

ENZIMOLOGIJA

LASTELĖS STRUKTŪRINĖS ORGANIZACIJOS SVARBA FERMENTŲ VEIKLAI. ERDVĖSKYRA. METABOLITŲ TUNELIAVIMAS.

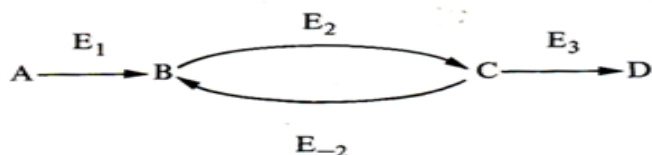
Tradicinė enzimologija sukuria ląstelės-maišelio, užpildyto fermentų ir metabolitų tirpalo, įvaizdį. Tame maišelyje fermentai veikia kaip nepriklausomi katalizatoriai jungiami homogenišku metabolitų koncentracijų. Tai yra mėgintuvėlio sąlygų ekstrapoliacija, neįvertinanti fermentų tarpusavio sąveikos ir ląstelės struktūrinės organizacijos vaidmens.

1 lentelė Fermentų veiklos *in vitro* ir *in vivo* palyginimas

Savybė	<i>In vitro</i> (mėgintuvėlyje)	<i>In vivo</i> (ląstelėje)
<i>Aplinka</i>	homogeniška	heterogeniška
<i>Tirpalai</i>	praskiesti	koncentruoti
<i>Fermentų koncentracija</i>	maža	didelė (baltymai arti žemiausios tirpumo ribos)
<i>Substratų koncentracija</i>	didesnė negu fermentų	mažesnė arba tokia pati kaip negu fermentų
<i>Difuzija</i>	lengva	apsunkinta
<i>Sistema</i>	uždara	atvira

Kodėl fermentinių sistemų veikla funkciškai ir erdviškai organizuota?

Jeigu gyvose sistemose metaboliniai procesai nebūtų tokiu būdu kontroliuojami, medžiagų srautai būtų katastrofiškai nukreipti termodinaminės pusiausvyros link, nes tokia yra bendra visų savaiminių procesų savybė. Tačiau gyvosios sistemos sugeba panaudoti savaiminių reakcijų metu išsiskiriančią energiją ir ją panaudoti nesavaiminiams procesams. Daugelis reguliacinių fermentų katalizuoja reakcijas, kurios negrįžtamos fiziologinėmis sąlygomis. Jeigu leisime dviems priešingos krypties nepusiausvyrinėms reakcijoms vykti vienu metu toje pačioje erdvėje, kaip bendras rezultatas nebus stebimas metabolitų srautas, tik nuolatinis ciklinis judėjimas, vadinamas **“bergždžiuoju ciklu”** (angl. k. – *futile cycle*). Jo rezultatas yra nenaudingas energijos eikvojimas.

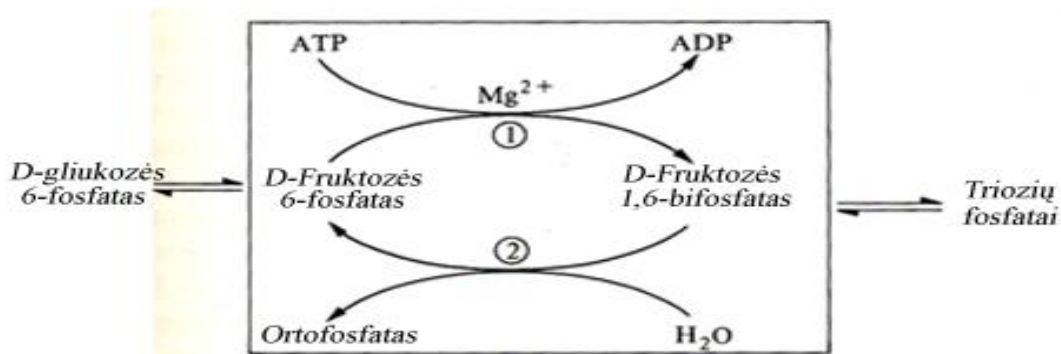


1 pav. Bergždžiasis arba substratinis ciklas

Tokie ciklai vyksta audiniuose, kur vienu metu veikia priešingos krypties medžiagų apykaitos keliai – sintezės ir skaidymo (pvz., glikogeno, riebalų rūgščių, triacilgliceridų). Tam tikruose audiniuose tokie procesai atskiriami erdviškai. Tačiau kituose, pvz., kepenyse jie vyksta vienoje erdvėje ir net yra svarbūs reguliaciniu požiūriu. Pastebėjus, jog tokie ciklai gali atlikti savitas funkcijas (“bergždi”, bet naudingi), jie pavadinti substratų ciklais. Pagrindiniai iš jų [Fell, p. 217]:

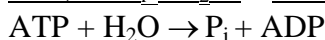
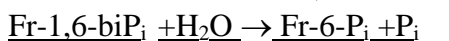
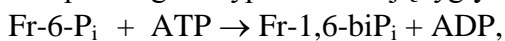
- 1) Glu/Glu- 6-P_i, t.y., gliukokinazė/gliukozės-6P1-fosfatazė;
- 2) Fr-6-P_i/Fr-1,6-biP_i, t.y., fosfofruktokinazė/fruktozo-1,6-bifosfatazė;
- 3) Piruvatas/Fosfoenolpiruvatas: fermentai piruvato kinazė/(piruvato karboksilazė + fosfoenolpiruvato karboksikinazė);
- 4) Mitochondrijų Ca²⁺išorinis/ Ca²⁺ vidinis: Ca²⁺pernaša į mitochondrijų vidų ir iš mitochondrijų katalizuoja skirtingi nešikliai.

Panagrinėkime (2) atvejį detaliau.



2 pav. fosfofruktokinazės ir fruktozo-1,6-bifosfatazės substratinis ciklas

Dvi priešingos krypties reakcijų lygtys sumuojasi:



Bendras abiejų reakcijų rezultatas yra ATP hidrolizė. Jei abiejų reakcijų greičiai bus lygūs, po kurio laiko ląstelę turėtų ištikti mirtis dėl energetinių resursų išsekimo.

Substratiniai ciklai turi vieną privalumą: juos sudarančių reakcijų greičius galima reguliuoti, keičiant fermentu aktyvumus. Abi reakcijos yra negrįžtamos, todėl bendras srautas kontroliuojamas 2 fermentų. **Paprasta pusiausvyrinė reakcija negalėtų būti reguliuojama fermentu, nes jie nekeičia reakcijos pusiausvyros.**

Daugeliu atvejų ląstelė apsaugoma nuo energetiškai nenaudingų bergždžių ciklų, atskiriant priešinga kryptimi vykstančias reakcijas erdviškai. Visgi bergždieji ciklai tam tikru laipsniu vyksta (pvz., žiurkės kepenyse O_2 poreikis gliukoneogenezei yra 10-30% didesnis už teoriškai paskaičiuota) ir netgi yra naudingi:

1) jie svarbus termogenezei, nes sukelia energijos išsibarstymą šilumos pavidalu. Atskiriantys baltymai (UCP – *uncoupling proteins*) rudųjų riebalų mitochondrijų membranoje sukelia membraninio potencialo išsibarstymą šilumos pavidalu, nes skatina bergždžios H^+ pernašos per membraną ciklą. Musės raumenyse bergždieji ciklai aktyvūs žemoje temperatūroje (todėl gaminasi endogeninė šiluma), bet labai nežymūs 27°C (kai pakanka išorinės šilumos).

2) badujančių gyvūnų bergždžių ciklų greitis dvigubai mažesnis, nei sočių. Taip pereinama į energijos “taupymo režimą”.

3) alosterinei kontrolei stiprinti. Mažos efektorių koncentracijos gali sukelti daug didesnius pokyčius tokiaime cikle, nei linijinėje reakcijų sekoje..

4) bergždžiuose cikluose “besisukančių” metabolitų koncentracijos gali efektyviai reguliuoti srautų persijungimą medžiagų apykaitos kelių sankirtos taškuose (metabolinėse kryžkelėse). Ciklai veikia kaip efektyvūs “jungikliai” metabolinių kelių išsišakojimo taškuose arba dvikrypčiuose keliuose.

5) Ciklai veikia kaip savotiški metabolitų koncentracijų buferiai.

Gyvųjų sistemų struktūros heterogeniškumas

Bergždžių ciklų pavyzdys rodo, kodėl ląstelei gali būti svarbus kai kurių procesų atskyrimas erdvėje, arba kitų procesų apjungimas. **Erdvinis nevienalytiškumas, arba heterogeniškumas yra būdingas universalus visų gyvųjų sistemų bruožas.** Kiekvieno fermento veikimui svarbi jo vieta ląstelėje (išsidėstymas tam tikroje ląstelės vietoje). Ląstelėje veikia kaip organizuotų fermentų sistemų visuma.

Heterogeniškumas pasireiškia visuose ląstelės (taip pat ir aukštesnių biologinių struktūrų – audinių, organų, individų populiacijų) struktūrinės organizacijos lygiuose. Įvairūs jo pasireiškimai apibendrinami terminu **erdvėskyra** (angl. k. – *compartmentation*). Erdvėskyros sąvoka plati ir nelengvai apibrėžiama. Paprasčiausias yra morfologinis erdvės skyrius (angl. k. – *compartment*) apibrėžimas:

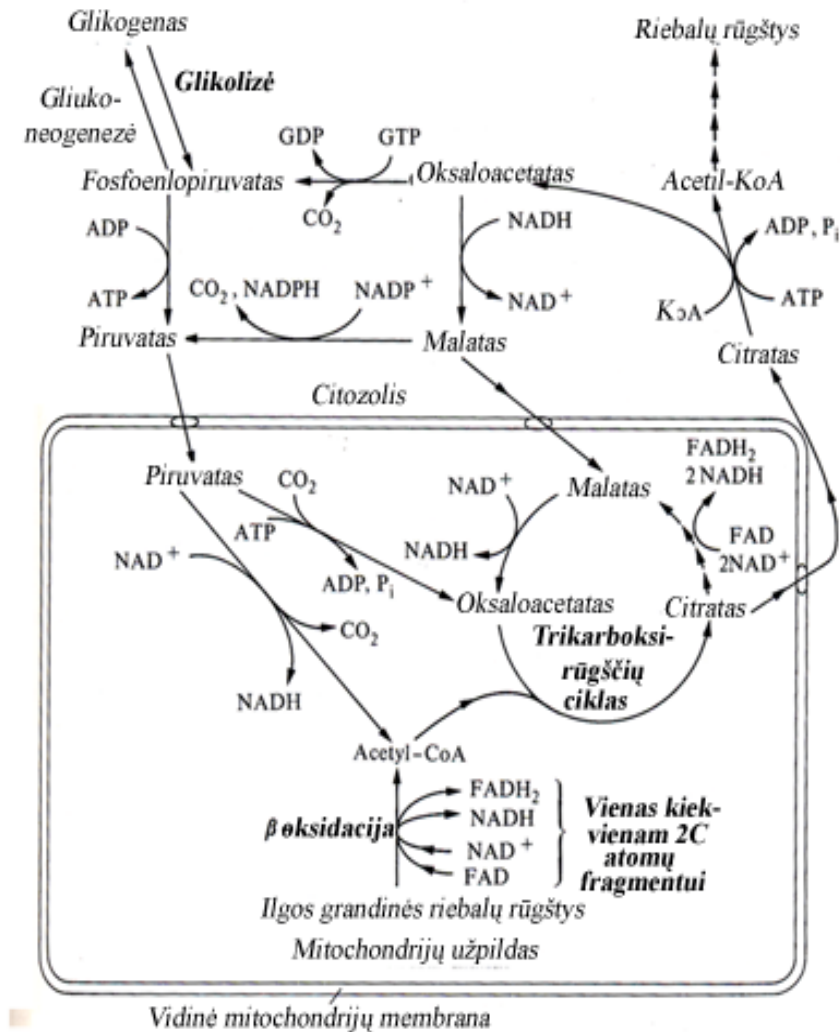
(1) **Erdvės skyrius** yra ląstelės erdvės dalis, apsupta fizinio pralaidumo barjero (pvz., membranos), kuris lemia medžiagų apykaitos erdvinę izoliaciją ir nepriklausomą reguliavimą.

Ląstelės membrana ją skiria nuo supančios aplinkos, ląstelės viduje metaboliniai procesai vyksta erdvės skyriuose: tai branduolys, jo užpildas, Goldži kompleksas, endoplazminis tinklas, mitochondrijos (savo ruožtu turinčios kelis vidinius erdvės skyrius, dvi skirtingas membranas, užpildą ir tarpmembraninę erdvę), lizosomos, granulės (krakmolo ar glikogeno), citozolis. Kiekvienoje iš šių erdvių yra fermentų, dalyvaujančių tam tikruose metaboliniuose procesuose sankaupos:

2 lentelė. Organelės kaip medžiagų apykaitos kelius skiriantys erdvės skyriai

Ląstelės erdvės skyrius	Fermentai žymenys	Savitos fermentinės sistemos (ir/ar medžiagų apykaitos keliai)
<i>Branduolys</i>	DNR polimerazė, nikotinamidų nukleotidų adeniltransferazė	DNR struktūros remodeliavimo ir genų raiškos valdymo, DNR replikacijos ir reparacijos, transkripcijos ir RNR brendimo, branduolio išnašos ir įnašos.
<i>Mitochondrijos</i>	Sukcinato dehidrogenazė, citochromo c oksidazė	Trikarboksilinių rūgščių ciklo, kvėpavimo grandinė ir ATP sintezės, UCP, 3-hidoksibutirato dehidrogenazė, karnitino palimitoiltransferazė, riebalų rūgščių β-oksidadacijos, dalies karbamido ciklo, adenilato kinazė ir kt.
<i>Endoplazminis tinklas</i>	Grūdėtojo: gliukozės fosfatazė 6-	<i>Lygusis</i> : Lipidų (sterolių) biosintezės, ksenobiotikų detoksifikavimo, riebalų rūgščių elongacijos, glicerolio fosfato aciltransferazė; <i>Grūdėtasis</i> : baltymų sintezės (išorinė membranos pusė) ir pernašos, baltymų glikozilavimo ir baltymų sulankstymo (saviti šaperonai, prolino izomerazė, PDI) ir kt.
<i>Lizosomos</i>	Rūgštinė fosfatazė, ribonukleazė	~50 hidrolazių (proteazės, glikozidazės, lipazės, Dnazės ir kt.)
<i>Peroksisomos</i>	Katalazė, urato oksidazė	H ₂ O ₂ susidarymo ir skaidymo fermentinės sistemos, ilgos grandinės riebalų rūgščių β-oksidadacijos, ilgos grandinės acil-KoA sintazė, D-aminorūgščių oksidazės, poliaminų oksidazė, oksalato oksidazė, trihidroksicholestanoilo oksidazė ir kt.
<i>Plazminė membrana</i>	5'-nukleotidazė	Medžiagų pernašos sistemos, receptoriai, NADPH oksidazės
<i>Citozolis</i>	Gliukozės fosfato dehidrogenazė, laktato dehidrogenazė, 6-fosfofruktokinazė 6-	Angliavandenių apykaitos (glikolizė, pentozo fosfatų kelias, MDH, ICDH, laktato dehidrogenazė) ir susijusios signalo perdavimo sistemos, lipidų apykaitos (riebalų rūgščių sintezės, acetil-KoA karboksilazė), aminorūgščių apykaitos ir baltymų sintezės, viduląstelinio baltymų skaidymo; nukleotidų ir nukleotidų kinazės.

Kai kuriais atvejais tos pačios nuoseklios metabolinės fermentų sekos (metabolinio kelio) nariai aptinkami keliuose skirtinguose erdvės skyriuose, bet dažniausiai tai būna skirtingos fermento izoformos.



3 pav. Angliavandenių ir riebalų rūgščių apykaitos kelių atskyrimas citozolio ir mitochondrijų erdvėse

Tokie erdvės skyriai vadinami **makrokompartamentais**, nes juose esančių metabolitų ir fermentų molekulių dydis žymiai mažesnis nei organelių (paties erdvės skyriaus) dydis. Kita vertus, makrokompartamentas gali būti sudarytas iš kelių erdvės skyrių. Pavyzdžiui, mitochondrijose galima išskirti 4 vidinius erdvės skyrius: išorinė membrana, tarpmembraninė erdvė, vidinė membrana, užpildas; chloroplastuose jų dar daugiau – išorinė membrana, tarpmembraninė erdvė, vidinė membrana, stroma, tilakoido membrana (kurios sudėtis skiriasi granos viduje ir išorėje bei lamelėje tarp granų), tilakoido užpildas.

Erdvės skyros sąvoka naudojama platesne prasme nei (1):

(2) Erdvės skyra vadinamas metabolitų sujungimas savitose jungimo vietose (angl. k. - *sequestration*), dėl kurio metabolito koncentracija labai skiriasi įvairiose erdvės vietose ir gali būti kontroliuojama labai mažu atstumu (pvz., lipofilinių medžiagų surišimas membranose; 75% citozolio ADP surišta miozino; substratų jungimas aukštu giminingumu fermentu aktyviuose centruose labai mažina jų koncentraciją citozolyje).

(3) Difuziniai gradientai (biofizikos sritis). Net tikrieji tirpalai nėra homogeniniai, galimos ištirpusių medžiagų koncentracijos fliktuacijos. Koloidiniai tirpalai dar heterogeniškesni (vidinė koloidinės dalelės sudėtis labai skiriasi nuo ją supančio tirpiklio sudėties). Ląstelės

membranų paviršiuje yra Debajaus-Hiukelio sluoksnis, kuriame H₂O ir kitos medžiagos pasižymi specifinėmis savybėmis - pakitusia dielektrine konstanta, poliškumu ir pan.

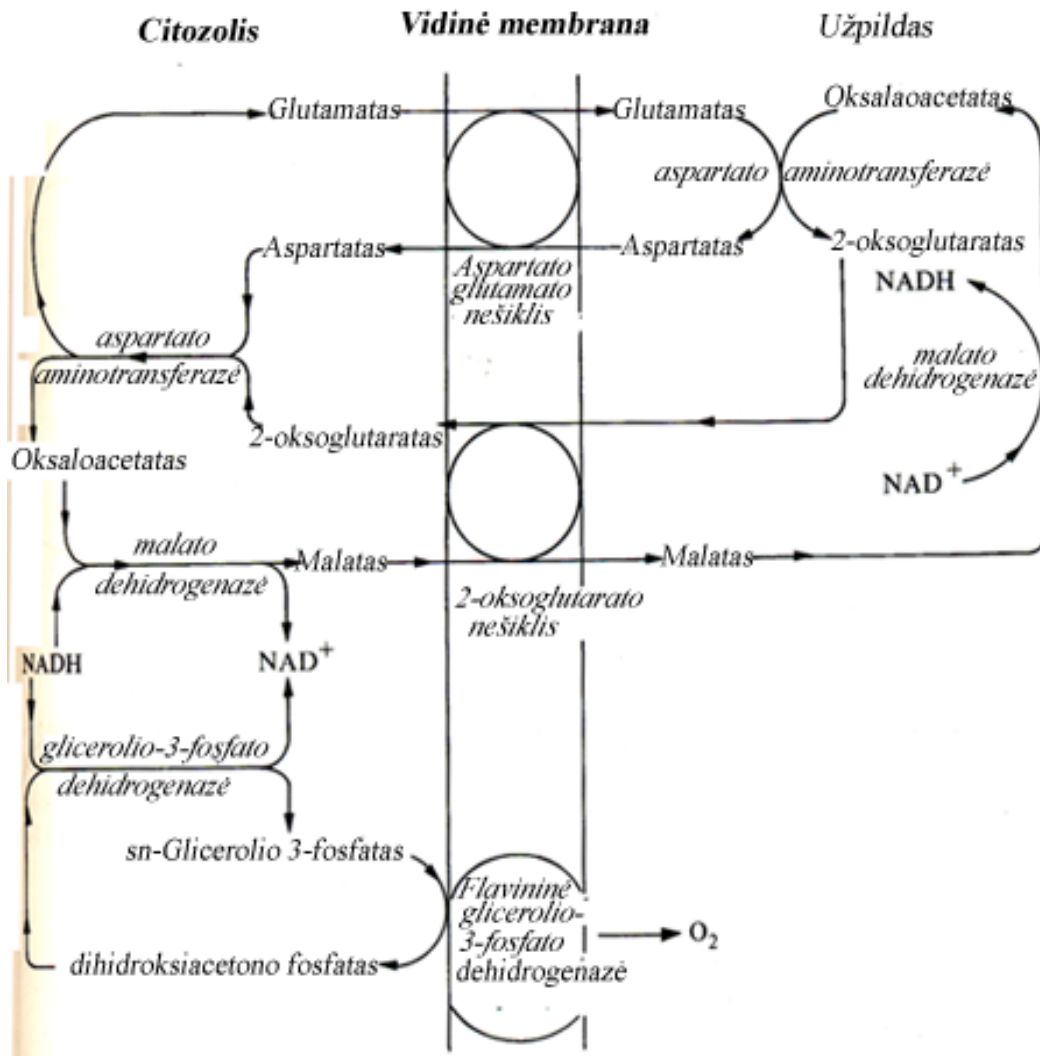
(4) Multifermentiniuose kompleksuose vyksta metabolitų **tuneliavimas** (angl. - *channelling*). Vidinėje fermento-fermento komplekso dalyje yra kanalas, kuriame tarpinių metabolitų koncentracijos skiriasi nuo aplinkinės terpės.

(2), (3), (4) atvejai vadinami **mikroheterogeniškumu** ir kartu su (1) jie sudaro viduląstelines erdvės skyrynas. Mikrokompartimentacija gali būti dinaminio pobūdžio - medžiagų heterogeniško pasiskirstymo kitimai laike gali turėti gradientų (gliukozė, deguonis) arba osciliacijų pobūdį (gliukozė, NADH).

Galima dar viena erdvės skyryna: (5) **tarpląstelinė erdvės skyryna**. Organus sudaro skirtingi funkciniai ar rūšinių požiūriu lastelių tipai. Toks heterogeniškumas audinio lygyje būdingas kepenims. Kepenis sudaro 78% hepatocitų, 2.8% endotelinių lastelių, 2.1% - Kupferio lastelių, 1.4% - riebalinių lastelių, 15.9% - tarpląstelinė erdvė. Šie lastelių tipai skiriasi morfologija, funkcijomis, biocheminiu sąsata. Tačiau netgi tarp pačios rūšies lastelių (pvz., hepatocitų) pasireiškia heterogeniškumas. Jų funkcija ir fermentų sąsata priklauso nuo lastelės išsidėstymo kraujagyslių (artos ar venos) atžvilgiu. Prie aortos esančiuose hepatocituose yra daugiau O₂, substratų, hormonų, daugiau mitochondrijų (o jose - kristų), Krebso ciklo fermentų, intensyviai vyksta oksidacinis fosforilinimas, β-oksidacija, aminorūgščių katabolizmas, ureagenezė iš aminorūgščių, gliukoneogenezė, tulžies rūgščių ekskrecija. Prie venos esančiame audinyje daugiau CO₂, mažiau substratų, hormonų, hepatocituose dominuoja glikolizė, liponeogenezė, ureagenezė iš NH₄, detoksikacijos procesai. Toks reiškinys vadinamas **metaboliniu zoniškumu**. Zoniškumas gali būti mozaikinio pobūdžio – pvz., tik kai kurie atsitiktiniai hepatocitai sintezuoja albuminą ir fibrinogeną.

Panašiai gali skirtis ir organelių populiacija skirtingose audinio lastelėse. Širdies prieširdžių mitochondrijos skiriasi nuo skilvelio mitochondrijų. Tokios pačios organelės vienoje lastelėje nėra vienodos, jų savybės priklauso nuo padėties lastelėje. Pvz., lastelės vidinėje dalyje esančios mitochondrijos skiriasi nuo esančių periplazmineje zonoje (prie pat plazminės membranos).

Biologiniuose objektuose kai kurias cheminių procesų savybes lemia jų struktūros nehomogeniškumas, t.y., erdvės skyryna. Padalinimas į membraninius erdvės skyrius lemia "darbo pasidalinimą" lastelėje, dėl kurio didėja procesų efektyvumas. Erdvės skyryna lemia ir savitus reguliacijos būdus. Akivaizdu, kad lastelės padalinimas į erdvės skyrius nelaidžiomis membranomis atskiria metabolitus, riboja jų judrumą, lemia atskirų jų sandėkų, negalinčių tarpusavyje maišytis, egzistavimą. Pvz., citozolio ir mitochondrijų užpildo nukleotidai, substratai, fermentai atskirti fiziškai, o jų pasiskirstymui tarp erdvės skyrių tarpininkauja saviti baltymai-nešikliai, dažnai svarbūs reguliaciniais požiūriais – ATP/ADP nešiklis, Ca²⁺ nešikliai. Galima paminėti malato-aspartato ir gliceraldehido-3-fosfato šaudykles, kurie netiesiogiai sieja citozolio ir mitochondrijų NAD/NADH sandėkų (angl. – *mitochondrial or cytosolic pool*). Tiksliam įvertinimui, kiek kuriame iš šių kompartmentų yra įvairių metabolitų, skirta daug darbų.



4 pav. Malato-aspartato ir gliceraldehido-3-fosfato (apatinė schemos dalis) šaudyklės susieja citozolio ir mitochondrijų NAD⁺/NADH sankaupas per metabolitų nešiklius

Metabolitų heterogeniškumą lemia ne tik membraniniai barjerai. Metabolitų koncentracijos papildomai gali būti keičiamos vietiskai, jiems savitai jungiantis su fermentais. Klasikinės enzimologijos tyrimuose naudojamos mažos fermentų koncentracijos, o substratų koncentracijos paprastai žymiai viršija fermentų koncentraciją. Ląstelėje fermentai dažniausiai veikia, esant visai kitokioms sąlygoms. Ląstelės aplinkoje fermento koncentracija tos pačios eilės, kaip substrato koncentracija ($\approx K_m$), tuomet jų tarpusavio jungimasis žymus. Esant tokioms sąlygoms, laisvų metabolitų koncentracijų nustatymas standartiniais būdais neįmanomas, nes jie sujungti su fermentais. Pvz., gliceraldehido-3-fosfato surišimo vietų skaičius skeleto raumens ląstelėje 2-3 kartus viršija jo koncentraciją, todėl laisvo GA-3-P_i neaptinkama analitiniais metodais. Dar viena tyrimų *in vitro* ir *in vivo* skirtumų priežastis yra tai, kad suardant ląstelę ir išskiriant fermentus, suardomi nekovalentiniai ryšiai ir sąveikos, būdingos fermentams, kai jie veikia aplinkoje kurioje fermentų koncentracija didelė. Suardomos sąveikos tiek su kitais fermentais, tiek su kitais ląstelės struktūros elementais – membranomis, ląstelės griaučiais, organelėmis, makromolekulėmis (pvz., DNR).

3 lentelė. Fermentų ir jų substratų koncentracijos *in vivo*

Fermentas	E, μM	S, μM
Fosfogliukomutazė	5	G6P=450
Fruktozės bifosfato aldolazė	66	FBP=65, DHAP=600, G3P=3
Glicerinaldehido 3-fosfato DH	35	G3P=3, NAD^+ =600, P_n =2800
Triozijų fosfatų izomerazė	8	DHAP=28, G3P=3
Piruvato karboksilazė	10-40	Pir=50-1000, ATP=1000-6000
Citrato sintazė	35	Oksaloacetatas=0.01-0.1, AcetilKoA=50-1000
Malato DH (mitochondrijų)	70	Malatas=80-340, NAD^+ =18000
Malato DH (citozolio)	30	Malatas=300-450, NAD^+ =500

4 lentelė. Pusiausvyros konstantos skiriasi esant mažai ir didelei fermentų koncentracijai

Fermentas	K_{eq} esant mažai fermento koncentracijai	K_{eq} , esant palyginamai fermento ir substrato koncentracijai
Laktato dehidrogenazė	$0,37 \times 10^{-4}$	0,25
Alkoholio dehidrogenazė	$0,5 \times 10^{-4}$	5-10
Piruvato kinazė	3×10^{-4}	1-2
Fosfoglicerato kinazė	8×10^{-4}	0,5-1,5
Heksokinazė	2000	~1,0
Adenozino trifosfatazė	$1,3 \times 10^5$	9
Arginino kinazė	0,1	1,2
Triozijų fosfatų izomerazė	2,2	0,6

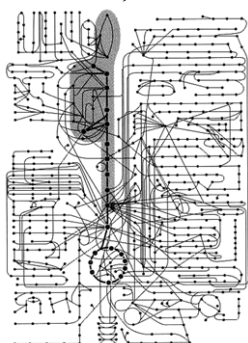
Vienas iš kompartmentacijos tyrimo korifėjų, Paul Srere 1987 m. sudarė lentelę, apibendrinančią eksperimentinius įvairių kompartmentacijos pasireiškimų (A - tuneliavimo, B - specifinės baltymų sąveikos, D - kinetinių efektų, E - polifunkcinio fermentų veikimo ar jų kompleksų, F - genetinius įrodymus, G - modelinėse sistemose gautus, F - polifunkcinio baltymų veikimo, I - fiziko-cheminius) eksperimentinius įrodymus 16-oje iš pagrindinių metabolinių kelių (8.1 lentelė). Lentelėje surinkti faktai nustatyti eksperimentiškai. Tačiau

metabolinių kelių mikrokompartmentacijos tikslingumą galima suprasti, loginio metabolinių kelių struktūros nagrinėjimo keliu.

5 lentelė. Medžiagų apykaitos kelių fermentų sąveikos įrodymai

Metabolinis kelias	Įrodymo rūšis
DNR biosintezė	A,B,C,E,F
RNR biosintezė	A,B,C,E,F
Baltymų biosintezė	A,B,C,D,F
Glikogeno biosintezė	B,E
Purinų biosintezė	A,E
Pirimidinų biosintezė	A,B,D,E,F
Aminorūgščių metabolizmas	A,B,D,H,
Lipidų biosintezė	B,C,F, H
Steroidų biosintezė	A,C,E
Glikolizė	A,B,C,D,E,I
Krebso ciklas	B,C,D,G
Riebalų rūgščių oksidacija	A,B,C,D
Elektronų pernašos grandinė	C,I
Antibiotikų biosintezė	A,E
Karbamido ciklas	B,D
c-AMP degradacija	A,D,E

Alberts pasiūlė supaprastintai vaizduoti sudėtingą metabolinių kelių žemėlapi, jo schemeje kiekvienas metabolitas vaizduojamas tašku, o cheminiai virsmai - linijomis tarp jų. Tokiu būdu gauta metabolizmo schema primena elektroninę schemą. Pasinaudojus tokia schema, paskaičiuota, kokiame skaičiuje metabolinių virsmų gali dalyvauti kiekvienas metabolitas:



Metabolitų skaičius	Jungiančių linijų skaičius
410	1 ar 2 linijos (naudojami 1 kelyje)
71	3
20	4
11	5
8	6 ir daugiau

Didelė dalis (apie 80%) metabolitų panaudojami tik viename kelyje (jungiami su kitais metabolitais 1-2 linijomis) t.y., nėra būtinybės jiems “pasirodyti” bendrame ląstelės tūryje (bulk phase), kad ten pasiektų efektyvią koncentraciją.

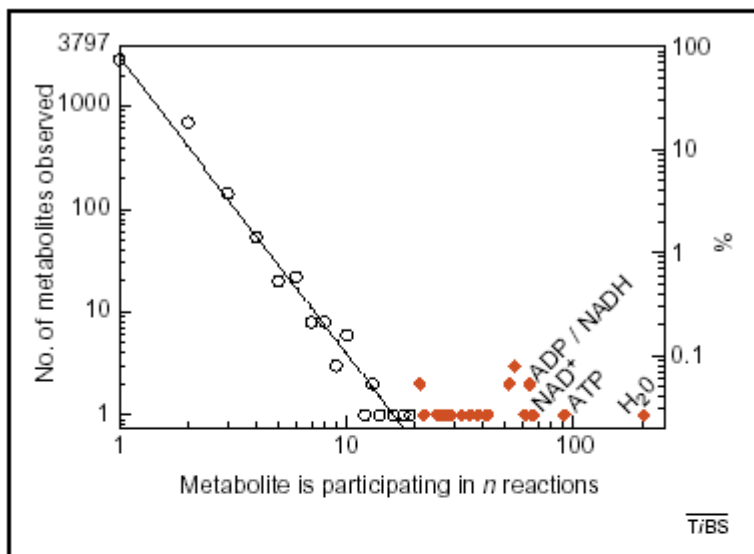


Fig. 5. Metabolite usage in enzymatic reaction. The occurrence of metabolites in enzymatic reactions (circles) follows a power-law distribution: both axes have logarithmic scale. On the x-axis the number (n) of enzymatic reactions each metabolite is involved in is shown. On the y-axis, we plot the number of metabolites or the percentage from the total number of metabolites (right) that are found to participate in a given number of enzymatic reactions. The straight (diagonal) line in this double logarithmic plot approximates the distribution. These data correspond to those recently published by Alves *et al.* [1]. This is called a power-law distribution; it has been shown for many natural and technical systems with growth by agglomeration, such as relations by mutual friends or the internet [52] and organism-wide organization of the metabolic network [44,46], protein folds [42] and protein interactions [53]. However, note that some metabolites do occur more often than expected by power-law (red diamonds). These metabolites, such as water and 13 other hydrophilic and mostly charged compounds, are accessible by many different superfamilies ('hub' metabolites). The ten right-most diamonds correspond to H₂O (203/92), ATP (90/32), NAD⁺ (65/18), ADP (63/19), NADH (63/16), O₂ (60/30), CO₂ (54/35), NADP⁺ (54/22), NADPH (54/22) and phosphate (P_i; 51/35); the first number in parentheses indicates the number of reactions the metabolite participates in and the second indicates the number of enzyme superfamilies using the metabolite. Only reactions with an assigned SCOP superfamily were taken into account. The metabolites were extracted from the LIGAND [54] database.

5 pav. Metabolitų „dalyvavimo“ medžiagų apykaitos keliuose dažnis

Tuneliavimas

Vienas iš labiausiai apribotų ląstelės struktūros veiksnių yra ląstelės „tirpiklio“ kiekis. Juk daugybė metaboliniuose keliuose vaizduojamų metabolitų turi būti ištirpę tame pačiame tirpiklyje, vandenyje, kurio kiekis yra ribotas. Vienas iš būdų išvengti šio apribojimo buvo nuoseklių fermentinių kompleksų evoliucija. **Tuneliavimas** yra medžiagų tiesioginis perdavimas fermento-fermento kanalu iš vieno aktyvaus centro į kitą. Jie neišeina į supančią erdvę ir nepasiskirsto pusiausvyroje su analogiškom molekulėm bendrame erdvės skyriaus tūryje. Anglišku terminų gausa (*channeling*, *coupling*, *processivity*, *direct transfer*, *vectorial transfer*) tam pačiam reiškiniui aprašyti būdinga pradiniam tyrimo etapui, kuomet dar nesusiformavusi vieninga terminologija.

Tuneliavimas gali vykti keliais būdais:

- 1) kovalentiškai jungiant tarpinius metabolitus aktyviuose fermentų centruose;
- 2) nejungiant jų kovalentiškai.

Atitinkamai, tuneliavimas gali būti įvairiaus laipsnio -

a) kietas (angl. k. - *tight*) arba pilnas, kuomet tarpiniai metabolitai visai nepasirodo tunelio išorėje, būdingas mechanizmui (1) ir

b) laidus (angl. k. - *leaky*) arba nepilnas, kai metabolitai tam tikru laipsniu išeina iš tunelio, būdingas mech. (2).

Kietas tuneliavimas naudingas, kai tarpiniai tam tikros fermentų sekos produktai nėra reikalingi (naudojami) kitose sekose. Pvz., tarpiniai baltymo sintezės produktai yra nebaigti beprasmiai baltymai. Jie jungiami kovalentiškai, nes svarbu, kad į ląstelę patektų tik galutinis produktas. Tačiau glikolizės tarpiniai produktai G6P ir DHAP reikalingi ir kituose keliuose, todėl labiau pagrįstas laidus tuneliavimas. Riebalų rūgščių β -oksidacijos tarpiniai produktai ilgos grandinės acil-KoA stipriai slopina daugelį mitochondrijų fermentų. Juos svarbu tuneliuoti kietai, kad nepasireikštų žalingas poveikis.

Fermentų sąveika

Viename ląstelės erdvės skyriuje esantys nuoseklios fermentų sekos nariai tarpusavyje sudaro kompleksus ar bent išsidėsto erdvėje neatsitiktine tvarka. Kai kuriose sekose nustatyti stabilūs multifermentiniai kompleksai: du labai panašūs α -ketorūgščių oksidacijos kompleksai (piruvato dehidrogenazė ir 2-oksiglutarato dehidrogenazė), riebalų rūgščių sintezės kompleksas (8 iš 20 RR sintetazės subvienetų sudaro didelį kompleksą), poliribosomos. Baltymų ar fermentų kompleksai angliškai vadinami įvairiai - *protein machines, clusters, supramolecular complexes, aggregates, metabolons*. Multifunkciniai baltymai yra ribinis fermentų aktyvumo suliejimo atvejis, kuomet vienoje polipeptidinėje grandinėje yra keli domenai, pasižymintis skirtingų fermentų aktyvumu. Toks pavyzdys yra *Neurospora Crassa* kompleksas AROM (shikimo rūgšties kelias), kurio vienoje polipeptidinėje grandinėje yra penki fermentiniai aktyvumai. Kituose mikroorganizmuose, pvz., *E.coli* Lys, Met, Thr ir Ile sintezės iš L-Asp kelias reakcijas atlieka vienas polipeptidas - tetrameras α_4 , kurio kiekvieno subvieneto N-gale yra domenas su asparto kinazės aktyvumu, o C-gale - homoserino dehidrogenazės domenas. Aukštesniųjų organizmų ląstelėse tris pirmąsias pirimidinų biosintezės stadijas katalizuoja fermentų kompleksas karbamoilfosfato sintazė, aspartatkarbamoilo transferazė ir dihidroorotazė, kurie greičiausiai yra vienoje polipeptidinėje grandinėje.

Be tokių lengvai nustatomų tvirtų sąveikų, galima savita sąveika tarp fermentų, kurie tradiciškai laikomi tirpiaisi. Pvz., žiuželinių pirmuonių *Tripanosoma brucei*, *tripanosoma cruzi* ir *Critidia fasciculata* citoplazmoje glikolizės fermentai sukaupti specifinėje peroksisomoje, vadinamoje **glikosoma**. Šie kraujuje parazitaujantys organizmai visą energiją gauna glikolizės būdu, ir glikosoma užtikrina pakankamai didelį jos greitį. Fermentų tarpusavio sąveika glikosomoje tokia stipri, kad kompleksas išlieka, net pašalinus membraną.

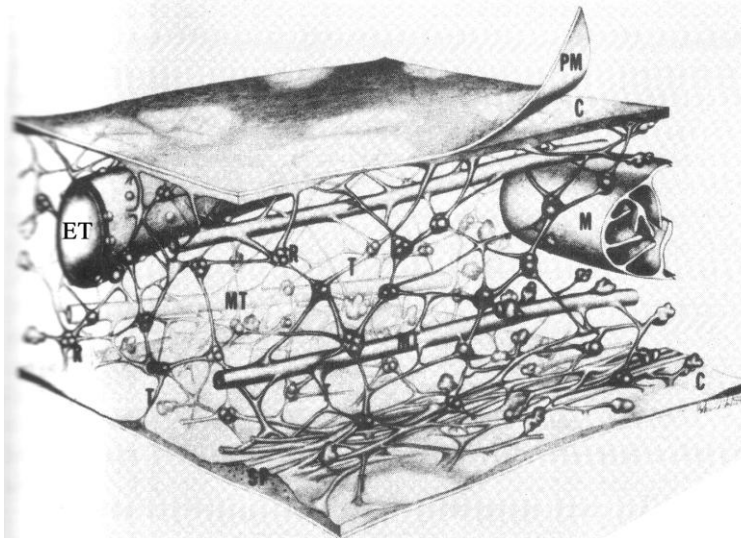
Kitais atvejais tirpūs fermentai nėra jungiami membraninių struktūrų, tačiau tarp jų egzistuoja įvairaus stiprumo dinaminė sąveika. Pavyzdžiai:

- 1) Į glikogeno granulių sudėtį, be paties glikogeno, įeina apie 50% baltymų – tai visas glikogenolizės fermentų rinkinys, tame tarpe ir glikolizės fermentai (glikogeno fosforilazė, fosforilazės kinazė, fosfobaltymų fosfatazė, glikogeno sintazė, baltymų kinazė, adozinotrifosfatazė, AMP deaminazė, adenilato kinazė, kreatino kinazė, fosfogliukomutazė, etc.).
- 2) Heksokinazė savitai jungiasi su mitochondrijų išorinės membranos porinu (pvz., inkstų ląstelėse apie 80% heksokinazės yra susijusios su mitochondrijomis). Sujungtai formai būdinga žemesnė K_m ATP, mažesnis jautrumas slopinimui ATP ir Glu-6-P_i.
- 3) Įrodyta specifinė sąveika tarp Krebso ciklo fermentų, taip pat jų sąveika su mitochondrijų vidine membrana. Yra nemažai įrodymų, kad tirpūs Krebso ciklo fermentai sąveikauja tarpusavyje, tačiau jo narius sieja silpni ir dinamiški ryšiai, todėl fiziškai išskirti pasiseka tik kai kurių narių asociatus (po 2-3).

Apibendrinant, galima abejoti, ar aplamai ląstelėje įmanoma laisva fermento būseną.

Elektroninė mikroskopija rodo, kad mitochondrijų užildas yra organizuotas retikulinis tinklas, persitvarkantis priklausomai nuo mitochondrijų metabolinės būsenos. Žemos energijos būsenoje (trečia metabolinė mitochondrijų būseną) užpildui būdinga kondensuota tanki konsistencija, mažas tūris (ATP/ADP nešiklio orientacija į vidinę membranos pusę); ketvirtoje metabolinėje būsenoje, kuomet nevyksta fosforilinimas ir membranos potencialas aukštas (energizuotos mitochondrijos), būseną vadinama ortodoksine. Joje esančių mitochondrijų užpildas užima didesnę tūrį ir tarpmembraninę erdvę sumažėja. Pereinant iš ortodoksinės į kondensuotą būseną, pusė užpildo vandens pasišalina per membraną, toks tūrio sumažėjimas gali padidinti metabolitų koncentracijas dviem eilėms, o taip pat padidina ir fermentų sąveikos tikimybę. Užpildo baltymų koncentracija - 56% (svorio). Ne visų baltymų tirpumas toks aukštas. Jeigu baltymų molekules laikyti identiškoms sferoms ir jas išdėstyti erdvėje maksimaliu tankiu, baltymų koncentracija kubinėje gardelėje siektų 60%. Didžioji dalis užpildo vandens yra surištos formos, o pats užpildas yra baltymų kristalas, kuriame tarpai tarp molekulių yra kanalai metabolitams, o vietinės metabolitų koncentracijos labai didelės.

Argumentai prieš tuneliavimą grindžiami pakankamai aukštais cheminių medžiagų ir baltymų difuzijos greičiais, lyginant juos su cheminių reakcijų greičiais. Tačiau difuzijos greičiai paprastai nustatomi praskiestuose tirpaluose. Tačiau ląstelėje, kur baltymų koncentracija labai didelė (20-30%) difuzijos greičiai sumažėja apie 5 kartus medžiagoms, kurių $M_m \approx 700$ ir apie 100 kartų medžiagoms, kurių $M_m \approx 10\,000$, o didesniems baltymams - sumažėja 1000 kartų. Apie 98% difunduojančių medžiagų citozolyje turėtų būti jungiamos. Citozolyje susidaro ATP, O_2 gradientai, o H_2O , K^+ , Na^+ , aminorūgštys, cukrai pasiskirstę netolygiai. Citozolį sudaro daug skirtingų zonų. Organelės (pvz., mitochondrijos) jose pasiskirsčiusios neatsitiktinai, o funkcškai tinkamose zonose (8.4 pav.). Daugelis fermentų jungiasi su struktūriniais ląstelės elementais: glikolizės fermentai su ląstelės griaučiais, dalis heksokinazės su mitochondrijomis.



6 pav. Organelių įtvirtinimas citoužpilde. PM – plazminė membrana, C – ląstelės žievė, ET – endoplazminis tinklas, M – mitochondrija, R – ribosoma, MT – mikrovamzdelis.

Sąveika su polimerinėmis molekulėmis gali keisti fermentų kinetines savybes - pvz., susijungimas su DNR aktyvina nukleorūgščių metabolizmo fermentus. Kai kurie fermentai yra dinaminėje pusiausvyroje tarp surištos ir laisvos būsenų, toks reiškinys vadinamas jų būsenos

dviprasmiškumu (angl. k. - *ambiguity*). Pusiausvyra tarp tokių formų reguliuojama. Savo ruožtu, tokia dinaminė asociacija arba dinaminis tuneliavimas svarbus reguliaciniu požiūriu. Pvz., heksokinazės susijungimas su mitochondrijų membrana keičia jos kinetines savybes (didina K_m), o padidėjus gliukozės koncentracijai citozolyje heksokinazės sąveika su mitochondrijomis suyra.

Tuneliavimo privalumai

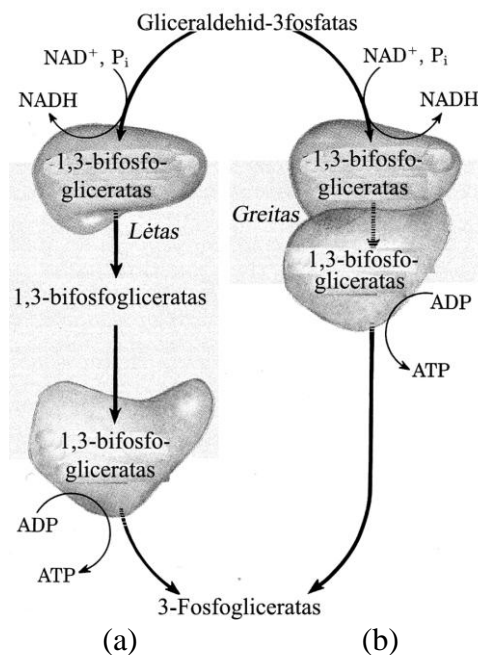
Vidulastelinės difuzijos greičiai nėra pakankami gyvybinių procesų užtikrinimui, todėl tuneliavimas yra labai svarbus. Kokie yra multifermentinių kompleksų egzistavimo, arba tuneliavimo teikiami privalumai?

