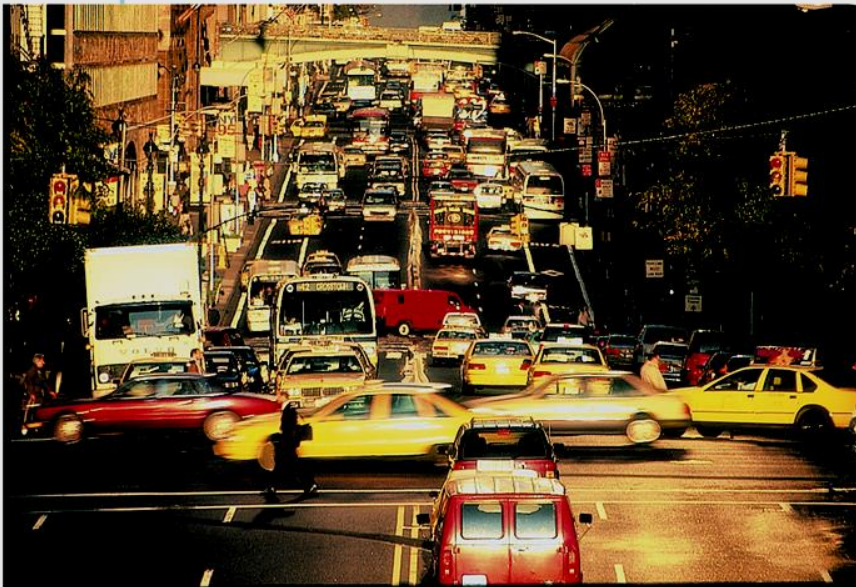
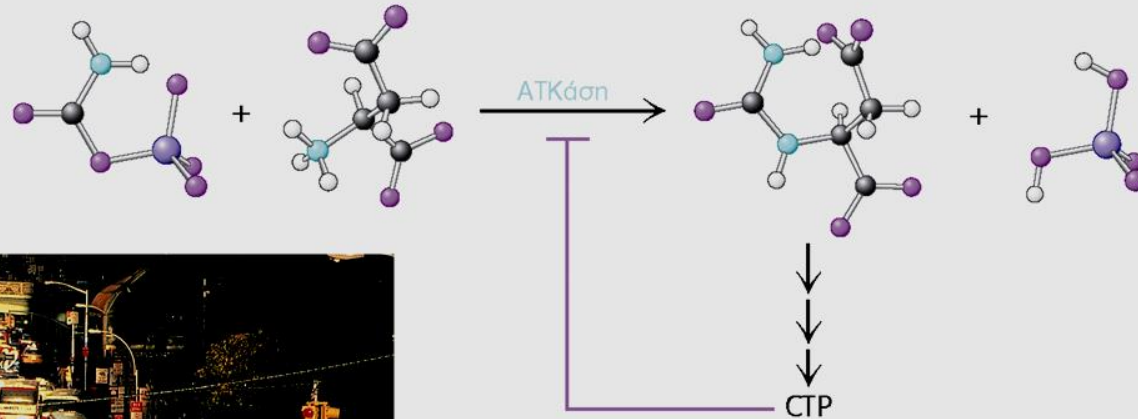


# Στρατηγικές ρύθμισης: ένζυμα και αιμοσφαιρίνη



Οι μεταβολικές πορείες, όπως η κυκλοφοριακή κίνηση, ρέουν πιο αποτελεσματικά όταν ρυθμίζονται από σήματα. Η CTP, το τελικό προϊόν μιας πορείας πολλών βημάτων, ελέγχει τη ροή μέσω της πορείας αναστέλλοντας το καθοριστικό βήμα που καταλύεται από την ασπαραγινική τρανσκαρβαμοϋλάση (ΑΤΚάση). [(Αριστερά) Richard Berenholtz/The Stock Market.]

## Ρύθμιση δράσης ένζυμων

Τί θα συνέβαινε στην περίπτωση που το ένζυμο ερχόταν σε επαφή με το υπόστρωμα χωρίς έλεγχο;

παράδειγμα

Ολική αντίδραση  $S \leftrightarrow P$

(ενζυμικά ενδιάμεσα  $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$ )

Το ένζυμο μόνο επιταχύνει την αντίδραση αρά με ένα  $K$  (σταθερά αντίδρασης) = 10

Το  $S$  θα καταναλώνονταν πολύ γρήγορα (ένζυμο) μέχρι

$$[P]/[S]=K=10$$

άρα  $P = 10$  εάν  $S=1$  αντίδρασης.

Οι ανάγκες το οργανισμού για  $[P]$  μπορεί να είναι 100 ή κάποια άλλη στιγμή 2 πώς αυτό επιτυγχάνεται;

**Πρέπει να σταματήσει η αντίδραση!**

**Πρακτικά αυτό συμβαίνει εάν δεν λειτουργήσει το ένζυμο**

**Άρα ελέγχοντας την δραστικότητα του ενζύμου οι οργανισμοί μπορούν να ελέγχουν την συγκέντρωση των ουσιών**

(όταν οι χημικές αντιδράσεις δεν γίνονται από μόνες τους γρήγορα)

# Έλεγχος δραστηριότητας ενζύμων

(διαφορετικοί τρόποι ρύθμισης ανάλογα με την ανάγκη)

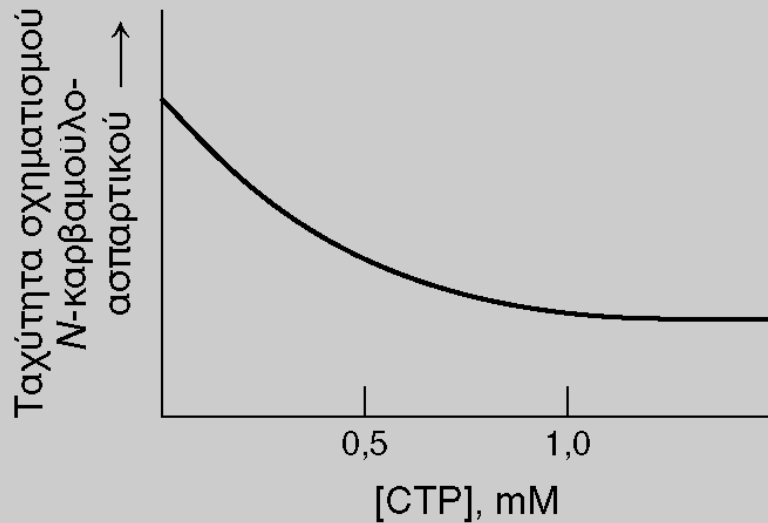
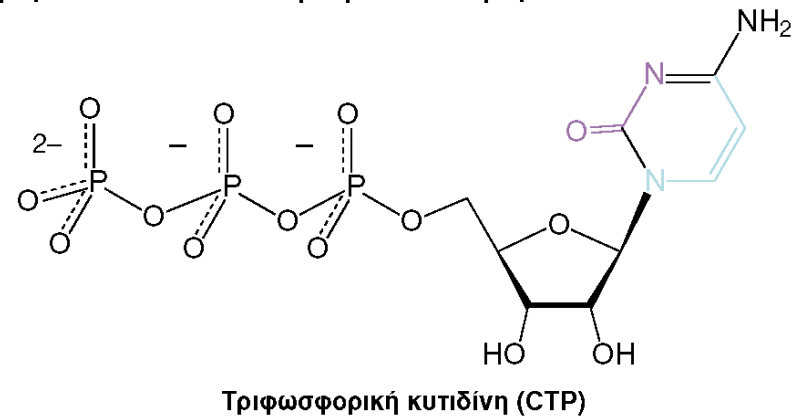
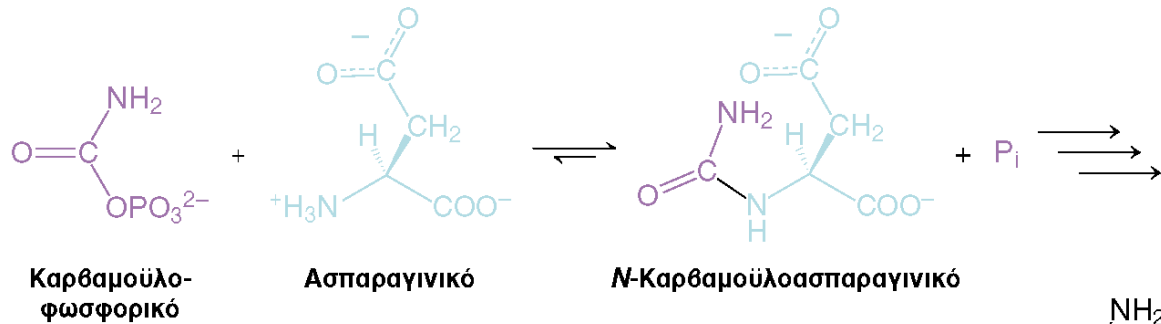
**Αλλοστερικός έλεγχος** - ένωση με μικρά σηματοδοτικά μόρια  
Αλλαγές στην **στερεοδιάταξης** (τεταρτοταγής δομή): η δραστηριότητα σε μια θέση επηρεάζει την δραστηριότητα σε μια άλλη θέση

**Ισοένζυμα** - πολλαπλές μορφές ενζύμων- ένωση με μικρά σηματοδοτικά μόρια  
Καταλύουν την ίδια αντίδραση διαφέρουν ελαφρώς στην **στερεοδιάταξη** στην  $k_{cat}$  και  $K_m$  όπως και ιδιότητες ρύθμισης. Βρίσκονται σε ξεχωριστό ιστό ή όργανο ή στάδιο ανάπτυξης

**Αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση** – πρόσδεση τροποποιητικής ομάδας  
Αλλαγές στην **στερεοδιάταξης** που ενεργοποιεί ή αδρανοποιεί το ένζυμο

**Πρωτεολυτική ενεργοποίηση** – αλλαγή πρωτοταγούς δομής → αλλαγή στην **στερεοδιάταξη** → ενεργοποίηση ενζύμου

## Παράδειγμα ασπαραγινικής τρασκαρβαμοϋλάσης



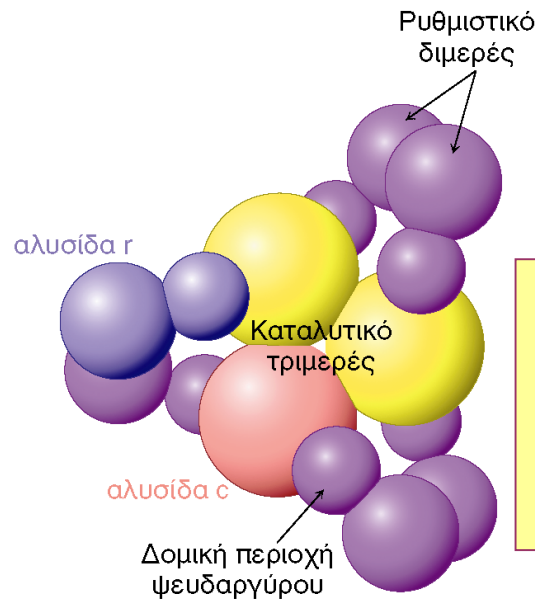
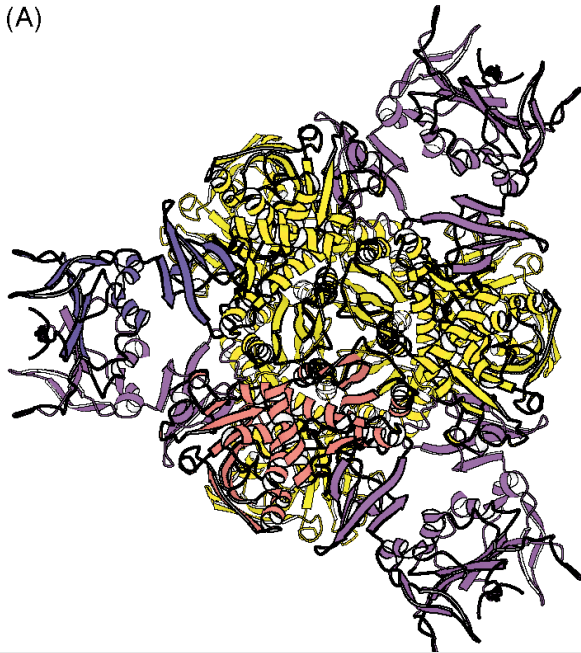
**ΕΙΚΟΝΑ 10.2 Η CTP αναστέλλει την ΑΤΚάση.** Η τριφωσφορική κυτιδίνη, ένα τελικό προϊόν της πορείας σύνθεσης των πυριμιδινών, αναστέλλει την ασπαραγινική τρασκαρβαμοϋλάση παρά το γεγονός ότι έχει μικρή δομική ομοιότητα με τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα.

Το τελικό προϊόν της μεταβολικής πορείας, (3-4 βήματα μετά την αρχική καταλυμένη Αντίδραση) αναστέλλει την αρχική αντίδραση  
 Προϊόν βήμα 5 αναστέλλει βήμα 1

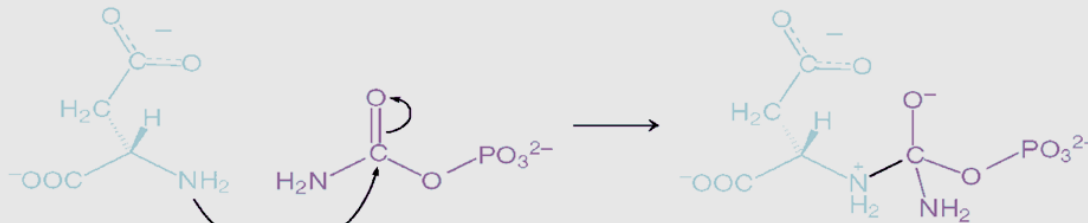
Όχι μόνο ελέγχεται η δραστικότητα του ενζύμου αλλά ανάλογα το μόριο αναστολέα ελέγχονται 2, 3...5 συνεχόμενες αντιδράσεις

# Το ένζυμο αποτελείται από υπομονάδες **καταλυτικές** και **ρυθμιστικές**

(A)

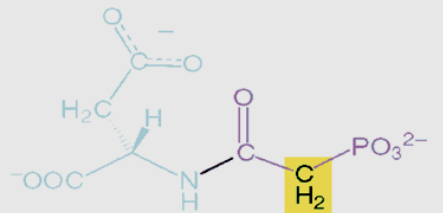


Χρησιμοποιώντας σαν εργαλείο το PALA (συναγωνιστικός αναστολέας, μιμείται το υπόστρωμα και δεν μεταβολίζεται) μπορούμε να μελετήσουμε την λειτουργία του ενζύμου



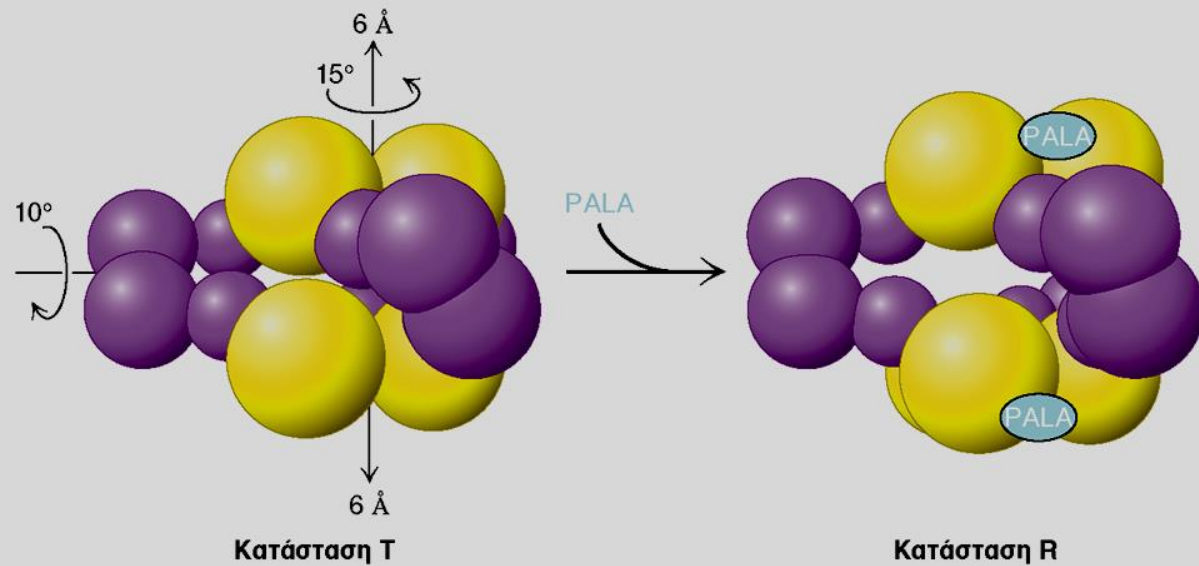
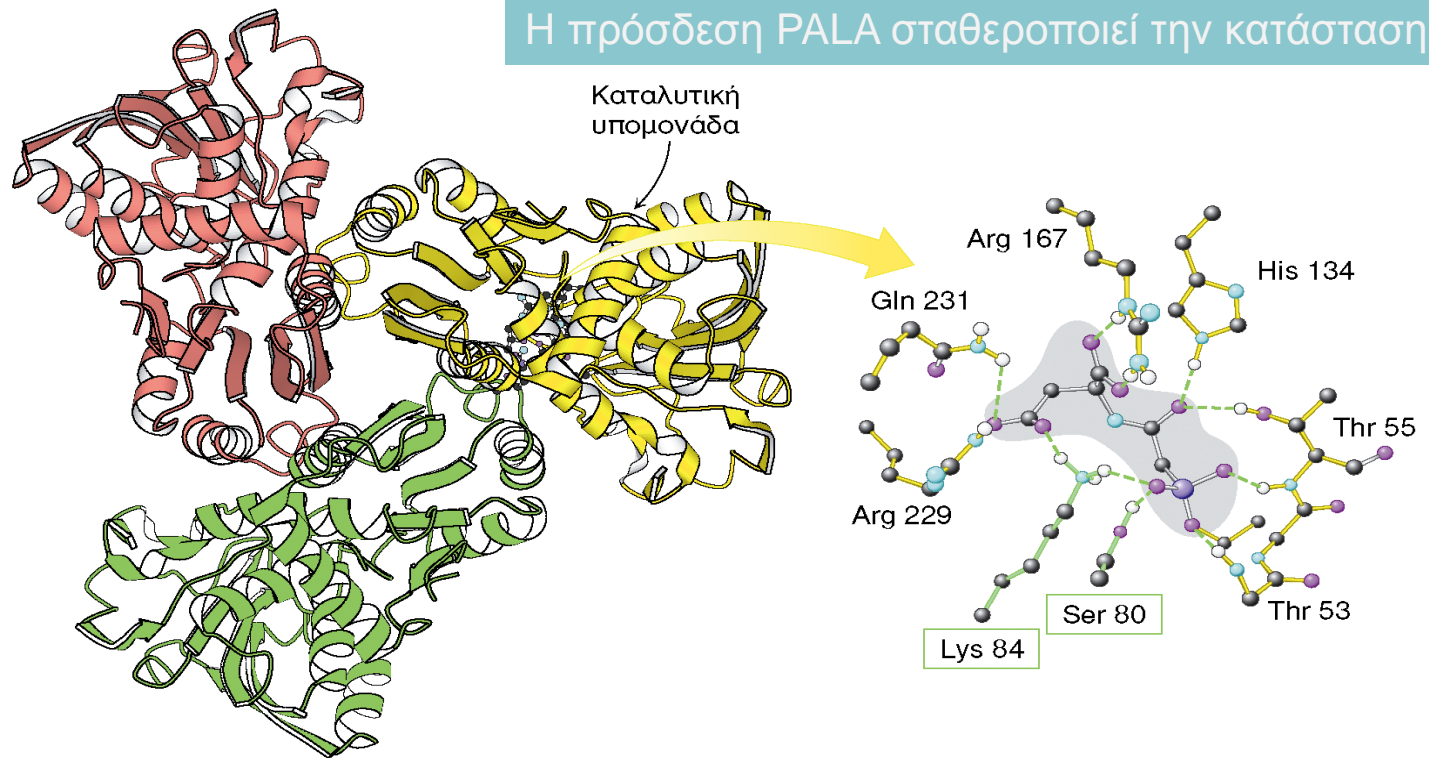
Προσδεμένα υποστρώματα

Ενδιάμεσο αντίδρασης



**N-(Φωσφονο-ακετυλο)-L-ασπαραγινικό (PALA)**

**ΕΙΚΟΝΑ 10.6 PALA, ένα ανάλογο δύο υποστρωμάτων.** (Επάνω) Η πυρηνοφιλική επίθεση από την αμινική ομάδα του ασπαραγινικού στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του καρβαμοϋλοσφωρικού παράγει ένα ενδιάμεσο στην πορεία σχηματισμού του *N*-καρβαμοϋλοσφωραγινικού. (Κάτω) Το *N*-(φωσφονο-ακετυλο)-L-ασπαραγινικό (PALA) είναι ένα ανάλογο του ενδιάμεσου της αντίδρασης και ένας ισχυρός συναγωνιστικός αναστολέας της ασπαραγινικής τρανσκαρβαμοϋλάσης.

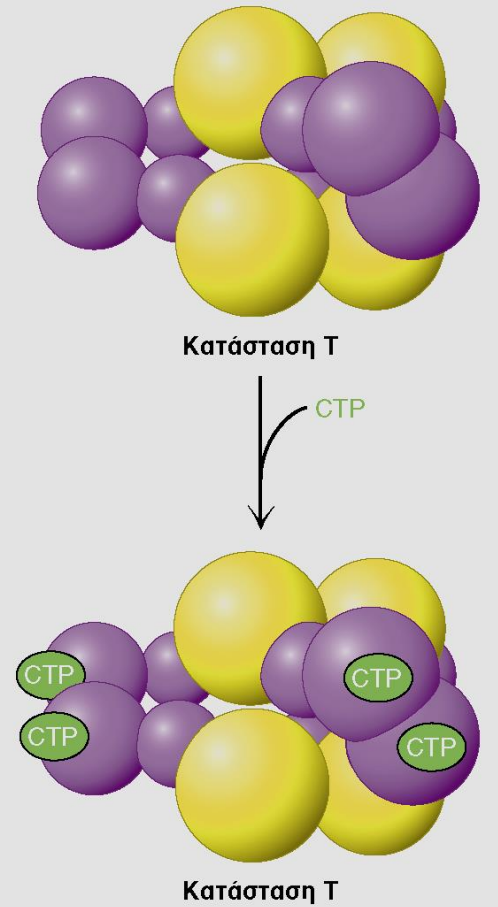


**ΕΙΚΟΝΑ 10.8** Η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R στην ΑΤΚάση. Η ασπαραγινική τρανσκαρβαμouίλαση υπάρχει σε δύο στερεοδιατάξεις: μια συμπαγή και σχετικά ανενεργό μορφή η οποία ονομάζεται τεταμένη κατάσταση (T) και μια εκτεταμένη μορφή που ονομάζεται χαλαρωμένη κατάσταση (R). Η πρόσδεση του PALA σταθεροποιεί την κατάσταση R.

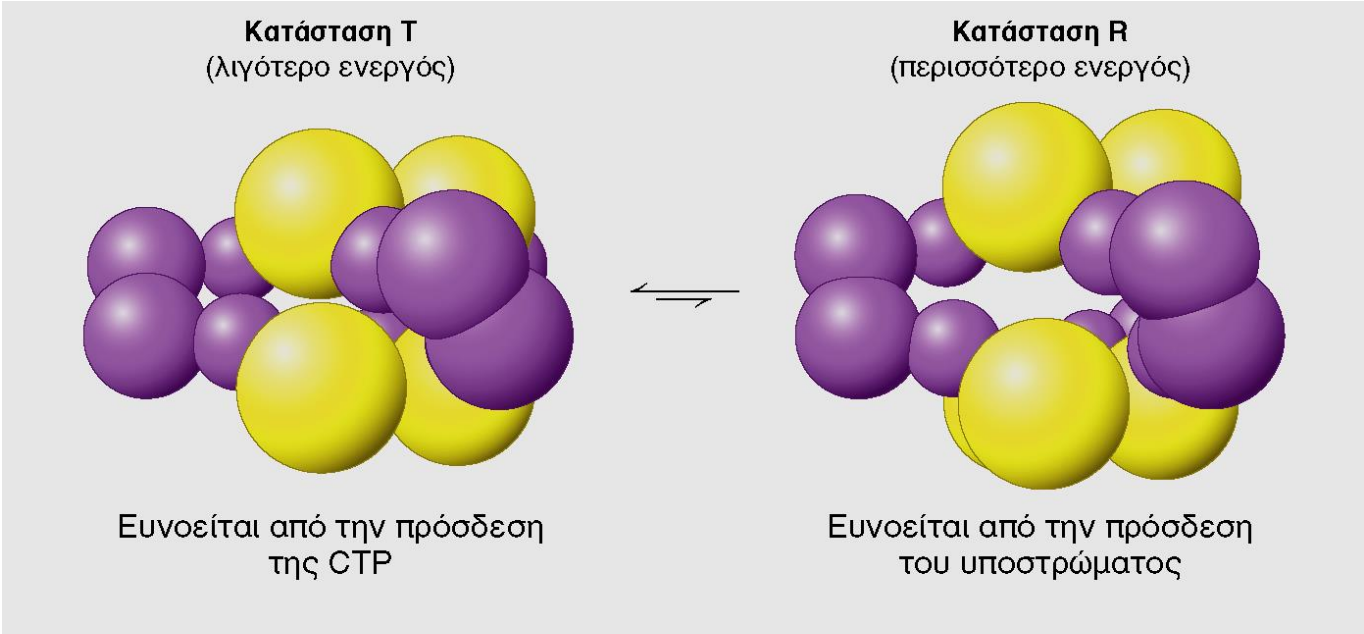
Αντίστοιχα και η μορφή T ελέγχεται με πρόσδεση του CTP (προϊόν 5 βήματα αργότερα) μακριά από το ενεργό κέντρο

Τελικά έχουμε δυο μορφές του ενζύμου σε ισορροπία ανάλογα με τις συνθήκες (απαιτήσεις του κυττάρου του οργανισμού)

Το CTP ενώνεται 50Å μακριά από το ενεργό κέντρο και είναι αναστολέας



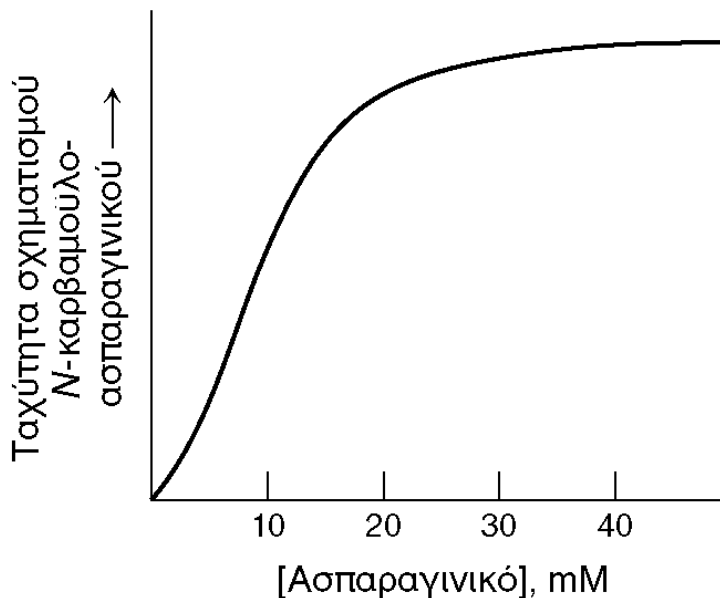
**ΕΙΚΟΝΑ 10.9** Η CTP σταθεροποιεί την κατάσταση T. Η πρόσδεση της CTP στη ρυθμιστική υπομονάδα της ασπαραγινικής τρανσκαρβαμυλάσης σταθεροποιεί την κατάσταση T.



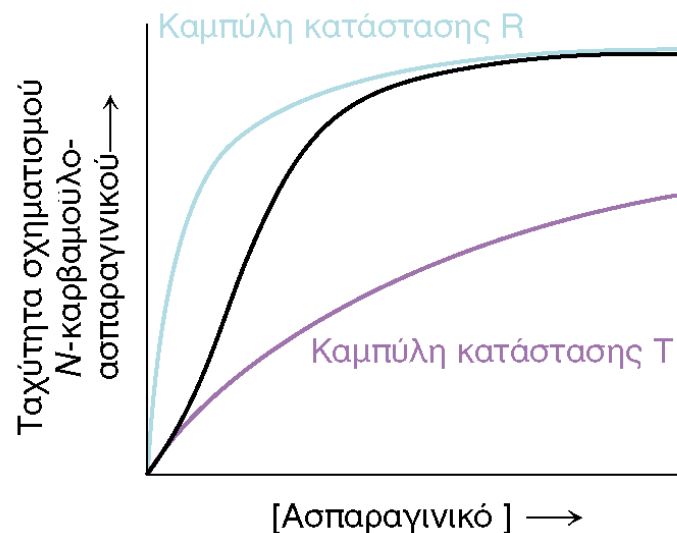
**ΕΙΚΟΝΑ 10.10** Οι καταστάσεις R και T βρίσκονται σε ισορροπία. Ακόμη και απουσία οποιουδήποτε υποστρώματος ή ρυθμιστών, η ασπαραγινική τρανσκαρβαμυλάση υπάρχει σε μια ισορροπία μεταξύ των καταστάσεων R και T. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η κατάσταση T ευνοείται από έναν παράγοντα περίπου των 200.

Ονομάζεται *εναρμονισμένος μηχανισμός αλλοστερικής ρύθμισης* (αλλαγές στο ενζυμο όλες ή καμία)

## Τα ένζυμα που ελέγχονται αλλοστερικά δεν ακολουθούν Michaelis-Menten καμπύλη

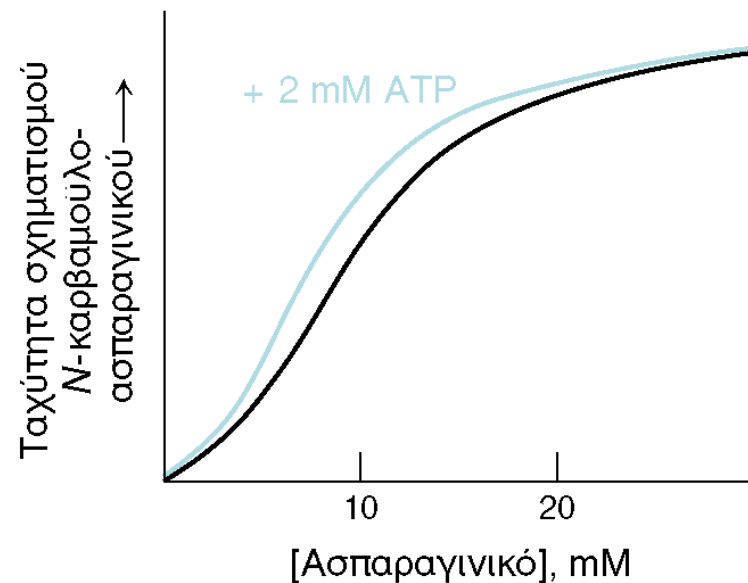
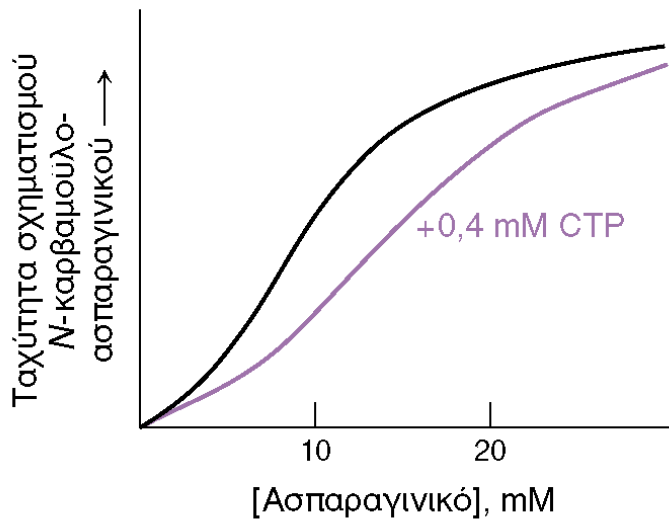


**ΕΙΚΟΝΑ 10.11 Η ΑΤΚάση εμφανίζει σιγμοειδή κινητική.** Ένα διάγραμμα του σχηματισμού προϊόντος έναντι της συγκέντρωσης του υποστρώματος παράγει μια σιγμοειδή καμπύλη διότι η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο ευνοεί τη μετατροπή ολόκληρου του ενζύμου στην κατάσταση R, αυξάνοντας τη δραστηριότητα στα άλλα ενεργά κέντρα. Έτσι, τα ενεργά κέντρα δείχνουν συνεργειαικότητα.



**ΕΙΚΟΝΑ 10.12 Η Βάση για τη σιγμοειδή καμπύλη.** Η παραγωγή της σιγμοειδούς καμπύλης από την ιδιότητα της συνεργειαικότητας μπορεί να γίνει κατανοητή αν φανταστούμε ένα αλλοστερικό ένζυμο ως ένα μείγμα δύο ενζύμων που ακολουθούν την κινητική Michaelis-Menten, ένα με υψηλή τιμή  $K_M$  η οποία αντιστοιχεί στην κατάσταση T και ένα άλλο με χαμηλή τιμή  $K_M$  η οποία αντιστοιχεί στην κατάσταση R. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος, η ισορροπία μετακινείται από την κατάσταση T στην R, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της δραστηριότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.





**ΕΙΚΟΝΑ 10.13 Επίδραση της CTP στην κινητική της ΑΤΚάσης.** Η τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP) σταθεροποιεί την κατάσταση T της ασπαραγινικής τρανσκαρβαμοϋλάσης, δυσκολεύοντας την πρόσδεση του υποστρώματος έτσι ώστε να μετατραπεί το ένζυμο στην κατάσταση R. Ως αποτέλεσμα, η καμπύλη μετακινείται προς τα δεξιά, όπως δείχνεται με κόκκινο.

**ΕΙΚΟΝΑ 10.14 Επίδραση της ATP στην κινητική της ΑΤΚάσης.** Η ATP είναι ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της ασπαραγινικής τρανσκαρβαμοϋλάσης διότι σταθεροποιεί την κατάσταση R, διευκολύνοντας την πρόσδεση του υποστρώματος, όπως δείχνεται με μπλε.

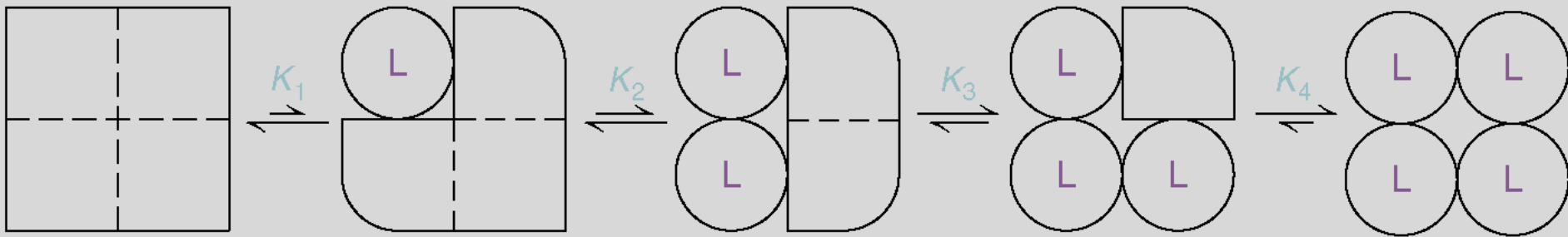
Εισάγοντας και ένα δεύτερο μόριο **ρυθμιστή (ενεργοποιητή)** ελέγχουμε τα επίπεδα ενεργού-ανενεργού ενζύμου

**Τελικό αποτέλεσμα:** Το πόσο θα προχωρήσει η αντίδραση εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις δυο ουσιών στο διάλυμα.

Το ποιές θα ουσίες αυτές εξαρτάται από τις ανάγκες του οργανισμού (προϊόντα, αντιδρώντα αντίδρασης άλλη σημαντική ένωση)

Το εναρμονισμένο μοντέλο έχει T και R καταστάσεις, αλλά υπάρχει και το μοντέλο **ακολουθίας** που μπορεί να εξήγησει φυσιολογικές βιοχημικές καταστάσεις

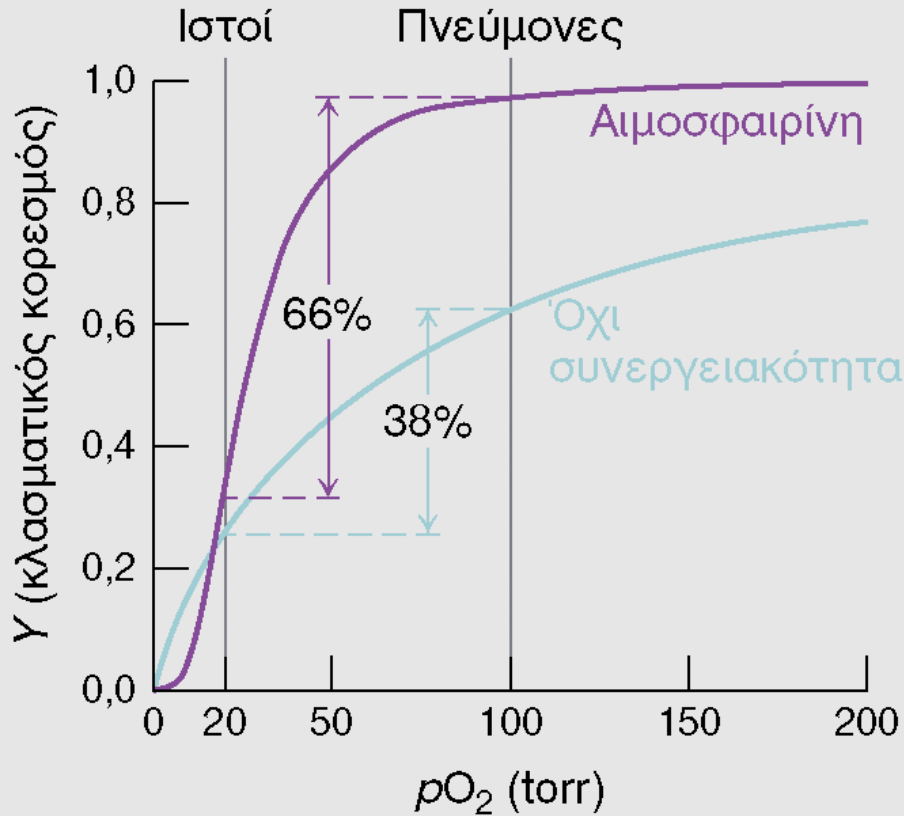
το μοντέλο **ακολουθίας** προτείνει διαδοχικές αλλαγές



**ΕΙΚΟΝΑ 10.16** Απλό μοντέλο ακολουθίας για ένα τετραμερές αλλοστερικό ένζυμο. Η πρόσδεση ενός προσδέτη (L) σε μια υπομονάδα αλλάζει τη στερεοδιάταξη αυτής της συγκεκριμένης υπομονάδας από τη μορφή T (τετράγωνο) στη μορφή R (κύκλος). Η μετάβαση αυτή επηρεάζει τη συγγένεια των άλλων υπομονάδων για τον προσδέτη.

Η σημαντική διαφορά είναι ότι αντίθετα με το εναρμονισμένο μοντέλο εδώ η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο επηρεάζει (ελαττώνει) επηρεάζει τα γειτονικά ενεργά κέντρα (αρνητικά ή θετικά)

# Αιμοσφαιρίνη (ΑΜΦ) ένα παράδειγμα συνεργειακού μοντέλου ρύθμισης (συνδυασμός των δυο μοντέλων)

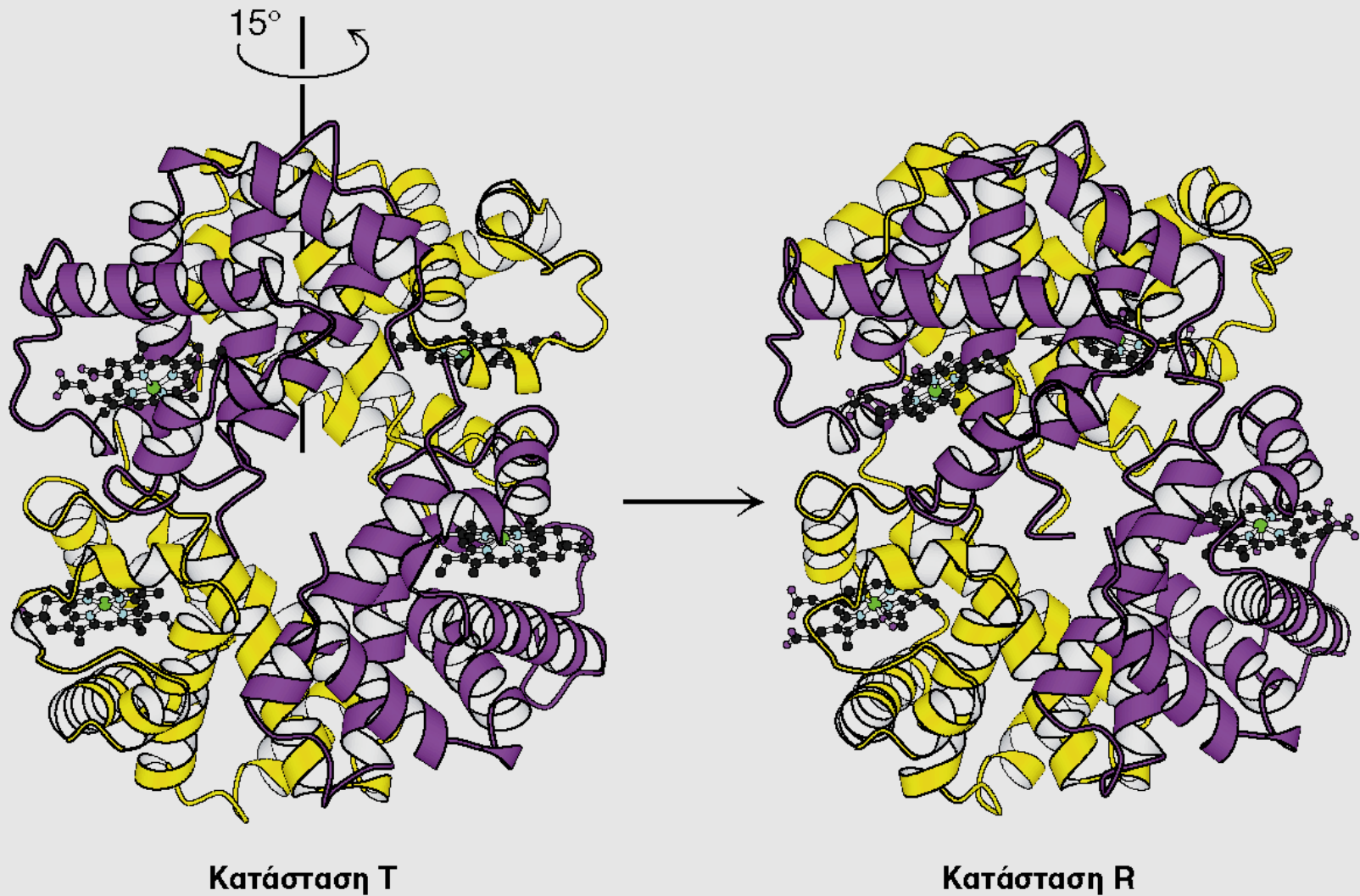


**ΕΙΚΟΝΑ 10.17** Η συνεργειακότητα αυξάνει τη μεταφορά του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη. Λόγω της συνεργειακότητας μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του  $O_2$ , η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει περισσότερο  $O_2$  στους ιστούς από ό,τι θα έκανε μια μη συνεργειακή πρωτεΐνη ( $pO_2$ , μερική πίεση του οξυγόνου.)

Στους πνεύμονες έχουμε  $pO_2$  περίπου ίσο με 100 torr (συγκέντρωση)  
Στους ιστούς έχουμε  $pO_2$  περίπου ίσο με 20 torr (συγκέντρωση)

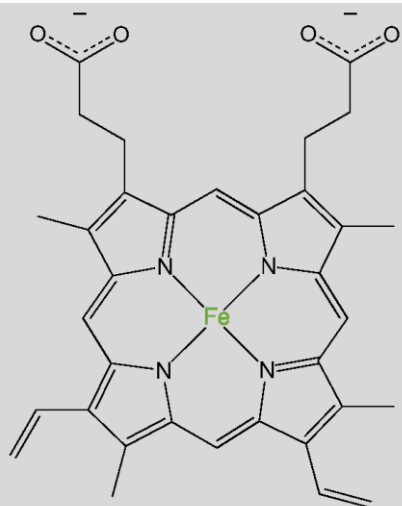
Σύμφωνα με τα παραπάνω και την  $K$  (σταθερά) της αντίδρασης, εάν έχουμε  $A$  δεοξυαιμοσφαιρίνη  $O_2$  οξυγόνο τότε  $AO_2$  Οξυαιμοσφαιρίνη  $A + O_2 \leftrightarrow AO_2$   
Όσο η αιμοσφαιρίνη κινείται προς τους ιστούς τόσο το  $O_2$  μειώνεται τόσο η αντίδραση πάει προς τα αριστερά  
Καλό σύστημα αλλά **όχι ικανοποιητικό** αποδίδει μονό το 38% του οξυγόνου ( $63\% - 25\% = 38\%$ )

Αυτό που συμβαίνει είναι απόδοση 68% !  
Μπορεί να συμβεί όταν η  $K$  αλλάζει ανάλογα τις συνθήκες

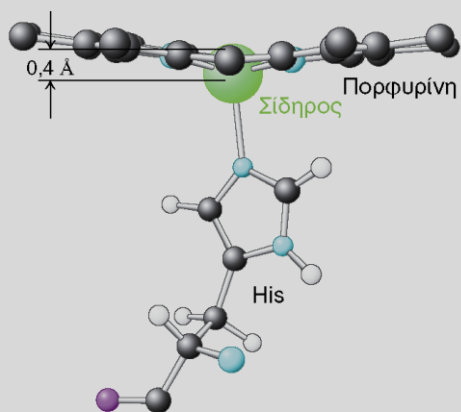


**ΕΙΚΟΝΑ 10.21** Μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R στην αιμοσφαιρίνη. Με την οξυγόνωση, ένα ζεύγος υπομονάδων *αβ* μετακινείται σε σχέση με το άλλο με μια περιστροφή 15°.

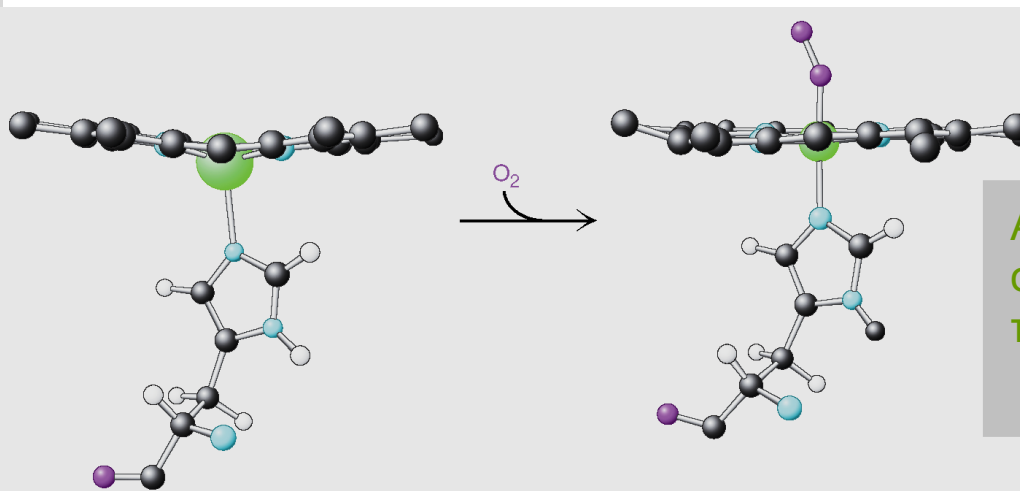
Προσθήκη  $O_2$  αφαιρεί δυο ηλεκτρόνια από τον σίδηρο και μειώνει τον όγκο του (εξωτερικά τροχιακά)



Αιμη  
(Fe-πρωτοπορφυρίνη IX)



ΕΙΚΟΝΑ 10.18 Η θέση του σιδήρου στη δεοξυαιμοσφαιρίνη. Το ιόν σιδήρου βρίσκεται λίγο έξω από το επίπεδο της πορφυρίνης στην αίμη.

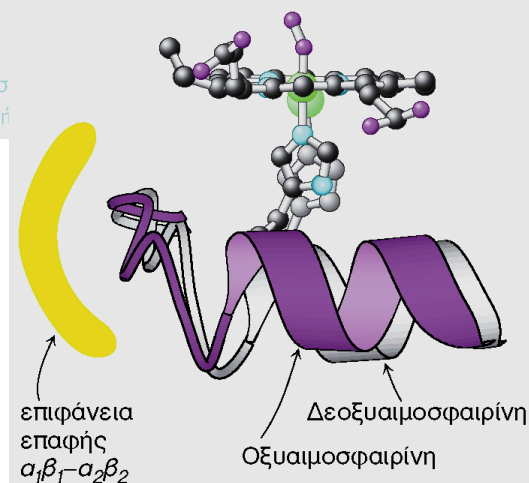


ΕΙΚΟΝΑ 10.19 Η πρόσδεση του οξυγόνου προκαλεί δομικές αλλαγές. Με την οξυγόνωση σιδήρου μετακινείται μέσα στο επίπεδο της αίμης. Η ιστιδίνη τραβιέται μαζί με το ιόν σιδή

Αυτό φέρνει αλλαγές στον δακτύλιο της πορφυρίνης

Η δομική μεταβολή του σιδήρου μεταβιβάζεται απευθείας στις άλλες υπομονάδες

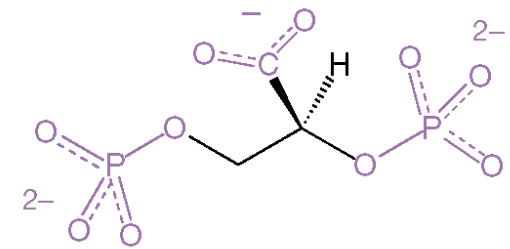
Όταν τρία  $O_2$  έχουν ενωθεί η εναπομένουσα μονάδα, προσδένει το  $O_2$  20 φορές ισχυρότερα από πρόσδένει το πρώτο



ΕΙΚΟΝΑ 10.22 Αλλαγές στερεοδιάταξης στην αιμοσφαιρίνη. Η μετακίνηση του ιόντος σιδήρου με την οξυγόνωση φέρνει το κατάλοιπο ιστιδίνης που είναι συνδεδεμένο με τον σίδηρο προς τον πορφυρινικό δακτύλιο. Η αντίστοιχη μετακίνηση της  $\alpha$ -έλικας που περιέχει ιστιδίνη μεταβάλλει την επιφάνεια επαφής μεταξύ των ζευγών  $\alpha\beta$ , προκαλώντας άλλες δομικές αλλαγές. Για σύγκριση, η δομή της δεοξυαιμοσφαιρίνης δείχνεται (γκρι) πίσω από τη δομή της οξυαιμοσφαιρίνης (κόκκινο).

Η απομονωμένη και καθαρισμένη ΑΜΦ από αίμα βρέθηκε να έχει **πολύ μεγαλύτερη συγγενικά** με το οξυγόνο

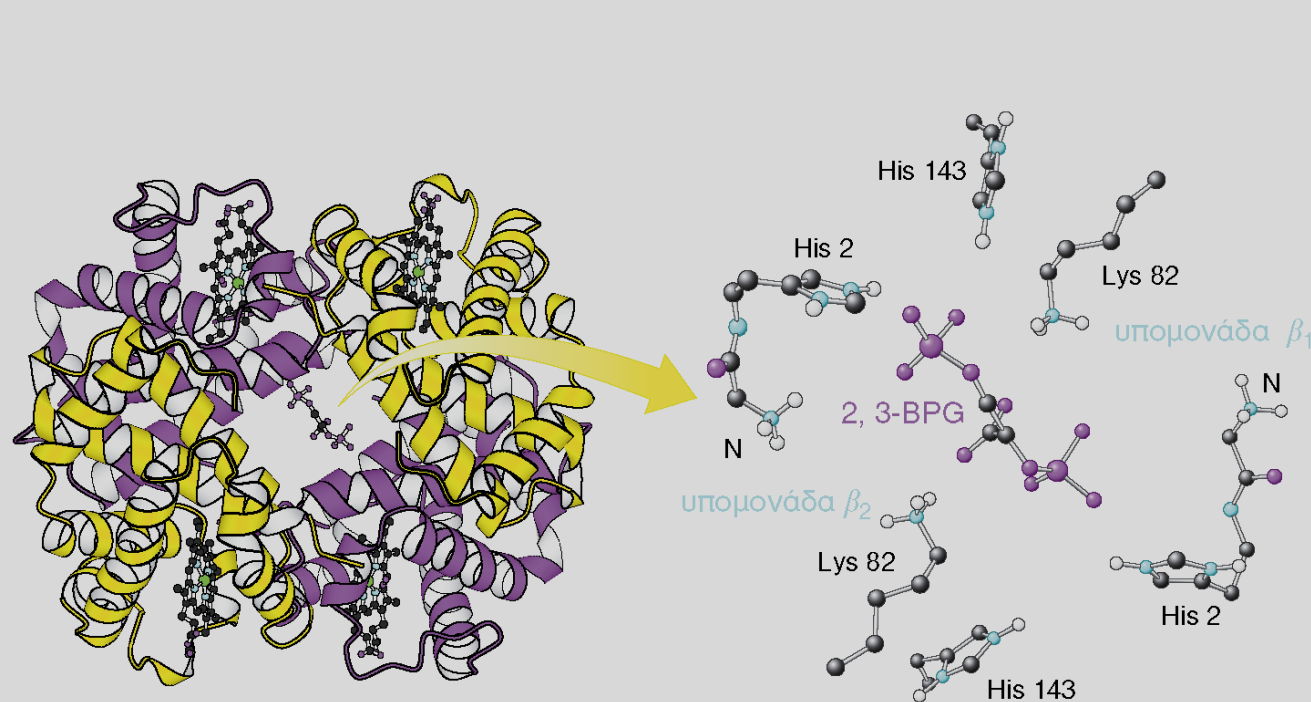
βρέθηκε όταν απομονώθηκε καθαρή αιμοσφαιρίνη  
βρίσκεται σε συγκέντρωση ~ 2mM ίδια με την ΑΜΦ



2,3-Διφωσφογλυκερικό  
(2,3-BPG)

Χωρίς την BPG η ΑΜΦ θα ήταν ένας ισχυρός προσδέτης  $O_2$  αλλά και εξαιρετικά **μη ικανός μεταφορέας**  $O_2$

# Πώς επηρεάζει η 2,3-BPG την ΑΜΦ



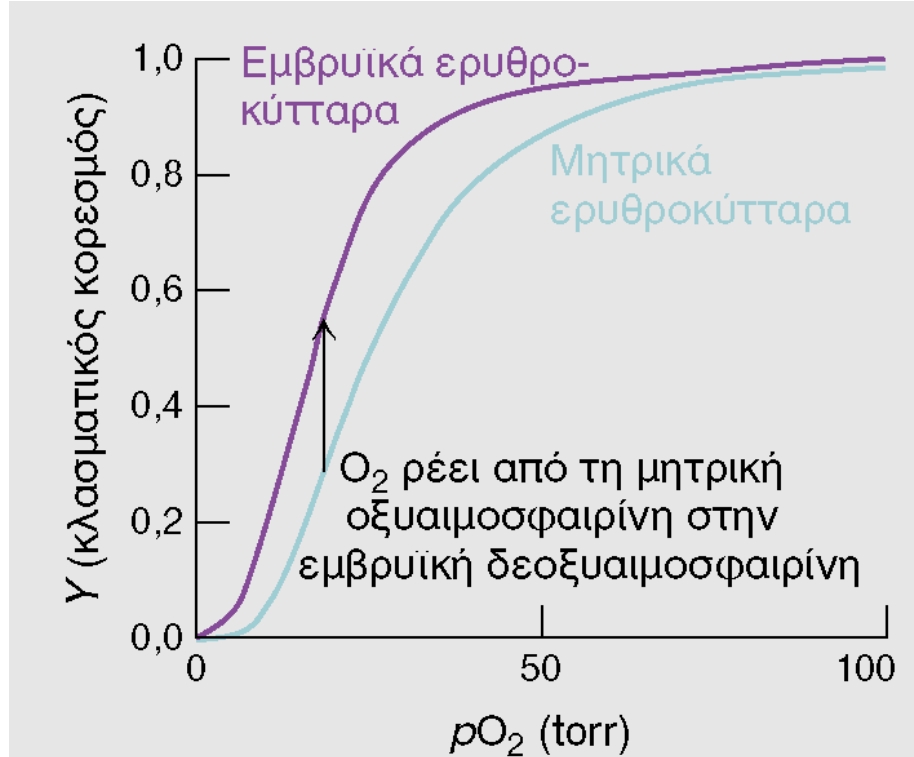
**ΕΙΚΟΝΑ 10.23** Τρόπος πρόσδεσης του 2,3-BPG στην ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη. Το 2,3-BPG προσδέεται στην κεντρική κοιλότητα της δεοξυαιμοσφαιρίνης. Εκεί, σε κάθε αλυσίδα  $\beta$  αλληλεπιδρά με τρεις θετικά φορτισμένες ομάδες.

Η  $K$  της αντίδρασης πρόσδεσης  $O_2$  μπορεί να μειωθεί με την ένωση της 2,3-BPG στην ΑΜΦ

Σε υψηλά υψόμετρα δεν υπάρχει αρκετό  $O_2$  για να «κορεστεί» η ΑΜΦ και να αλλάξει στερεοδιάταξη ( $T \rightarrow R$ ) οπότε απαιτείται η ΑΜΦ

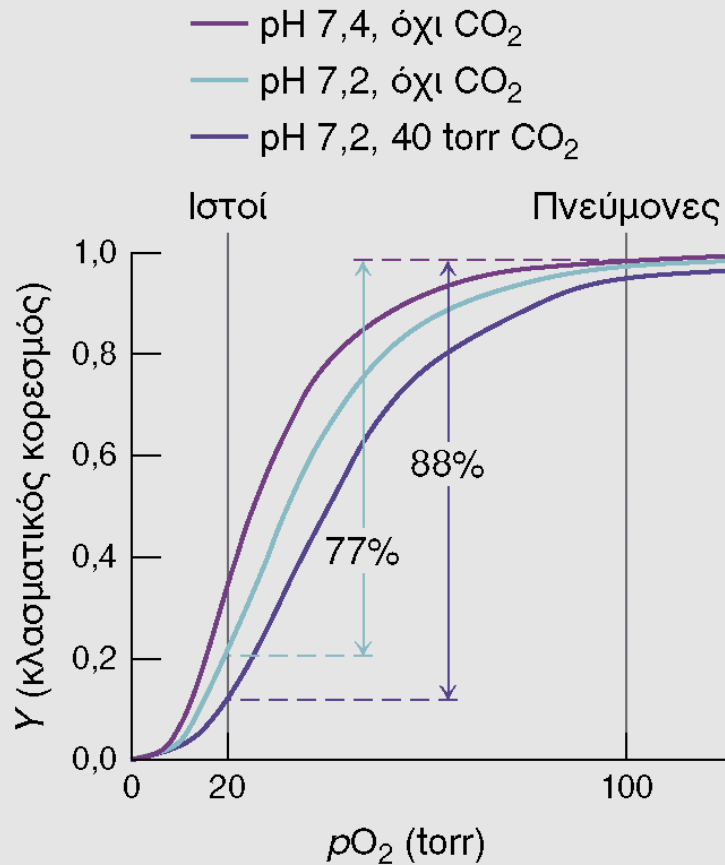


Η εμβρυϊκή ΑΜΦ χρειάζεται να προσδένει  $O_2$  ισχυρότερα από μητρική για να ρέει το  $O_2$  προς το βρέφος. Επιτυγχάνεται με αντικατάσταση του αμινοξέος που προσδένει την BPG



**ΕΙΚΟΝΑ 20.24 Η συγγένεια για  $O_2$  των εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων.** Τα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για οξυγόνο από ό,τι τα μητρικά ερυθροκύτταρα διότι η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη δεν προσδένει το 2,3-BPG τόσο καλά όσο το κάνει η μητρική αιμοσφαιρίνη.





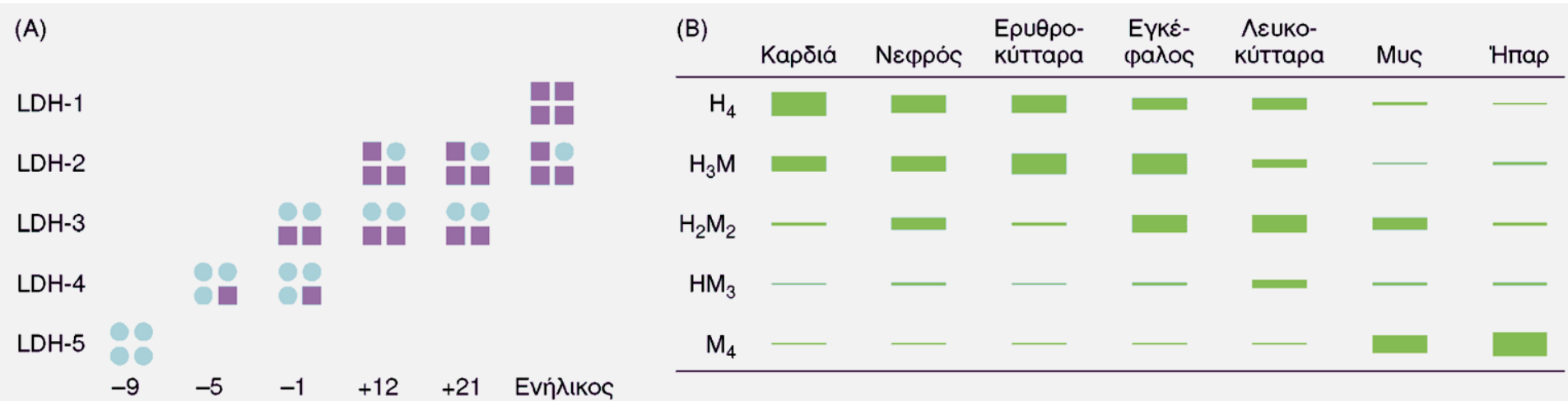
**ΕΙΚΟΝΑ 10.25** Επίδραση του pH και της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο. Η ελάττωση του pH από 7,4 (κόκκινη καμπύλη) σε 7,2 (μπλε καμπύλη) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του O<sub>2</sub> από την οξυαιμοσφαιρίνη. Η αύξηση της μερικής πίεσης του CO<sub>2</sub> από 0 σε 40 torr (καμπύλη πορφυρού χρώματος) επίσης ευνοεί την απελευθέρωση του O<sub>2</sub> από την οξυαιμοσφαιρίνη.

Ένα επιπλέον στάδιο ελέγχου είναι και η ποσότητα CO<sub>2</sub> το οποίο επηρεάζει το pH το οποίο επηρεάζει την σύνδεση το O<sub>2</sub> αλλά και ενώνεται με την δεοξυαιμοσφαιρίνη και έτσι ελευθερώνει επιπλέον οξυγόνο

# Ισοένζυμα

## Καταλύουν την ίδια αντίδραση

Είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων-Διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων  
Βρίσκονται συνήθως σε διαφορετικό ιστό ή σε διαφορετικό στάδιο της ανάπτυξης



**ΕΙΚΟΝΑ 10.27 Τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης.** (A) Το προφίλ του ισοενζύμου της LDH από καρδιά επίμοσος αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Το ισοένζυμο H αντιπροσωπεύεται από τετράγωνα και το ισοένζυμο M από κύκλους. Οι αρνητικοί και οι θετικοί αριθμοί υποδηλώνουν αντίστοιχα τις ημέρες πριν και μετά τη γέννηση. (B) Η ποσότητα του ισοενζύμου της LDH ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό. [(A) Κατά W.-H. Li, *Molecular Evolution* (Sinauer, 1997), p. 283, (B) Κατά K. Urich, *Comparative Animal Biochemistry* (Springer Verlag, 1990), p. 542.]

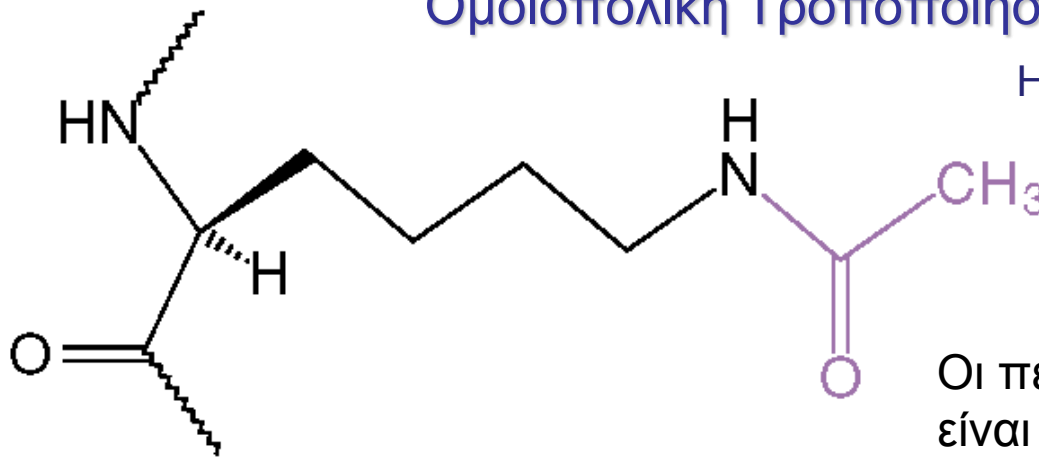
**Το M<sub>4</sub> δρα καλύτερα σε αναερόβιο περιβάλλον ενώ το H<sub>4</sub> σε αερόβιο περιβάλλον**

**Η ανάγκες αυτές αλλάζουν κατά την ανάπτυξη ή κατά τον ιστό**

**Τα ισοένζυμα εξηγούν και εν μέρει την ανάγκη ιντρονίων και εξόνιων με τη σύνθεση διαφορετικών καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων**

# Ομοιοπολική Τροποποίηση Ενζύμων

Η μεγάλη διαφορά με το προηγούμενο



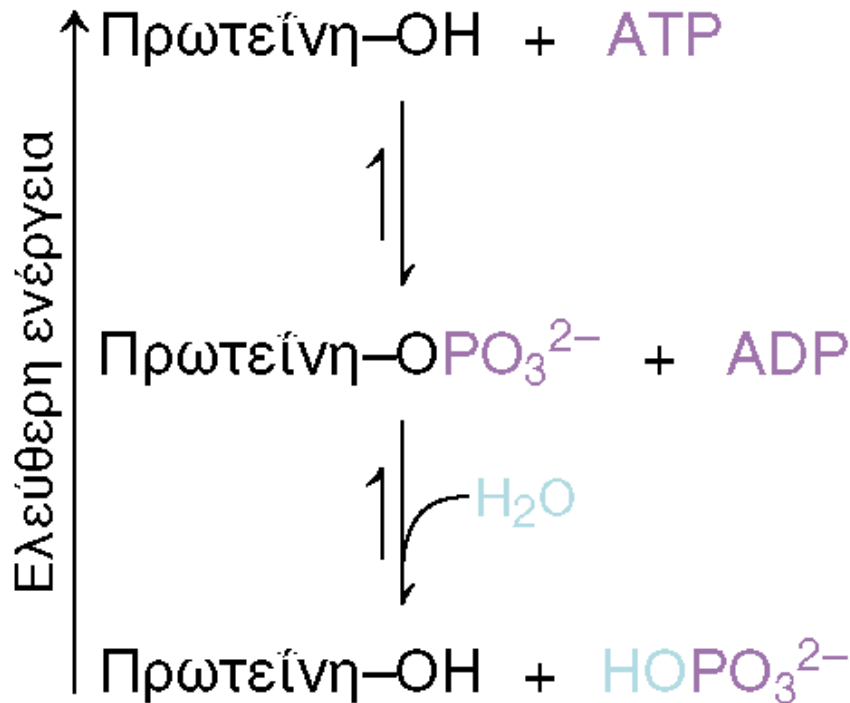
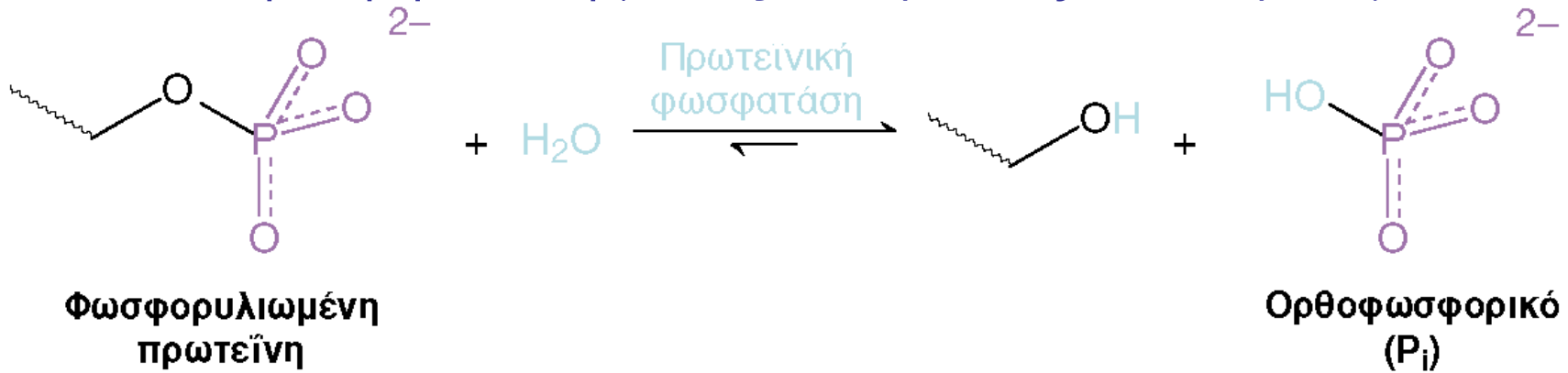
**Ακετυλιωμένη λυσίνη**

Οι περισσότερες ακετυλιωμένες λυσίνες είναι συνδεδεμένες με γονίδια που μεταγράφονται ενεργά

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10.1** Κοινές ομοιοπολικές τροποποιήσεις της πρωτεϊνικής δραστηριότητας.

<i>Τροποποίηση</i>	<i>Μόριο δότης</i>	<i>Παράδειγμα τροποποιημένης πρωτεΐνης</i>	<i>Λειτουργία της πρωτεΐνης</i>
Φωσφορυλίωση	ATP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	Ομοιοστασία γλυκόζης, μεταγωγή ενέργειας
Ακετυλίωση	Ακετυλο-CoA	Ιστόνες	Πακετάρισμα DNA, μεταγραφή
Μυριστοϋλίωση	Μυριστοϋλο-CoA	Src	Μεταγωγή σήματος
ADP-ριβοζυλίωση	NAD	RNA πολυμεράση	Μεταγραφή
Φαρνεσυλίωση	Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο	Ras	Μεταγωγή σήματος
γ-Καρβοξυλίωση	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Θρομβίνη	Πήξη αίματος
Θεικίωση	3'-Φωσφαδενοσίνη-5'-φωσφοθειικό	Ινωδογόνο	Σχηματισμός θρόμβου αίματος
Ουβικιτίνωση	Ουβικιτίνη	Κυκλίνη	Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

# Ομοιοπολική Τροποποίηση Ενζύμων φωσφορυλίωση (κινάσες 550 πρωτεΐνες στον άνθρωπο)

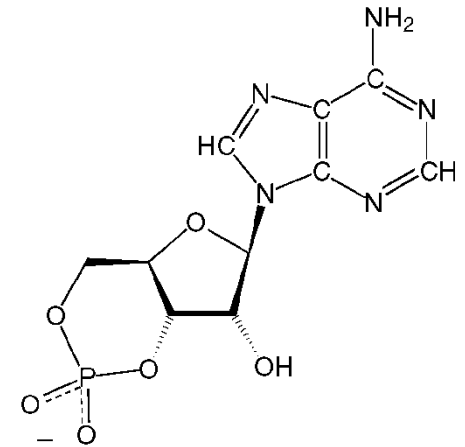


Συνδέει **ATP** το οποίο είναι σημαντικό «ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου» με τον έλεγχο των ενζύμων

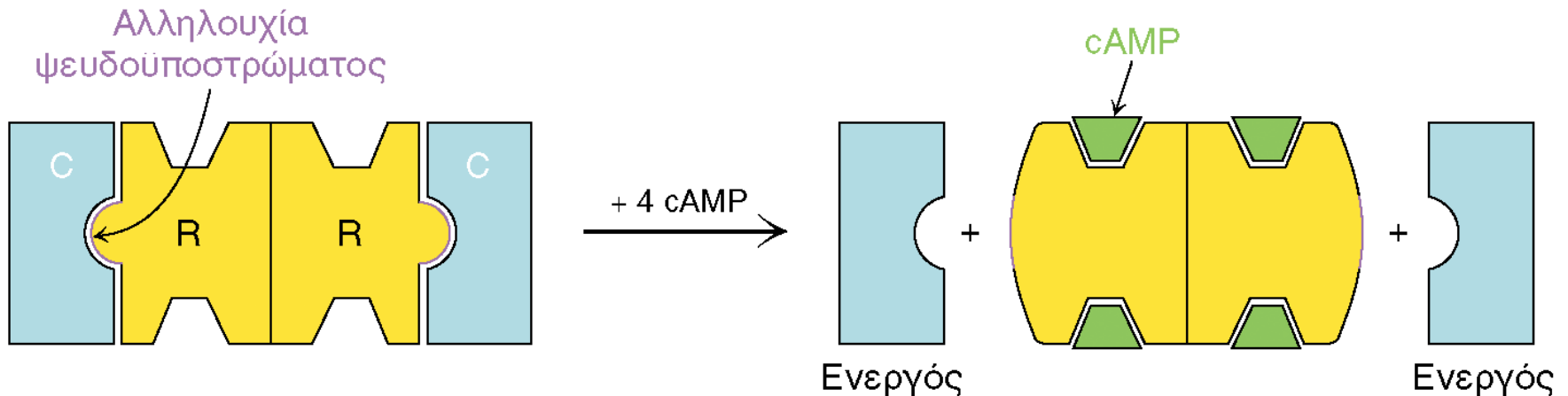
**PKA Παράδειγμα ελέγχου ενεργοποίησης κινάσης**  
**Μόριο ενεργοποιητής cAMP (πολύ κοινό μόριο ενεργοποιητής κυτταρικών μηχανισμών)**  
(όλοι οι μηχανισμοί απαιτούν αλλαγή συγκέντρωσης ενός μικρού μορίου)

Υπόστρωμα Arg-Arg-Ser-Ala-Ile  
ψευδοϋπόστρωμα Arg-Arg-Ala-Ala-Ile  
υπάρχει στην αλληλουχία του R

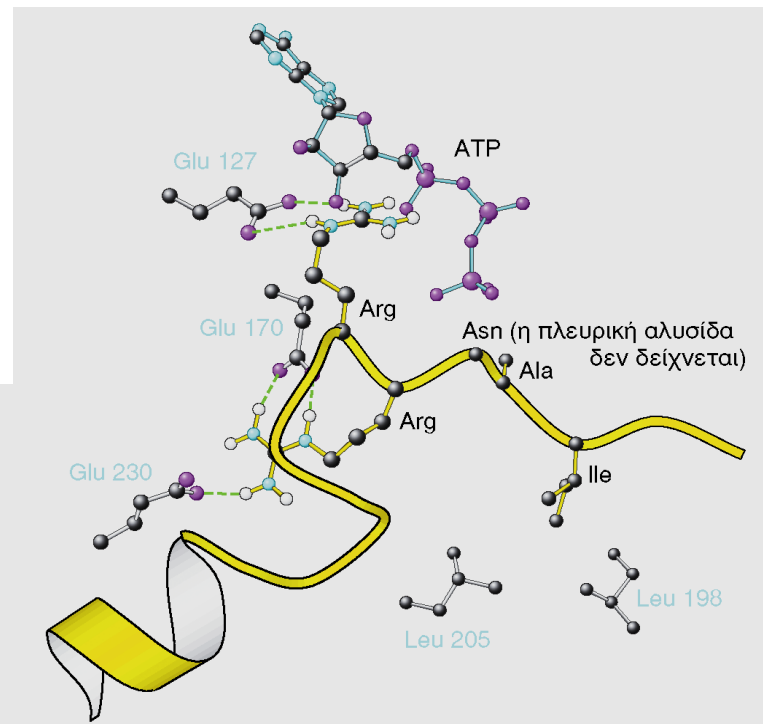
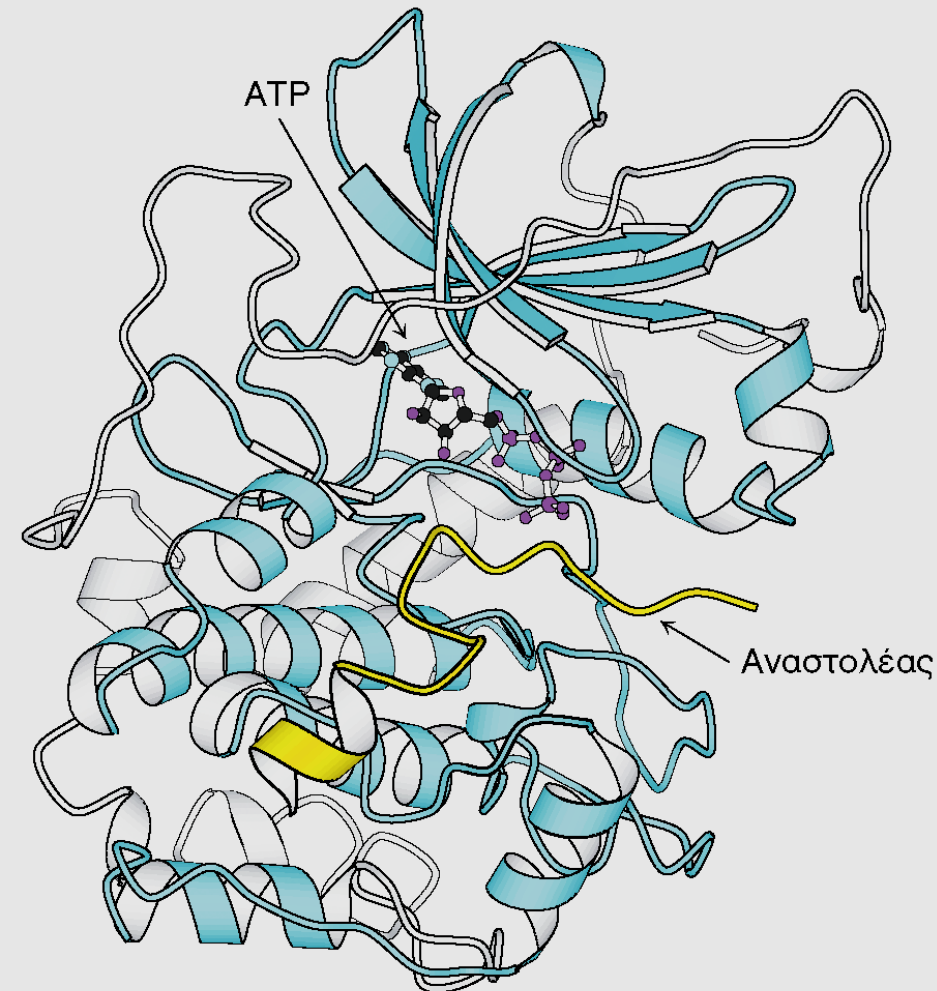
Κατανόηση των μηχανισμών επιτρέπει σχεδιασμό και ανάπτυξη φαρμάκων για θεραπεία ασθενειών



Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη



**ΕΙΚΟΝΑ 10.28 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής κινάσης A.** Η πρόσδεση τεσσάρων μορίων cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A με το να διαχωρίζει το απενεργοποιημένο ολοένζυμο ( $R_2C_2$ ) σε μια ρυθμιστική υπομονάδα ( $R_2$ ) και δύο ενεργές καταλυτικές υπομονάδες (C).

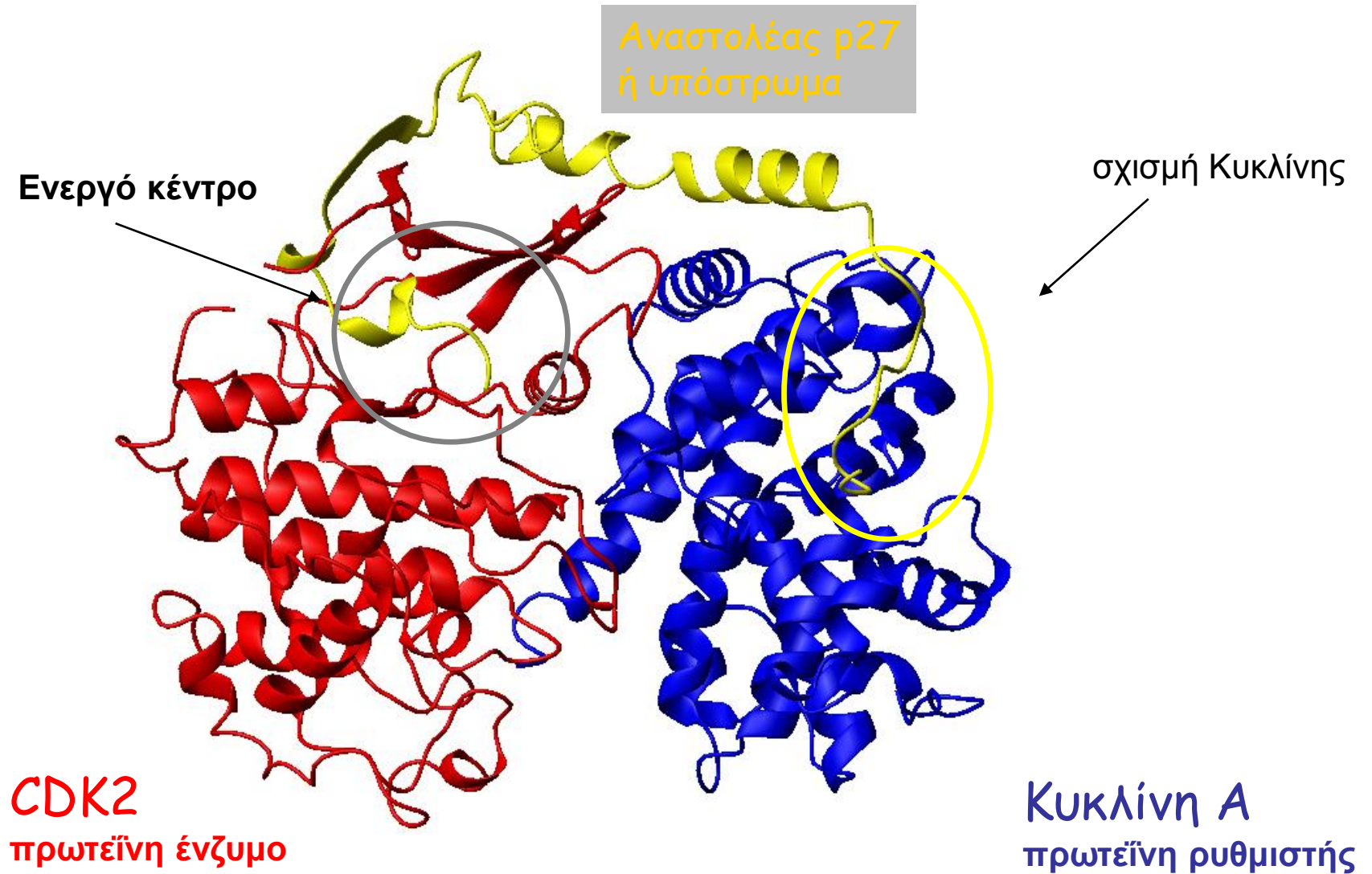


**ΕΙΚΟΝΑ 10.30 Πρόδεση του ψευδοϋποστρώματος στην πρωτεϊνική κινάση A.** Οι δύο πλευρικές αλυσίδες της αργίνινης του ψευδοϋποστρώματος σχηματίζουν γέφυρες άλατος με τρεις καρβοξυλικές ομάδες γλουταμικών. Επίσης, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές για την αναγνώριση του υποστρώματος. Το κατάλοιπο ισολευκίνης του ψευδοϋποστρώματος είναι σε επαφή με ένα ζεύγος καταλοίπων λευκίνης του ενζύμου.

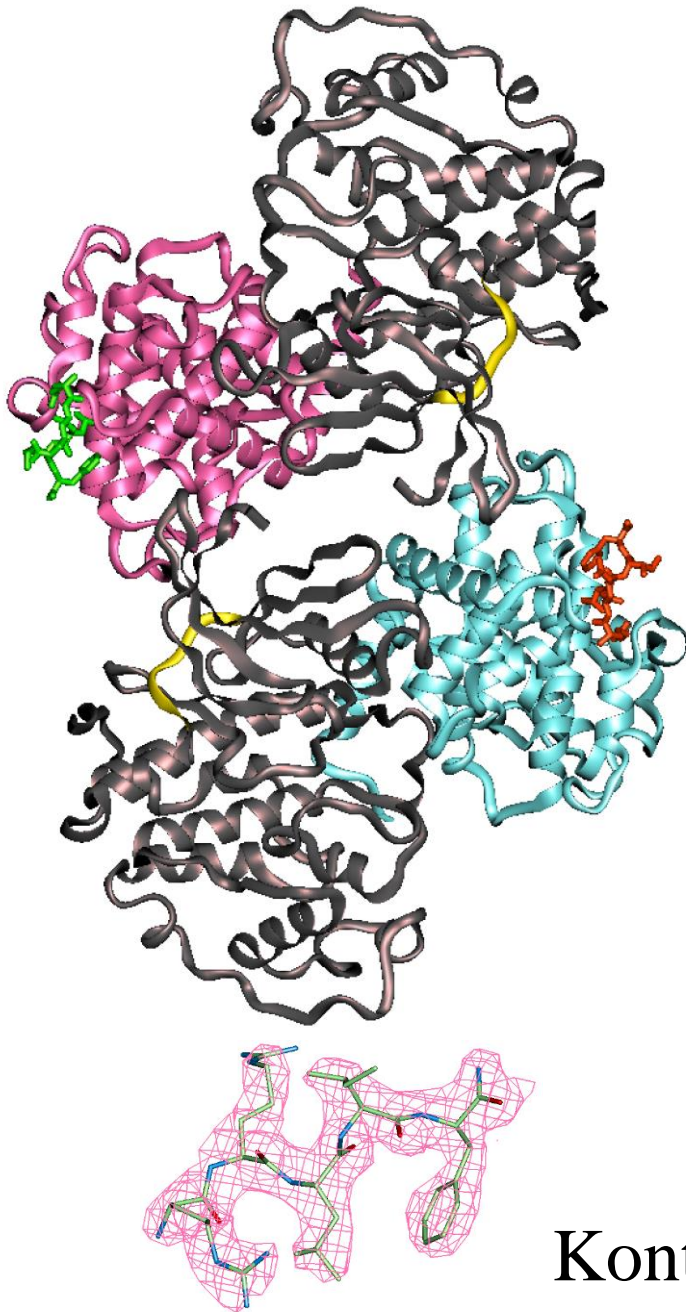
A

**προσδεμένη σε έναν αναστολέα.** Τριδιάστατη δομή ενός συμπλόκου της καταλυτικής υπομονάδας της πρωτεϊνικής κινάσης A και ενός αναστολέα που φέρει μια αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος. Ο αναστολέας (κίτρινο) προσδέεται σε μια σχισμή μεταξύ των δομικών περιοχών του ενζύμου. Η προσδεμένη ATP γειτνιάζει με το ενεργό κέντρο.

# Ενεργοποίηση μετά από ένωση με πρωτεΐνη ρυθμιστή



## Αναστολείς της κυκλίνης A



Modifications at position:	Sequence	IC <sub>50</sub> (μM)	
		Competitive cyclin A binding	CDK2/cyclin A kinase activity
1	Ac - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>p</i> -F-Phe -NH <sub>2</sub>	2.0	12
	H - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	0.53	7.2
	H - Arg - Cit - Leu - Ile - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	0.59	0.52
	H - Cit - Cit - Leu - Ile - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub> *	21	37
2	H - Arg - Arg - Leu - Ala - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	0.73	8.1
	H - Arg - Cit - Leu - Ala - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	2.6	24
	H - Arg - Gln - Leu - Ile - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	24	8.3
	H - Arg - Cit - Leu - Ile - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	0.59	0.52
3	H - His - Ala - Lys - Arg - Arg - Leu - Ile - Phe -NH <sub>2</sub>	0.05	0.14
	H - His - Ala - Lys - Arg - Arg - Ala - Ile - Phe -NH <sub>2</sub>	1.5	> 50
4	H - Cit - Cit - Leu - Ile - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub> *	21	37
	H - Cit - Cit - Leu - Ala - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	79	12
	H - Cit - Cit - Leu - Asn - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	19	37
	H - Arg - Arg - Leu - Ile - Phe -NH <sub>2</sub> *	0.68	7.7
	H - Arg - Arg - Leu - ----- Phe -NH <sub>2</sub>	8.1	> 50
	H - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	0.53	7.2
	H - Arg - Arg - Leu - ----- ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	19	50
5	Ac - Arg - Arg - Leu - Asn - Phe -NH <sub>2</sub>	12	> 50
	Ac - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>p</i> -F-Phe) -NH <sub>2</sub>	2.0	12
	Ac - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>m</i> -Cl-Phe) -NH <sub>2</sub> *	5.6	31
	Ac - Arg - Arg - Leu - Asn - ( <i>p</i> -Cl-Phe) -NH <sub>2</sub>	1.8	13

Kontopidis, G; et al. Structure (Dec 2003)



# Ενεργοποίηση με πρωτεολυτική διάσπαση

Ανενεργό ενζυμο – ζυμογόνο (ή προενζυμο)

Σημαντική διαφορά με τα προηγούμενα  
Η ενεργοποίηση συμβαίνει μόνο μια φορά στην ζωή του ενζύμου

Δεν απαιτείται άλλο ένζυμο ή ATP για να ενεργοποιηθούν

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10.3** Γαστρικά και παγκρεατικά ζυμογόνα.

<i>Θέση σύνθεσης</i>	<i>Ζυμογόνο</i>	<i>Ενεργό ένζυμο</i>
Στόμαχος	Πεψινογόνο	Πεψίνη
Πάγκρεας	Χυμοθρυψινογόνο	Χυμοθρυψίνη
Πάγκρεας	Θρυψινογόνο	Θρυψίνη
Πάγκρεας	Προκαρβοξυπεπτιδάση	Καρβοξυπεπτιδάση
Πάγκρεας	Προελαστάση	Ελαστάση

## Παραδείγματα από βιολογικές λειτουργίες

Ένζυμα της πέψης (μεγάλη ποσότητα υποστρώματος)

Πήξη του αίματος (γρήγορη απόκριση-κλείσιμο τραύματος)

*ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ* (το κύριο συστατικό του δέρματος από το διαλυτό πρόδρομο *προκολλαγόνο*)

Αναπτυξιακές διεργασίες (αποικοδόμηση μήτρα θηλαστικών μετά τοκετό)

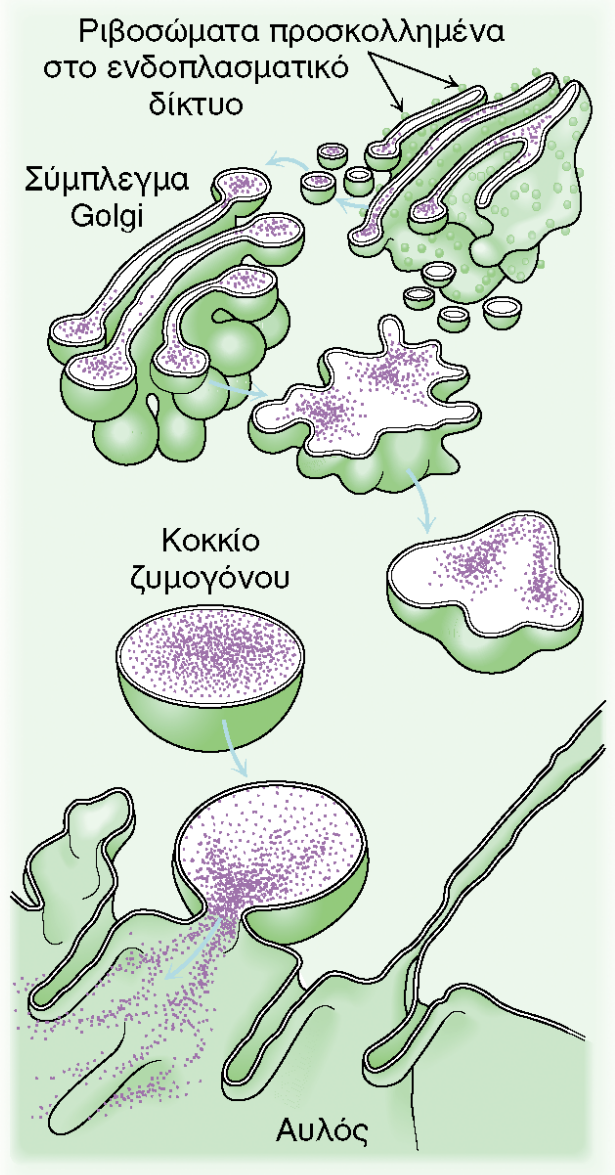
*Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση (προκασπάσεις)*

Χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι ότι η αλλαγή συμβαίνει μια φορά στην ζωή του ενζύμου.

Χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω φυσιολογικών διεργασιών είναι συμβαίνουν μια φορά και δεν είναι αντιστρεπτές!

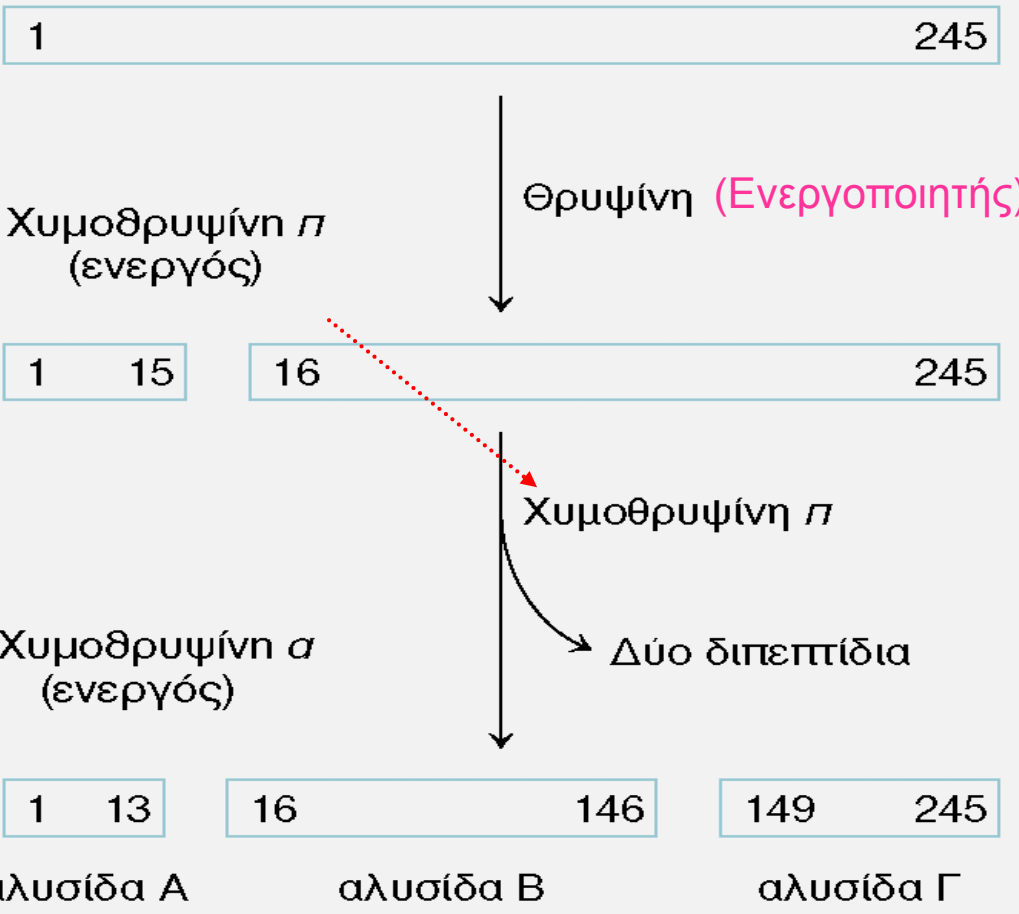
Βλέπουμε πως βιοχημικά χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζουν και καθορίζουν φυσιολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά

**Εξειδικευμένη διάσπαση πεπτιδίου δεσμού**



**ΕΙΚΟΝΑ 10.31** Έκκριση ζυμογόνων από ένα εξωκρινές κύτταρο του παγκρέατος.

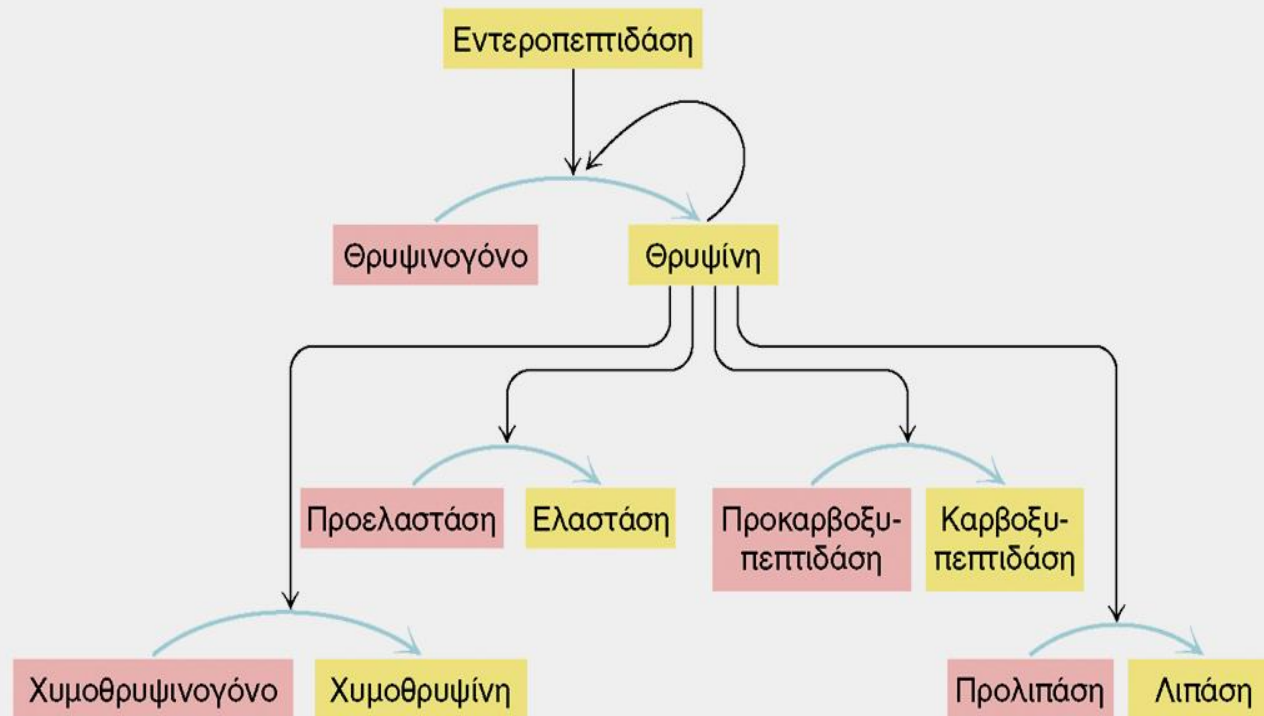
**Χυμοθρυψινογόνο (ανενεργό)**



**ΕΙΚΟΝΑ 10.32** Πρωτεολυτική ενεργοποίηση του χυμοθρυψινογόνου. Οι τρεις αλυσίδες της χυμοθρυψίνης α είναι ενωμένες με δύο εσωτερικούς δισουλφιδικούς δεσμούς (Α σε Β, και Β σε Γ).

# Θρυψίνη ο κοινός ενεργοποιητής αρκετών πρωτεολυτικών ενζύμων

πέψη πρωτεϊνών στο δωδεκαδάκτυλο απαιτεί ταυτόχρονη ενεργοποίηση πολλών πρωτεολυτικών ενζύμων (λιπάση, διαφορετικές πεπτιδάσες)



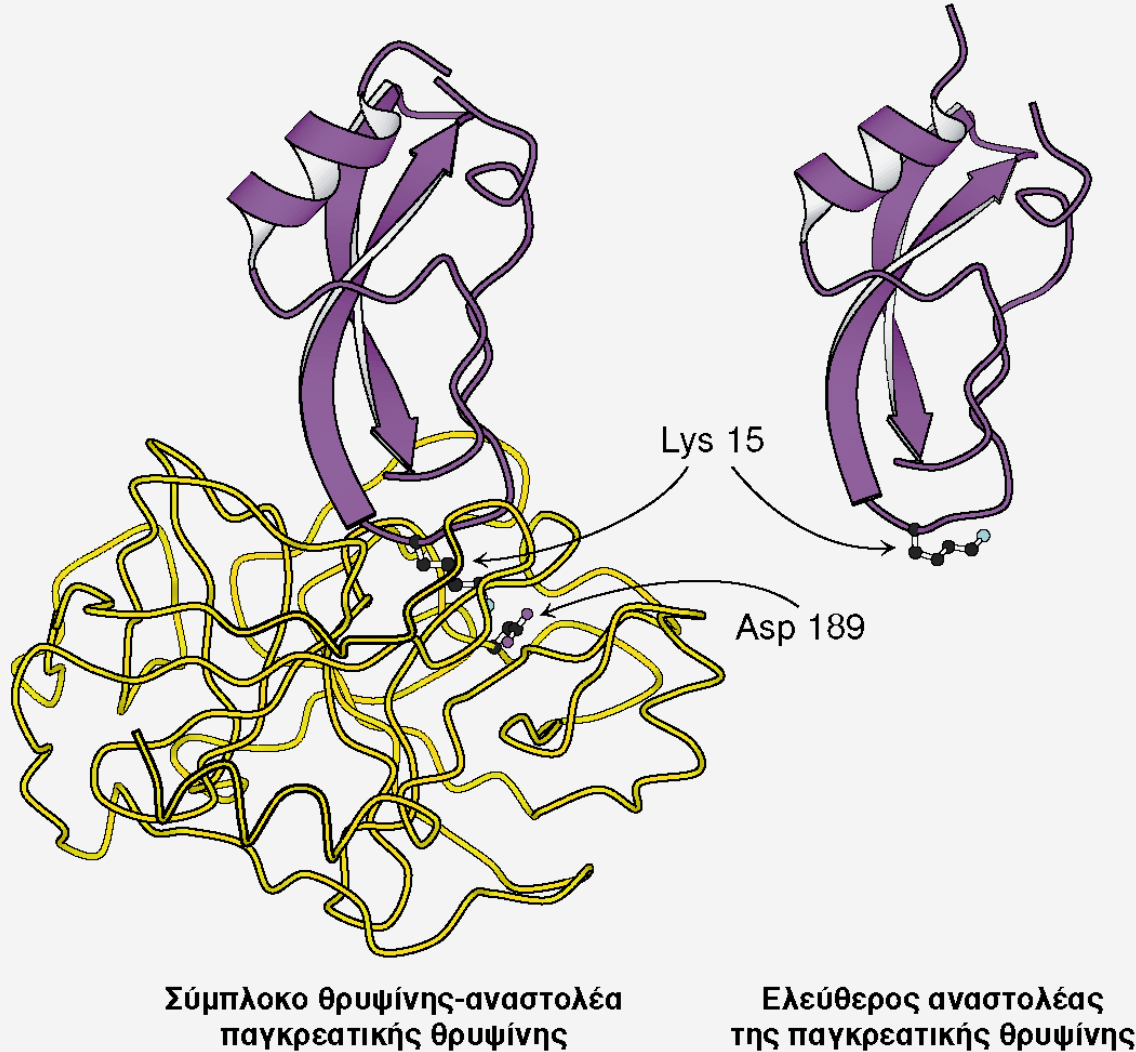
**ΕΙΚΟΝΑ 10.34** Ενεργοποίηση ζυμογόνου από πρωτεολυτική διάσπαση. Η εντεροπεπτιδάση αρχίζει την ενεργοποίηση των παγκρεατικών ζυμογόνων με την ενεργοποίηση της θρυψίνης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί άλλα ζυμογόνα. Τα ενεργά ένζυμα δείχνονται με κίτρινο, τα ζυμογόνα δείχνονται με πορτοκαλί.

## Μερικά πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν ειδικούς αναστολείς

Η σταθερά διάστασης  $K_d = 1/K$  για την σύνδεση είναι 0,1pM  
Ο αναστολέας είναι εάν πολύ καλό ανάλογο του υποστρώματος αλλά με ημιζωή μερικών μηνών

Γιατί υπάρχει ο αναστολέας;

Ένα επιπλέον μέτρο προστασίας  
Μόρια θρυψίνης που έχουν ενεργοποιηθεί στο πάγκρεας θα μπορούσαν να καταστρέψουν σοβαρά αυτούς τους ιστούς (νέκρωση) ή αιμορραγία από ενεργοποίηση της ελαστάσης

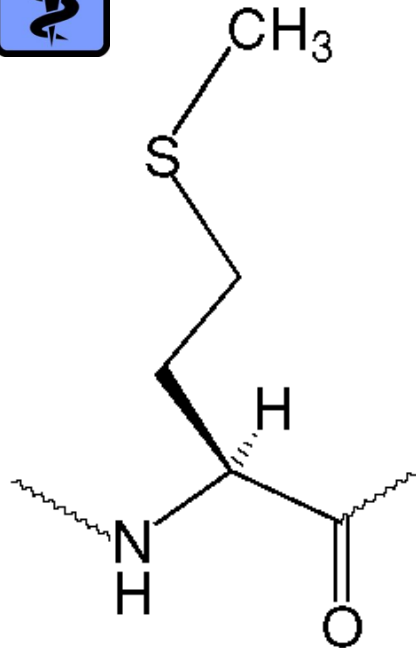


**ΕΙΚΟΝΑ 10.35** Αλληλεπίδραση της θρυψίνης με τον αναστολέα της. Δομή του συμπλόκου της θρυψίνης (κίτρινο) με τον αναστολέα της παγκρεατικής θρυψίνης (κόκκινο). Η λυσίνη 15 του αναστολέα εισδύει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με το ασπαραγινικό 189. Ο προσδεμένος και ο ελεύθερος αναστολέας έχουν σχεδόν πανομοιότυπη δομή.

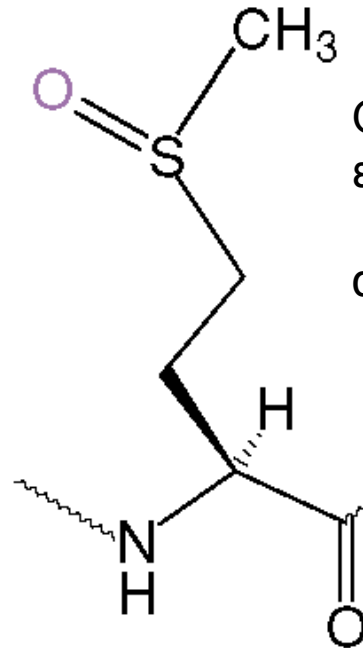
Ο αναστολέας της παγκρεατικής θρυψίνης δεν είναι μοναδικός

**Αναστολέας της ελασάσης**  
(αντιθρυψίνη α1), προστατεύει  
τους ιστούς από την ελασάση  
(σκοπός καταστροφή βακτηριδίων  
στους πνεύμονες)

Γενετικές ανωμαλίες **Lys53Glu** της αντιθρυψίνης α1  
(πρωτεΐνη τύπου Z) οδηγούν σε μείωση της έκκρισης  
από το ήπαρ, με αποτέλεσμα η περίσσεια ελασάσης  
καταστρέφει τις ελαστικές ίνες στα κυψελιδικά  
τοιχώματα των πνευμόνων (κλινικά ονομάζεται  
εμφύσημα)



Οξειδωση



Οι κυψελίδες γίνονται λιγότερο  
ελαστικές και χωράνε λιγότερο αέρα.  
Το κάπνισμα αυξάνει την πιθανότητα  
ανάπτυξης *εμφυσηματος*

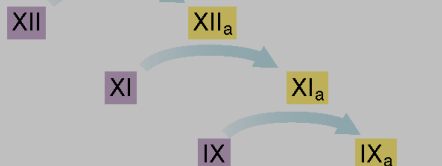
**Αιτία:** ο καπνός οξειδώνει την  
Met 358 του αναστολέα και  
παρεμποδίζει την πρόσδεση του  
στην ελασάση

**ΕΙΚΟΝΑ 10.36** Οξειδωση της μεθειονίνης σε  
σουλφοξειδίο.

## ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΠΟΡΕΙΑ

Κατεστραμμένη επιφάνεια

Κινηνογόνο  
Καλλικρεΐνη



## ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΠΟΡΕΙΑ

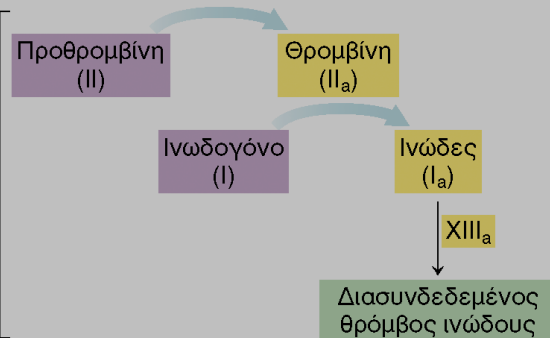
Τραύμα

Ιστικός  
παράγοντας

Τραύμα



ΤΕΛΙΚΗ  
ΚΟΙΝΗ  
ΠΟΡΕΙΑ



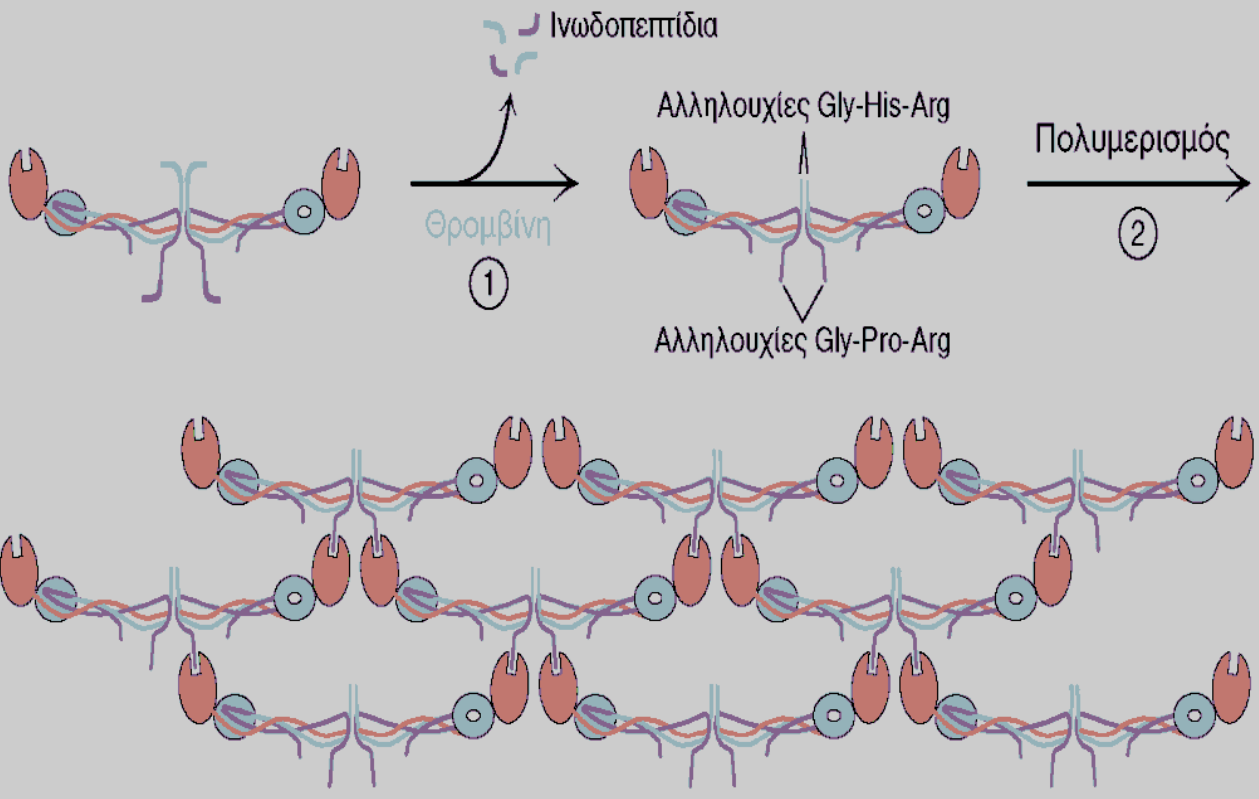
## Πήξη αίματος καταρράκτης ενεργοποιήσεων ζυμογόνων

Ενεργοποίηση ενζύμων από  
ένζυμο  
Τελική ενίσχυση κατά 10.000  
φορές σε τέσσερα βήματα  
10.000 ένζυμα θα  
χρειαζόταν 10.000 ενεργοποιητές  
στο ίδιο σημείο τώρα έχουμε μόνο  
ένα ένζυμο  
Αποτέλεσμα γρήγορη απόκριση  
(στο τραύμα)

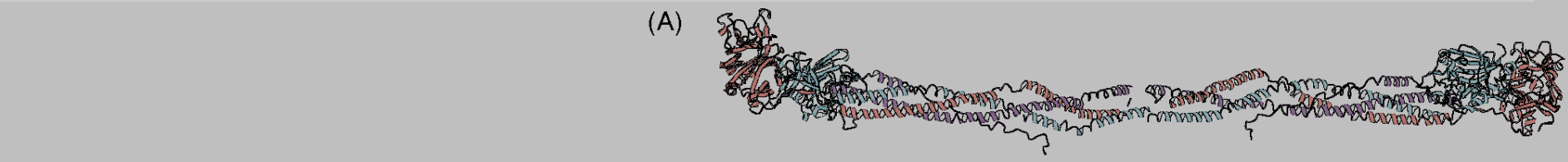
Η ενεργοποίηση του καταρράκτη  
ενζύμων είναι  
Ενδογενής  
(ενδοθηλιακή στιβάδα αιμοφόρα αγγεία)  
ή εξωγενής  
(τραυματισμένος ιστός)

**ΕΙΚΟΝΑ 10.37 Καταρράκτης της πήξης του αίματος.** Σχηματίζεται ένας θρόμβος ινώδους από τη συνεργασία της ενδογενούς, της εξωγενούς και της τελικής κοινής πορείας. Η ενδογενής πορεία αρχίζει με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII (παράγοντας Hageman) από την επαφή με ανώμαλες επιφάνειες που δημιουργούνται από την κάκωση. Το έναυσμα για την εξωγενή πορεία δίνεται από το τραύμα, το οποίο ενεργοποιεί τον παράγοντα VII και απελευθερώνει μια λιποπρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται ιστικός παράγοντας, από τα αιμοφόρα αγγεία. Ανενεργές μορφές των παραγόντων της πήξης δείχνονται με κόκκινο· τα ενεργοποιημένα τους ισοδύναμα (δείχνονται με τον δείκτη 'a') είναι κίτρινα. Διεγερτικές πρωτεΐνες που δεν είναι οι ίδιες ένζυμα δείχνονται με μπλε. Ένα αξιοθαύμαστο χαρακτηριστικό αυτής της πορείας είναι ότι η ενεργοποιημένη μορφή ενός παράγοντα πήξης καταλύει την ενεργοποίηση του επόμενου παράγοντα.

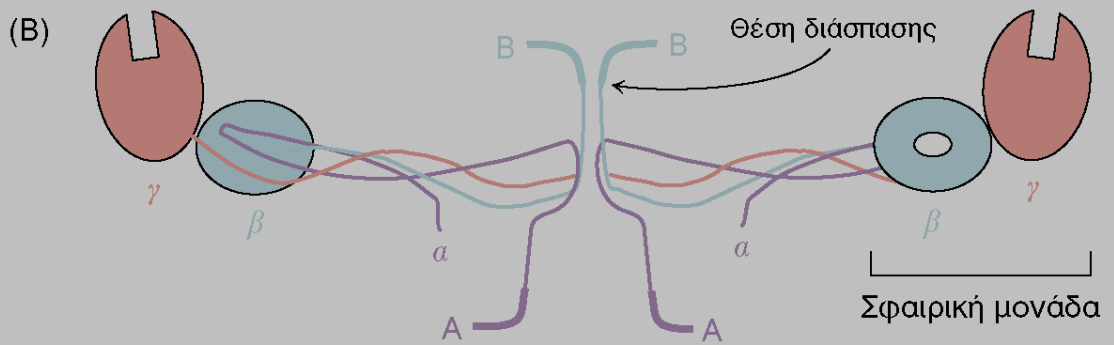
Το ινωδογόνο μετατρέπεται σε **θρόμβο** (ένζυμο **θρομβίνη**)



**ΕΙΚΟΝΑ 10.40 Σχηματισμός θρόμβου ινώδους.** (1) Η θρομβίνη διασπά τα ινωδοπεπτίδια από την κεντρική σφαίρα του ινωδογόνου. (2) Οι σφαιρικές περιοχές στα καρβοξυ-τελικά άκρα των αλυσίδων  $\alpha$  και  $\gamma$  αλληλεπιδρούν με «κομβία» που είναι εκτεθειμένα στα αμινο-τελικά άκρα των αλυσίδων  $\beta$  και  $\alpha$  για να σχηματίσουν θρόμβους.

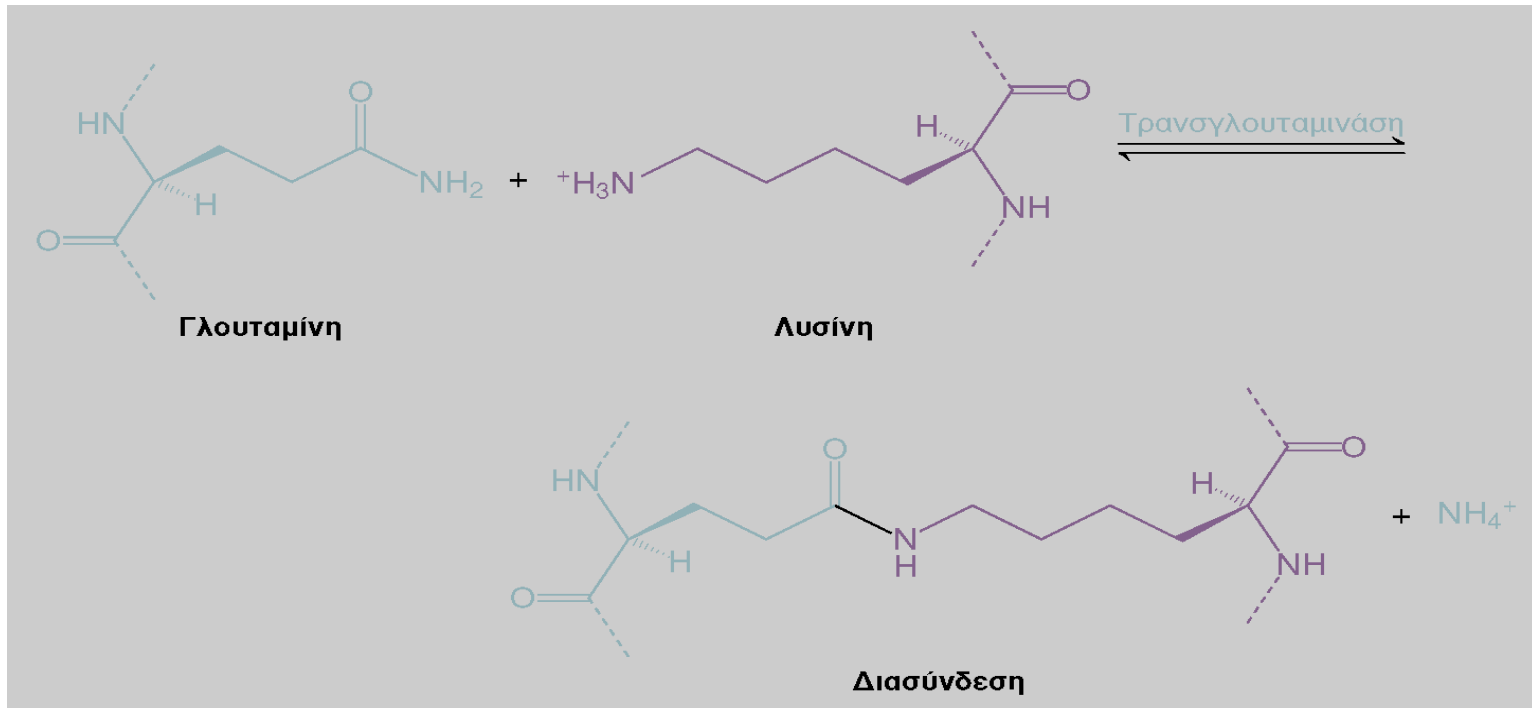


**ΕΙΚΟΝΑ 10.38 Δομή ενός μορίου ινωδογόνου.** (A) Ένα διάγραμμα κορδέλας. Οι δύο περιοχές ράβδου είναι ελικοειδή σπειράματα  $\alpha$ -έλικας, ενωμένα σε κάθε άκρο με μια σφαιρική περιοχή. (B) Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει τις θέσεις των ινωδοπεπτιδίων A και B.





