротой ответа, поскольку не требует синтеза белка de novo.

Сигнальный путь инсулина берет начало от рецептора, обладающего тирозинкиназной активностью и изначально являющегося димером. Ключевую роль во внутриклеточном этапе передачи инсулинового сигнала играет белок IRS-1. IRS-1, будучи фосфорилирован активированным рецептором, становится «пунктом разветвления» нескольких сигнальных путей. Во-первых, посредством адапторного белка Grb2 происходит запуск сигнального пути МАПК. Во-вторых, посредством активации киназы ФИ-3К в плазматической мембране образуется ФИФ3, от которого выстраивается собственный каскад киназ, в итоге приводящий к активации протеинкиназы B. Активированная протеинкиназа B участвует в регуляции нескольких важнейших метаболических процессов, опо-

средуя сигналы инсулина, направленные на активацию синтеза гликогена в мышцах и печени, обеспечение встраивания ГЛЮТ4 в мембрану инсулин-зависимых клеток (транспорт глюкозы из крови в цитоплазму) и снижение в печени активности глюконеогенеза путем подавления экспрессии генов, кодирующих его ключевые ферменты.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия : учеб. для студ. мед. вузов / под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.
2. Пальцев, М. А. Межклеточные взаимодействия / М. А. Пальцев, А. А. Иванов, С. Е. Северин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2003. – 288 с.
3. Плакунов, В. К. Основы энзимологии [Электронный ресурс] / В. К. Плакунов. – М. : Логос, 2002. – 128 с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
4. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. : пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – Т. 1. – 694 с.
5. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. : пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – Т. 2. – 636 с.
6. Фаллер, Д. М. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей : пер. с англ. / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : Издательство БИНОМ, 2014. – 256 с.

Учебное издание

Авторы:

Дмитрий Иванович Кузьменко
Татьяна Константиновна Климентьева

ИНТЕГРАТИВНАЯ БИОХИМИЯ.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

Курс лекций

Редактор В.А. Антонова
Технический редактор О.В. Коломийцева

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(3822) 51–41–53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 27.04.17
Формат 60х84_{1/8}. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. л. 26. Авт. л. 10.
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru