



ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΔΚ0403

Ενότητα 2: Λειτουργία Πρωτεϊνών και Κατάλυση

Λίγα παραπάνω λόγια για χαρακτηριστικά οξέων



$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+(\text{aq})][\text{HO}^-(\text{aq})]}{[\text{H}_2\text{O}(\text{l})]}$$

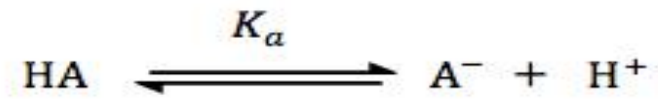
55.55 M

$$K_{\text{eq}}[\text{H}_2\text{O}(\text{l})] = K_w = [\text{H}^+(\text{aq})][\text{HO}^-(\text{aq})]$$

$$K_w = 1.0 \times 10^{-14}$$

$$\text{pH} = \log(1/[\text{H}^+]) = -\log[\text{H}^+]$$

$$\text{p}K_a = \log(1/K_a) = -\log K_a$$



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\log_{10} K_a = \log_{10} [\text{H}^+] + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$-\text{p}K_a = -\text{pH} + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

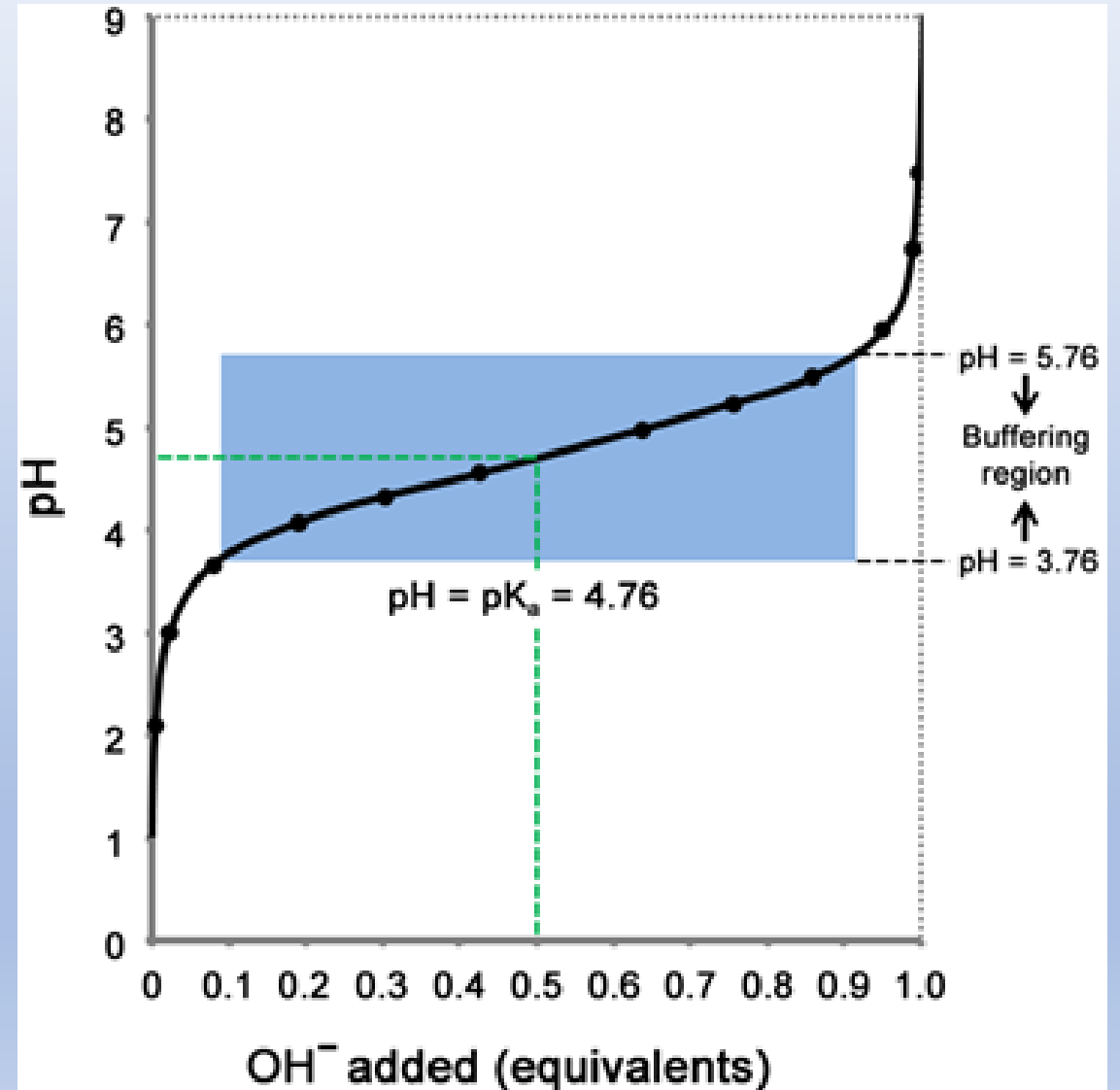
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1)$$

Henderson-Hasselbach

Πως καταλαβαίνουμε πόσο όξινο είναι ένα διάλυμα (συγκέντρωση οξέος)?

Με ογκομετρική ανάλυση (titration curves), προσθέτοντας γνωστής συγκέντρωσης διαλύματος βάσης (NaOH) και μετρώντας το pH

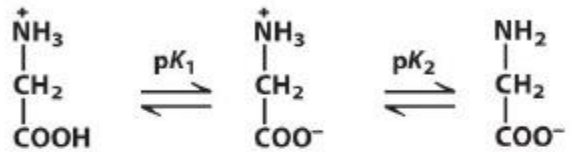
Titration curve: Γράφημα pH με [NaOH] που προστίθεται



Τα αμινοξέα έχουν χαρακτηριστικά titration curves (πχ. γλυκίνη)

Titration curves of amino acids; prediction of the electric charge of amino acids

Titration curve of 0.1M glycine at 25°C. Blue boxes show the regions of greatest buffering power

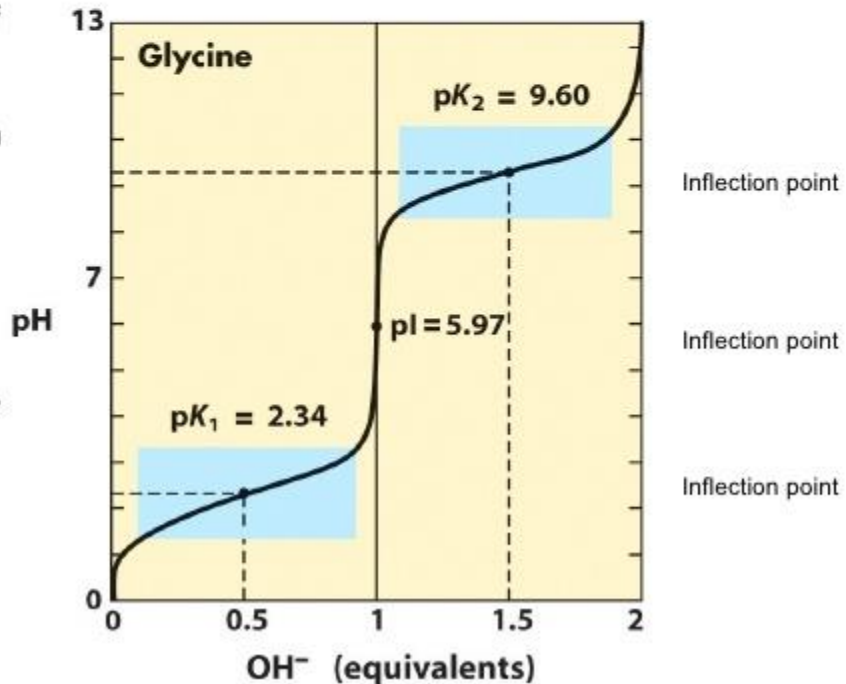


A quantitative measure of the pKa of the amino acid

Note there are 2 regions of buffering

Not a good buffer at Physiological pH

Isoelectric Point: pI, the Characteristic pH at which The net charge of a Compound is 0.



- Σε πολύ χαμηλό pH, η γλυκίνη είναι πλήρως πρωτονιωμένη (είναι στην NH₃-CH₂-COOH βασική μορφή)
- Στο μέσο pH (ισοηλεκτρικό σημείο, pI* ;όπου net charge είναι 0), βρίσκεται και στις 2 μορφές σε ίδιες συγκεντρώσεις, καθώς χάνει το ένα πρωτόνιο στα μισά της μόρια
- Σε υψηλό pH, δρα ως οξύ, καθώς χάνει και δεύτερο πρωτόνιο από την αμμωνία.

Λειτουργία Πρωτεϊνών

- αμφίδρομη δέσμευση άλλων μορίων (συνδετών/ ligands) στη θέση πρόσδεσης (binding site)
- Η αλληλεπίδραση συνδέτη/ θέσης πρόσδεσης είναι αρκετά ειδική (specific)
- Οι πρωτεΐνες είναι εύκαμπτες, δόνηση αμινοξέων κατά την πρόσδεση και αλλαγή δομής (conformational change)

Επαγόμενο ταίριασμα (induced fit): όταν κατά την πρόσδεση του συνδέτη, αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης ώστε να μπορεί να συγκρατήσει τον συνδέτη στενότερα συνδεδεμένο

Ένζυμα: καταλύουν αντιδράσεις. Δρουν σε υποστρώματα (substrates) που δένουν στο καταλυτικό (ενεργό) κέντρο του ενζύμου

Δουλεύοντας με πρωτεΐνες...

Οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν, να διαχωριστούν και να καθαριστούν

Το κάθε κύτταρο περιέχει χιλιάδες πρωτεΐνες, πως μπορούμε να απομονώσουμε 1 μόνο?

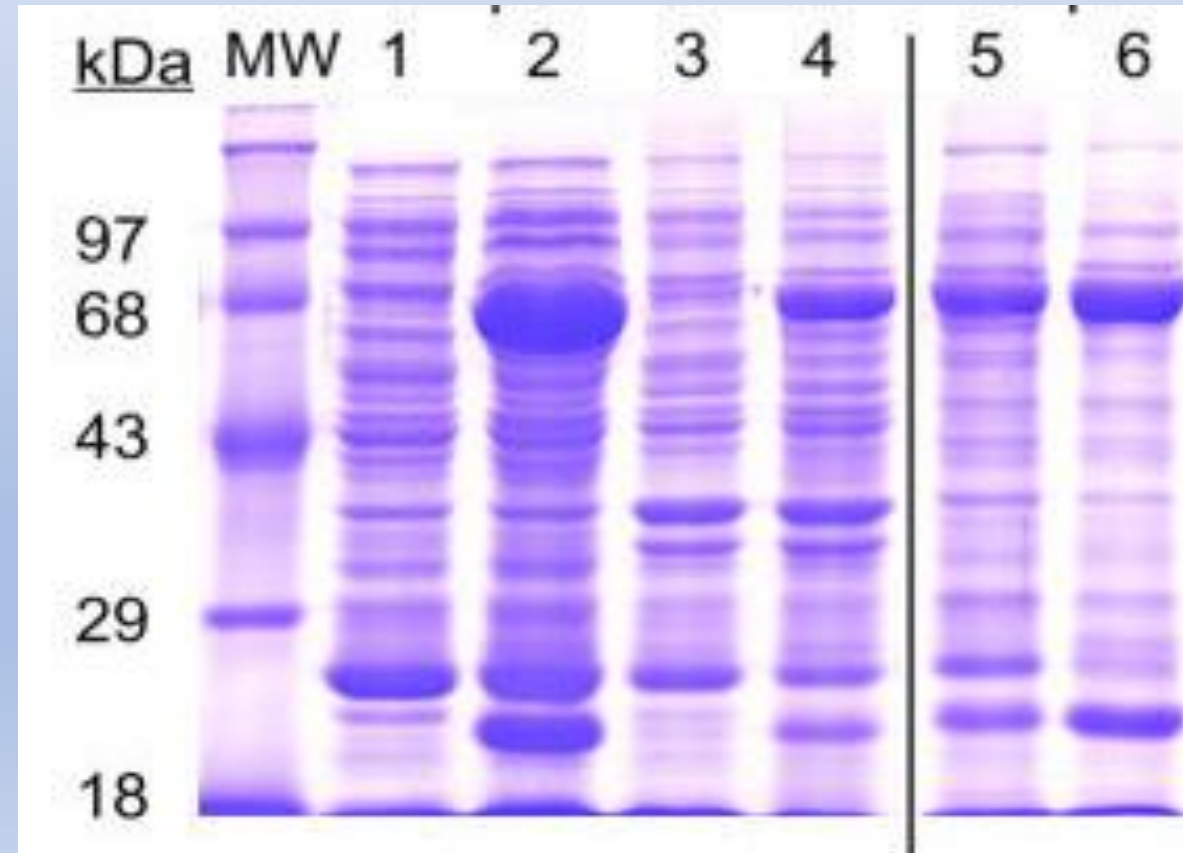
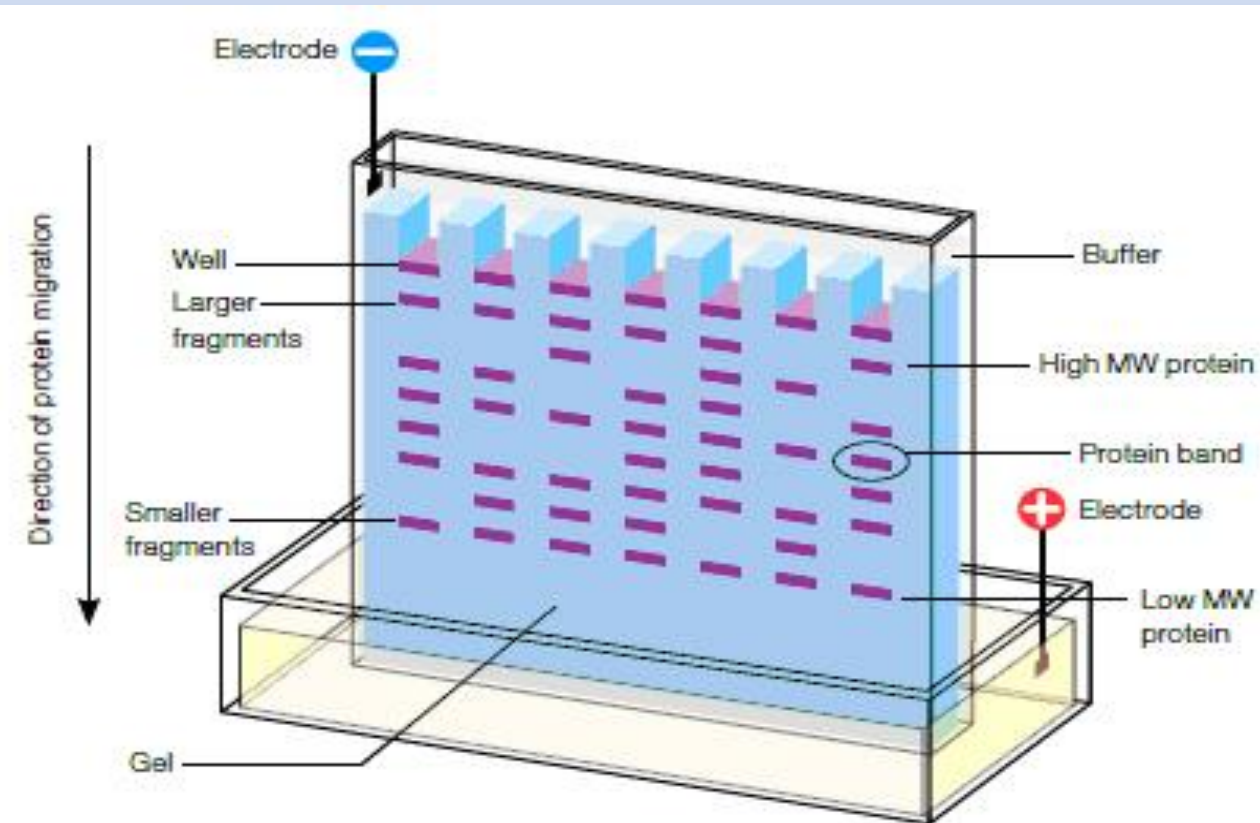


Fractionation (κλασματοποίηση) με χρωματογραφία (πχ στυλου) με βάση το σθένος ή το μέγεθος ή τους συνδέτες

Extraction buffer



Διαχωρισμός (SDS) και ηλεκτροφόρηση



Ένζυμα

- Υπερβολικά εξειδικευμένες πρωτεΐνες
- Ισχυρή καταλυτική δύναμη, περισσότερη απο καθε αλλο ανοργανο καταλύτη
- Εμπλέκονται σε κάθε βιοχημικό μονοπάτι, είτε καταβολικό ή αναβολικό
- Τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεΐνες
- Για να δρουν πολλά χρειάζονται **συμπαράγοντα (cofactor)**, πχ Fe^{2+} , Mg^{2+} ή **συνένζυμα (coenzymes)** (μεταλο-οργανικά μόρια). Αυτά ονομάζονται προσθετικές ομάδες.

Ένζυμο + προσθετικές ομάδες = ολοένζυμο (πλήρως ενεργό)

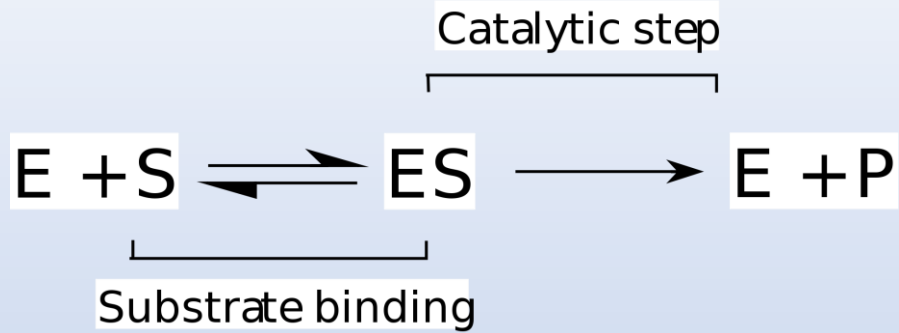
Ένζυμο - προσθετικές ομάδες = αποένζυμο (ανενεργό)

- Κάποια ένζυμα φωσφορυλιώνονται ή γλυκοζυλιώνονται

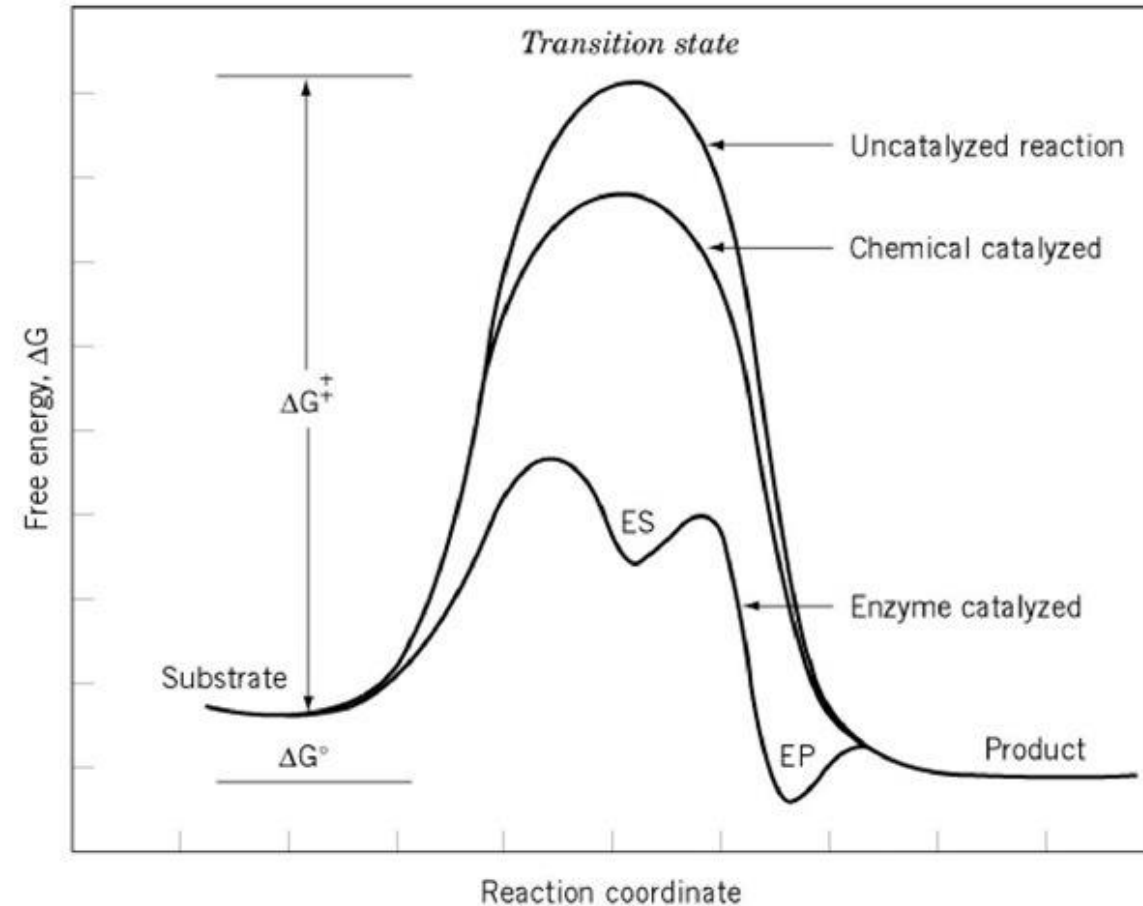
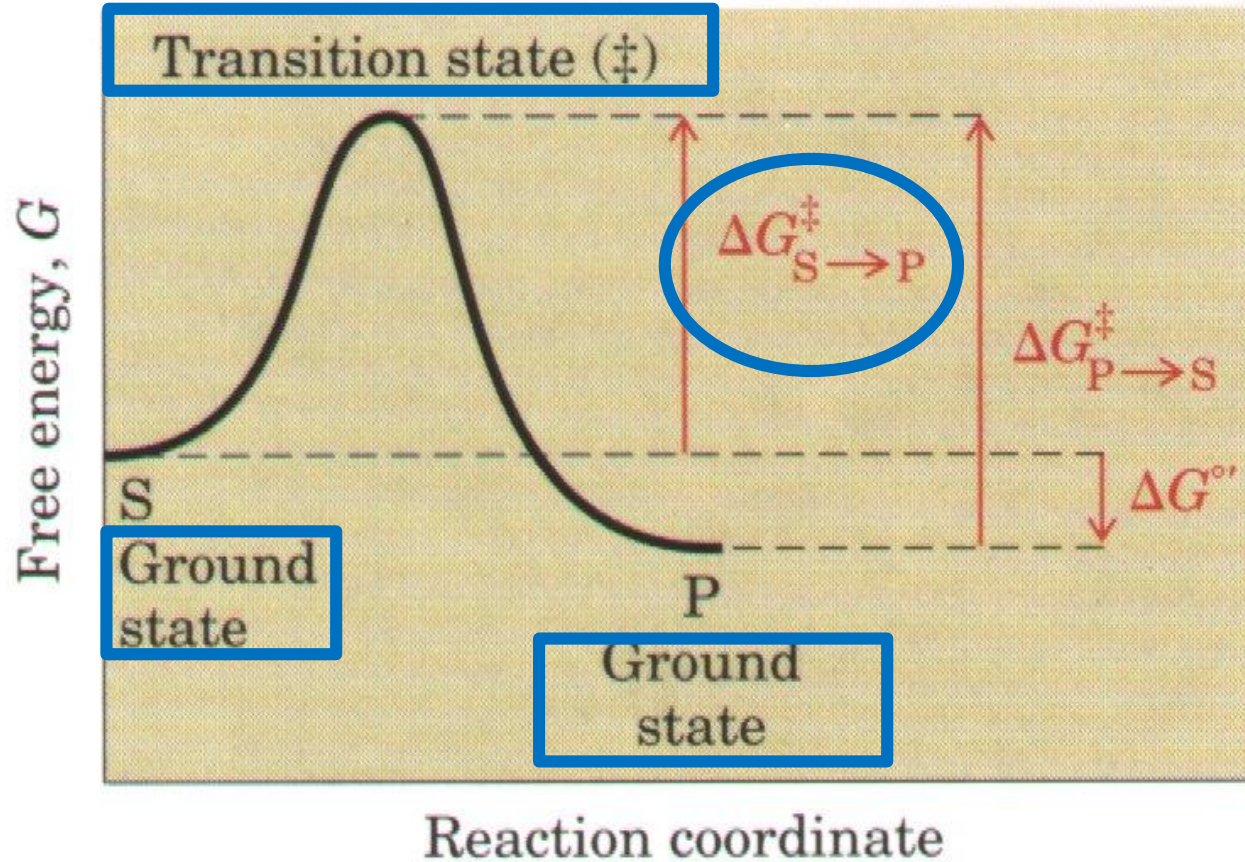
CLASSIFICATION OF ENZYMES

Group of Enzyme	Reaction Catalysed	Examples
1. Oxidoreductases	Transfer of hydrogen and oxygen atoms or electrons from one substrate to another.	Dehydrogenases Oxidases
2. Transferases	Transfer of a specific group (a phosphate or methyl etc.) from one substrate to another.	Transaminase Kinases
3. Hydrolases	Hydrolysis of a substrate.	Estrases Digestive enzymes
4. Isomerases	Change of the molecular form of the substrate.	Phospho hexo isomerase, Fumarase
5. Lyases	Nonhydrolytic removal of a group or addition of a group to a substrate.	Decarboxylases Aldolases
6. Ligases (Synthetases)	Joining of two molecules by the formation of new bonds.	Citric acid synthetase

Τα ένζυμα επηρεάζουν τον ρυθμό μιας αντίδρασης, όχι την ισορροπία



απο ενεργειακή σκοπιά:



- Οι καταλύτες επιταχύνουν αντιδράσεις μειώνοντας τις ενέργειες ενεργοποίησης

- Αν μια αντίδραση για να ολοκληρωθεί, περιλαμβάνει διάφορες επιμερους αντιδρασεις, τότε ο ρυθμος της αντιδρασης οριζεται απο την επιμερους αντιδραση που εχει την υψηλοτερη ενεργεια ενεργοποιησης [rate-limiting step]

$$K_{eq} = [P]/[S]$$

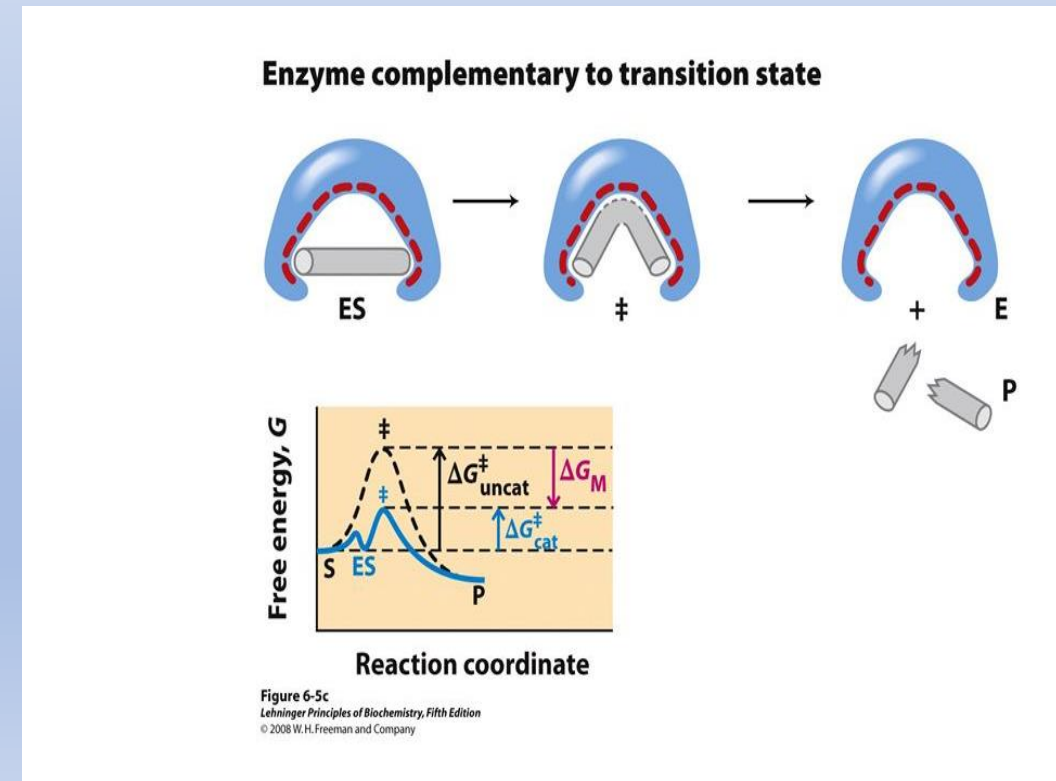
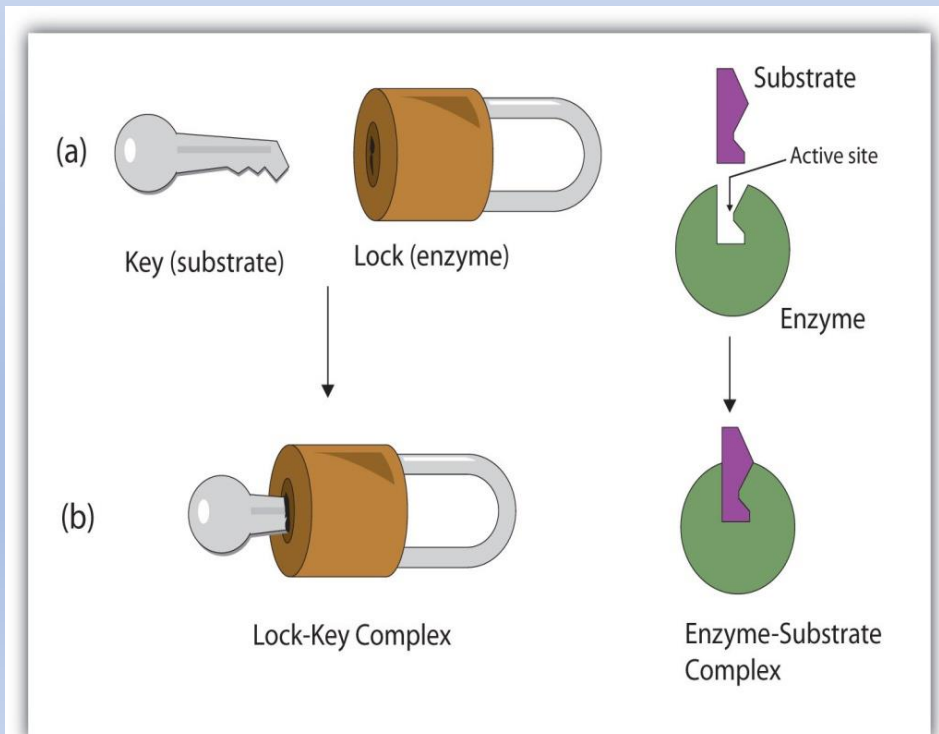
$$V = k [S] [S_2] [S_{...n}]$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

Πως επιτυγχάνεται η κατάλυση (μείωση ενέργειας ενεργοποίησης)?