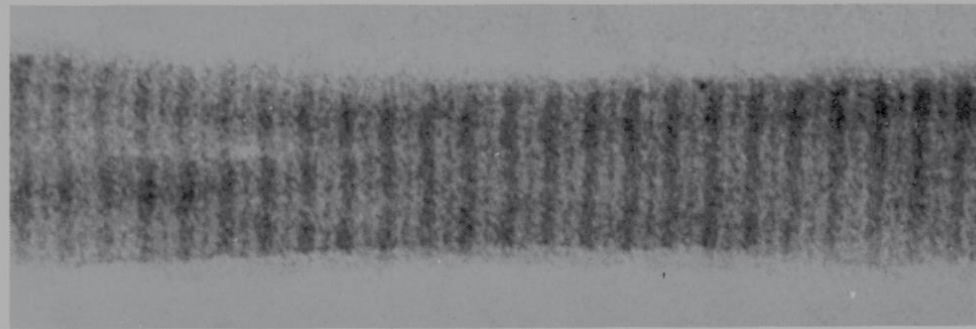
# Τελευταίο βήμα οι γειτονικές αλυσίδες ενώνονται ομοιοπολικά



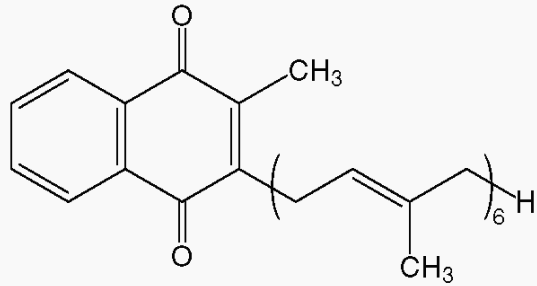
## Θρόμβος

### ΕΙΚΟΝΑ 10.39 Ηλεκτρονιομικρογραφία

**ινώδους.** Το διάστημα των 23 nm κατά μήκος του άξονα του ινώδους είναι το μισό μήκος ενός μορίου ινωδογόνου. [Ευγενική προσφορά Dr. Henry Slayter.]



# Η βιταμίνη K λαμβάνει μέρος στο τελευταίο στάδιο σχηματισμού της προθρομβίνης

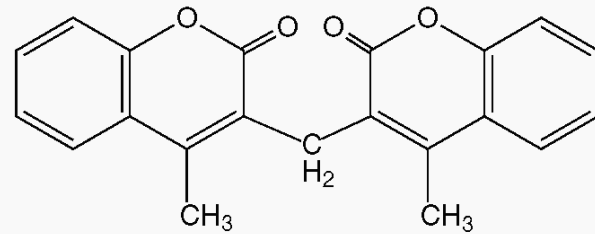


Βιταμίνη K

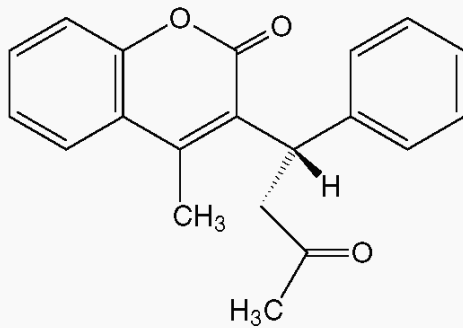
Δικουμαρόλη μιμείται την δομή της βιταμίνης K παράγεται από μύκητα που μεγαλώνει στο τριφύλλι

θανατηφόρος αιμορραγική ασθένεια στα βοοειδή (αλλά και κλινικά ως αντιπηκτικό)

Η δικουμαρόλη (όπως και η γουαρφαρίνη) σχηματίζουν μη φυσιολογική ΠΘρ βοήθησαν στην μελέτη του μηχανισμού πήξης



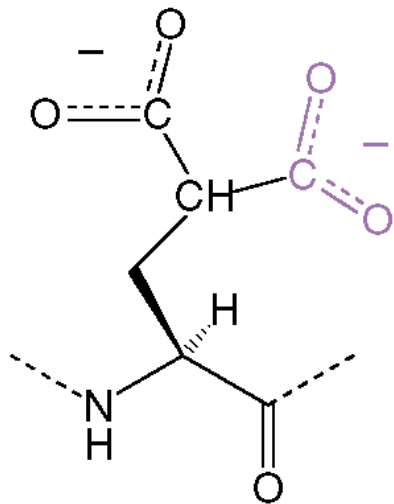
Δικουμαρόλη



Γουαρφαρίνη

ΕΙΚΟΝΑ 10.42 Δομές της βιταμίνης K και δύο ανταγωνιστών, της δικουμαρόλης και της γουαρφαρίνης.

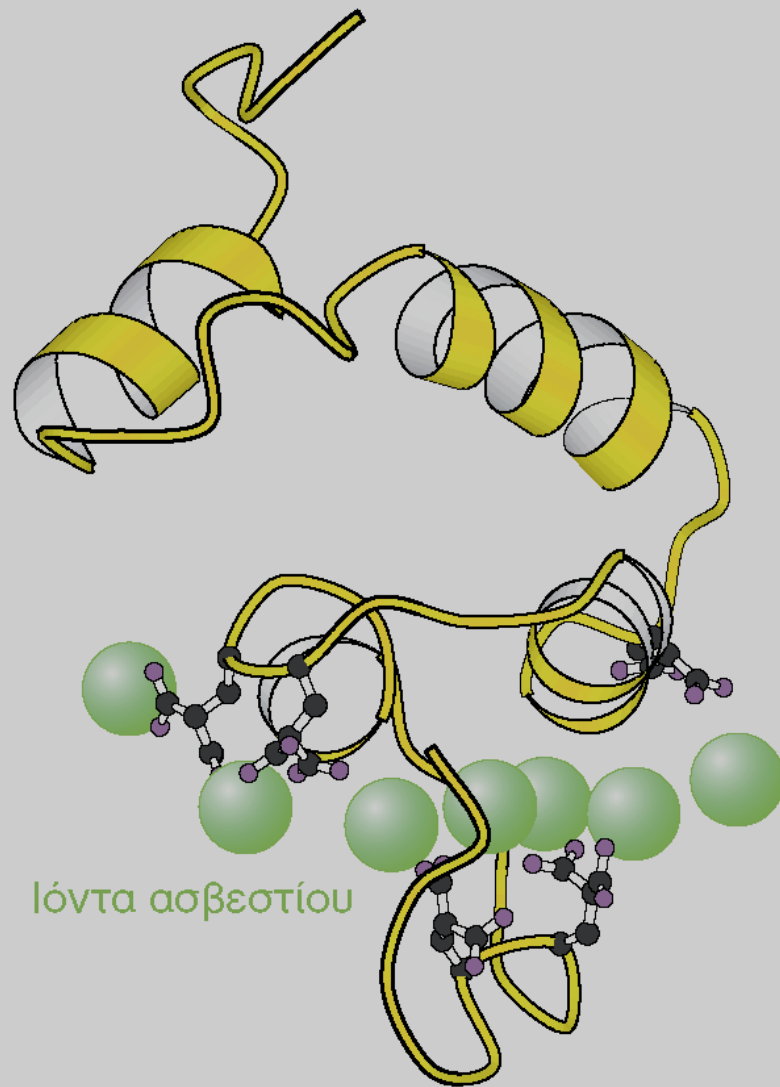
Η μη φυσιολογική **προθρομβίνη** (Πθρ) έχει τα ίδια αμινοξέα με την φυσιολογική (ανάλυση αμινοξέων δεν δείχνει διαφορές)  
Η φυσιολογική έχει καρβοξυγλουταμινικού (κργλ) αντί για γλουταμινικό



Κατάλοιπο  $\gamma$ -καρβοξυγλουταμινικού

Για την σύνθεση καρβοξυγλουταμινικού χρειάζεται **βιταμίνη K**

Το κργλ προσδένει  $\text{Ca}^{2+}$  τα οποία ακινητοποιούν την Πθρ στα Φωσφολιπίδια από τις μεμβράνες των αιμοπεταλίων και έτσι βρίσκεται κοντά στις δυο πρωτεΐνες της πήξης (που την μετατρέπουν σε θρομβίνη)



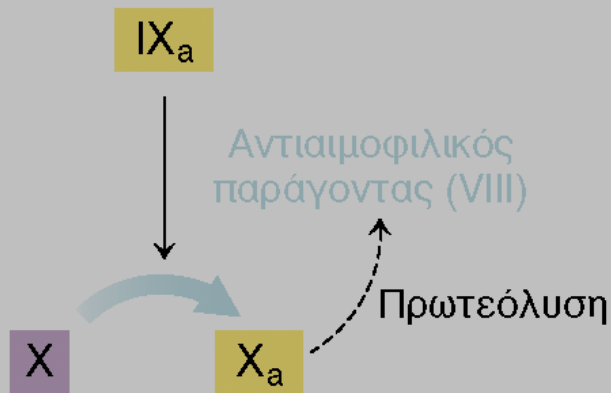
**ΕΙΚΟΝΑ 10.43** Η περιοχή πρόσδεσης ασβεστίου της προθρομβίνης. Η προθρομβίνη προσδένει το ασβέστιο με το τροποποιημένο  $\gamma$ -καρβοξυγλουταμινικό οξύ.

Πολλοί μηχανισμοί και βιοχημικοί παράγοντες ανακαλύφθηκαν από παθολογικές καταστάσεις



Η αιμοφιλία αποκάλυψε ένα πρώιμο βήμα στην πήξη (παράγοντας VIII)

Στην κλασική αιμοφιλία ο παράγοντας VIII απουσιάζει ή έχει μειωμένη δραστικότητα



**ΕΙΚΟΝΑ 10.44 Δράση του αντιαιμοφιλικού παράγοντα.** Ο αντιαιμοφιλικός παράγοντας (VIII) διεγείρει την ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον παράγοντα IX<sub>a</sub>. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η δραστικότητα του παράγοντα VIII αυξάνεται αξιοσημείωτα με περιορισμένη πρωτεόλυση από τη θρομβίνη και τον παράγοντα X<sub>a</sub>. Αυτή η θετική επανατροφοδότηση ενισχύει το σήμα της πήξης και επιταχύνει τον σχηματισμό του θρόμβου αφού έχει φθάσει στο ανώτατο όριο.

Στο παρελθόν οι αιμοφιλικοί νοσηλεύονταν με μεταγγίσεις πλάσματος (μολύνσεις AIDS, ηπατίτιδα)  
Σήμερα ο παράγοντας VIII προέρχεται από ανασυνδεδεμένο DNA του που εκφράζεται σε κυτταροκαλλιέργειες

## Η πορεία της πήξης πρέπει να ρυθμίζεται επακριβώς



Μεταξύ αιμορραγίας και θρόμβωσης υπάρχει μικρή απόσταση

Ο σχηματισμός θρόμβου πρέπει να περιοριστεί μόνο στο σημείο του τραύματος

Οι παράγοντες πήξης έχουν μικρή διάρκεια ζωής και αραιώνονται από το αίμα

οι παράγοντες Va και VIIIa πέπτονται από την πρωτεΐνη C η οποία ενεργοποιείται από την δράση της **θρομβίνης**

Η θρομβίνη έτσι έχει διπλή λειτουργία

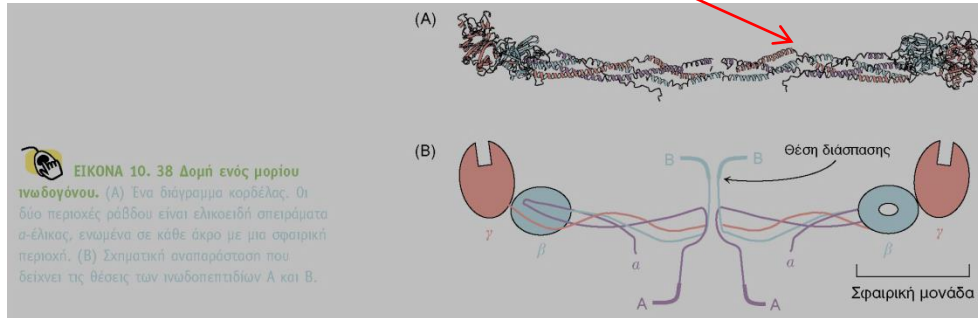
Η θρομβίνη ενεργοποιεί τον σχηματισμό του ινώδους και συγχρόνως δίνει το έναυσμα για απενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης

**Πολύ συχνά μια πορεία ξεκινά συγχρόνως και την αντίθετη πορεία που αποκαθιστά την αρχική κατάσταση.**

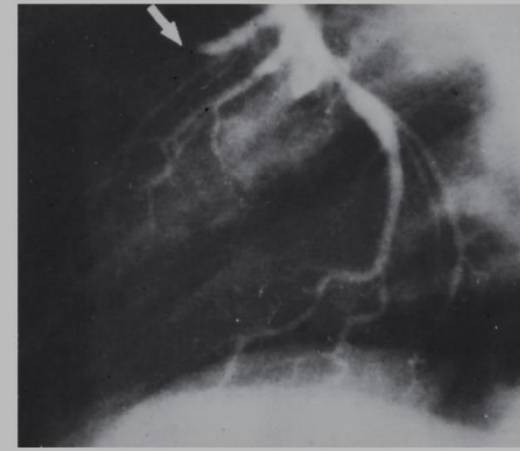
**Οι θρόμβοι δεν είναι μόνιμες δομές πρέπει (είναι σχεδιασμένοι) να διαλύονται (μετά την αποκατάσταση των κατεστραμμένων ιστών)**

**Το ινώδες διαχωρίζεται από την πλασμίνη**

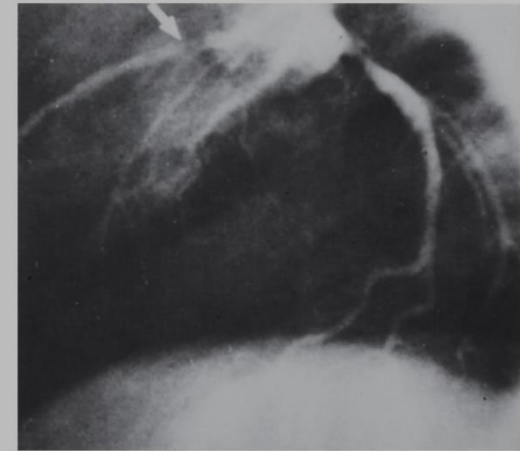
Υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς στην τρίτη έλικα της συνδετικής ράβδου



(Α)



(Β)



Η πλασμίνη σχηματίζεται από πρωτεολυτική υδρόλυση του **πλασμινογόνου**  
Ανενεργό πρόδρομο με μεγάλη συγγένεια με τους θρόμβους ινώδους

Η μετατροπή επιτελείται από τον **ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (TPA)**

Αλλά υπάρχει και επιπλέον βήμα έλεγχου

Ο TPA όταν είναι συνδεδεμένος με τους θρόμβους ινώδους γρήγορα ενεργοποιεί το πλασμινογόνο αντίθετα ενεργοποιεί πολύ αργά το ελεύθερο

Ανακαλύπτοντας τον μοριακό μηχανισμό και τους ενζυμικούς παράγοντες μπόρεσε να βρεθεί θεραπεία για την **καρδιακή προσβολή (διάλυση θρόμβων)**

**ΕΙΚΟΝΑ 10.47** Το αποτέλεσμα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Ο TPA οδηγεί στη διάλυση των θρόμβων του αίματος, όπως φαίνεται από τις εικόνες με ακτίνες X των στεφανιαίων αγγείων (Α) πριν και (Β) ώρες μετά τη χορήγηση του TPA. Η θέση του θρόμβου σημειώνεται με το βέλος στο μέρος Α. [Κατά F. Van de Werf, P. A. Ludbrook, S. R. Bergmann, A. J. Tiefenbrunn, K. A. A Fox, H. De Geest, M. Verstraete, D. Collen, και B. E. Sobel. *New Engl. J. Med.* 310(1984):609.]