1) Suartinimo efektas. Tuneliavimo dėka bendras sistemos veikimo greitis žymiai padidėja, nes:

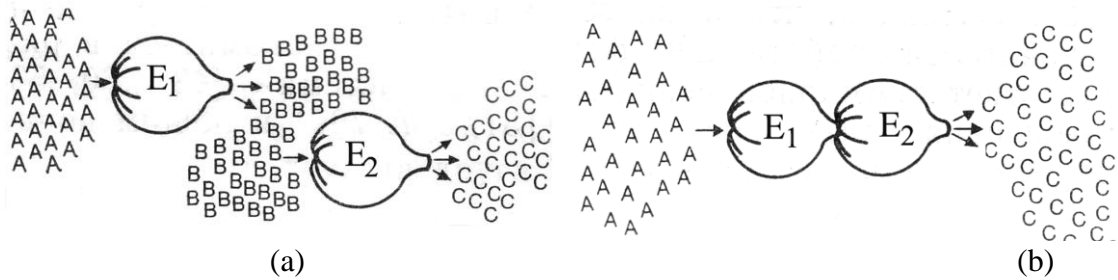
a) substratai tiesiogiai perduodami nuo vieno fermento aktyvaus centro į kitą. Tai pagreitina procesą tiek kovalentinio surišimo atveju (kaip acilgrupių PDH), tiek difunduojant metabolitui, kaip pvz., glikolizėje 1,3-bifosfoglicerato atveju (8.5 pav.).

b) substrato koncentracija antrojo aktyvaus centro aplinkoje yra žymiai didesnė, nei tuo atveju, jei jie pasiskirstytų po visą citozolio tūrį (*bulk phase*), taigi, aukšta substrato koncentracija pasiekama nedidelio kiekio substrato molekulių sąskaita (8.6 pav.).

c) tarpinių metabolitų difuzijos laikas sumažėja, perėjimo laikas (transient time, τ) iki naujos stacionarios būsenos sumažėja (7 pav.).



7 pav. Substrato 1,3-bifosfoglicerato perdavimo tarp nuosekliai veikiančių glikolizės fermentų gliceraldehid-3-fosfato dehidrogenazės ir fosfoglicerato kinazės variantai: (a) lėta difuzija tarp atskirai veikiančių fermentų ir (b) greitas perdavimas funkciniame fermentų komplekse, neatpalaiduojant tarpinio metabolito ir fermentinio kanalo. Šie fermentai sudaro tvirtą nekovalentinį kompleksą.



8 pav. Tarpiniam metabolitui išeinant į aplinką, jis tolygiai pasiskirsto, joje ištirpdamas (a) todėl aplinkoje susidaro mažesnė substrato sekančiam fermentui koncentracija, nei tuo atveju (b), kai metabolites aplinkoje nepasirodo ir visas jo kiekis yra “tarpfermentiniame tunelyje”.

Kai praskiestame tirpale matuojamas sistemos iš kelių atskirai veikiančių fermentų bendras greitis (9 pav.), paprastai būtinas tam tikras laikas stacionariai būsenai pasiekti (perėjimo arba priešstacionarinis laikas, τ). Šis laikas mažėja ir net visai išnyksta, jeigu, didinant fermentų koncentracija tirpale, fermentai sudaro kompleksus. Tada tarpiniai metabolitai perduodami tiesiogiai iš vieno aktyvaus centro į kitą. Pagal 9 pav. atkertamos ordinačių ašyje atkarpos dydį galima įvertinti, kokia minimali tarpinio metabolito koncentracija $[X]_s$ būtina stacionariai būsenai pasiekti.

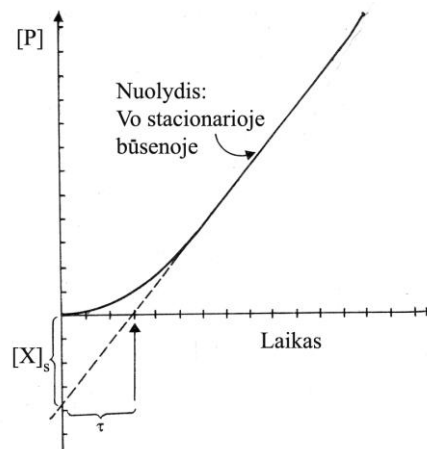
d) taupomas ląstelės tirpiklis (H_2O);

e) tarpiniai metabolitai apsaugomi nuo terpės poveikio ar joje esančių degraduojančių fermentų (fosfatazių, hidrolazių) poveikio;

f) ląstelė apsaugoma nuo žalingo kai kurių metabolitų poveikio (aldehidų, ilgos grandinės acil-KoA).

Dėl heksokinazės sąveikos su mitochondrijomis sintezuotas ATP greičiau “patenka” heksokinazei, nei pridėtas iš išorės, o ADP greičiau “grąžinamas” mitochondrijoms. Mažėja galimybė, kad oksidacinis fosforilinimas bus inhibuotas ATP. ATP panaudojamas “nesusimaišęs” su citozoline ATP sandaupa.

2. Papildomos reguliacinės galimybės, kurias suteikia sąveika tarp nuoseklios fermentų sekos narių. Tai gali būti alosterinio pobūdžio reguliacija, kai efektorius susirišimas su vienu iš sekos fermentų veikia kitus fermentus (koordinuota reguliacija). Fermentų sąveikos metu gali būti palankiai keičiama kitų fermentų konformacija ir kinetinės savybės. Įdomus fermentų tarpusavio sąveikos pavyzdys yra laisvai triptofano sintazei būdingas triptofano hidrolazinis aktyvumas, kuris inhibuojamas, jai susirišus su kitais fermentais.



9 pav. Būdinga sistemoms iš kelių atskirai veikiančių fermentų susidarančio bendro produkto kiekio priklausomybė nuo laiko (paaiškinimai tekste).

3. Jei fermentų kompleksai susiriša su kitomis ląstelės struktūromis ar makromolekulėmis, difuzija apsiriboja 1 ar 2 matavimais vietoje 3-matės.

Kadangi baltymų koncentracija ląstelėje ir jos erdvės skyriuose tokia didelė, sąveikaudami tarpusavyje, jie suteikia ląstelei supramolekulinės struktūros bruožų, matomų elektroniniu mikroskopu. Pvz., veikianti ribosoma ET, I diskas skersaruožių raumenų miofibrilėse (tai glikolitinių fermentų sandėlis); citozolyje išvystyta baltymų tinklinė struktūra, citoskeletas riša "tirpius fermentus", mitochondrijos išsidėsto greta ATP panaudojimo vietų. Šiuos ląstelės struktūros bruožus lemia baltymų sąveika. Galima sakyti, kad fermentų ir kitų baltymų tarpusavio sąveika lemia aukštesnę ląstelės struktūrinės organizacijos lygį.