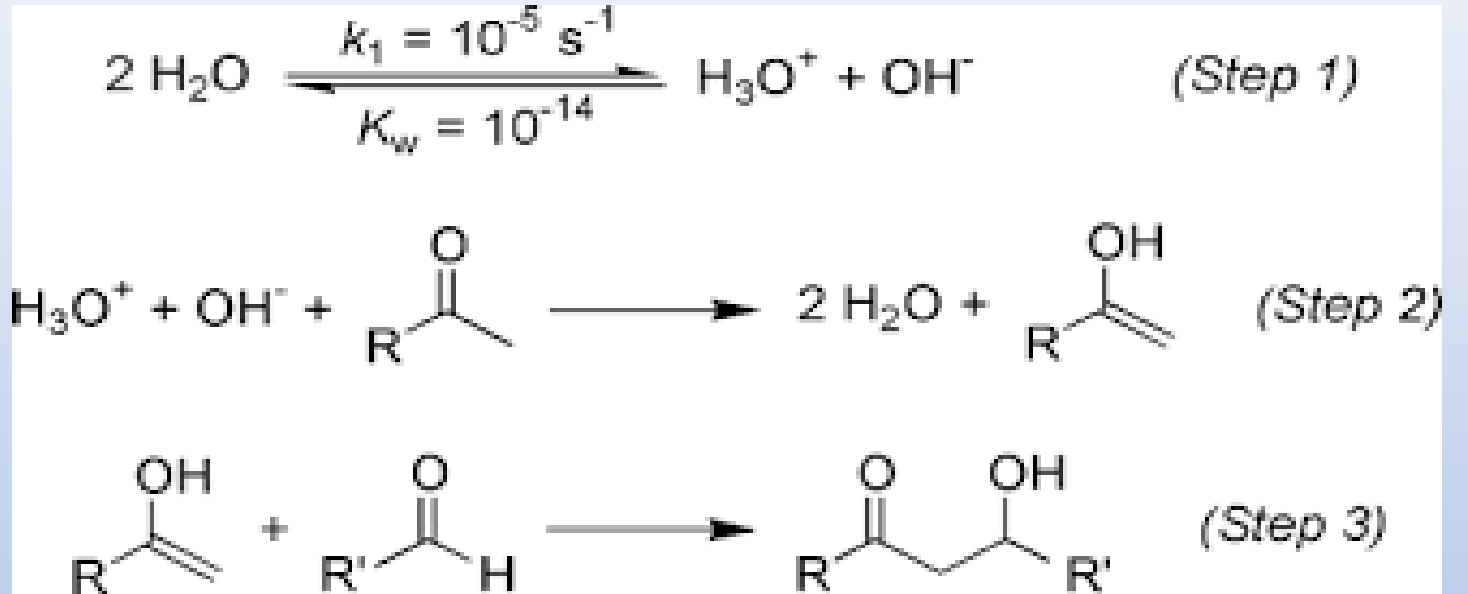
1. Αναδιαμόρφωση ομοιοπολικών δεσμών – αλληλεπίδραση υποστρώματος με την λειτουργική ομάδα του ενζύμου (πχ. συνένζυμο ή μεταλλικό ιόν) που οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου

2. Μη ομοιοπολικές (weak) αντιδράσεις μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος οι οποίες ελευθερώνουν μικρό ποσό ενέργειας – ΔG_B (binding energy), φέρνοντας το υπόστρωμα σε transition state (μεταβατική κατάσταση)

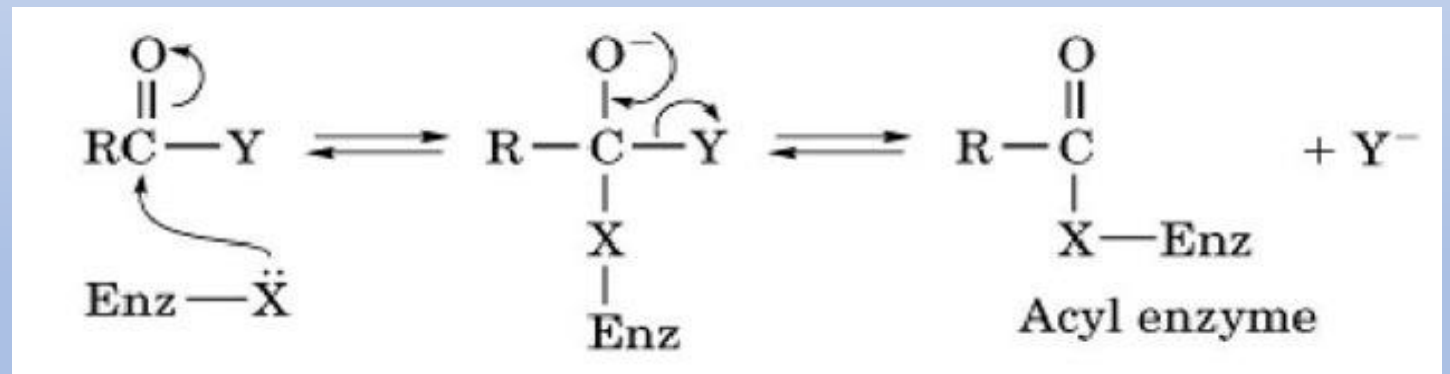


Καταλυτικές ομάδες που συμβάλλουν στην κατάλυση

1. Κατάλυση οξέος-βάσης –
μεταφορά H^+ επιταχύνει μια αντίδραση



2. Ομοιοπολική κατάλυση –
αφορά δημιουργία παροδικών (transient) ομοιοπολικών δεσμών

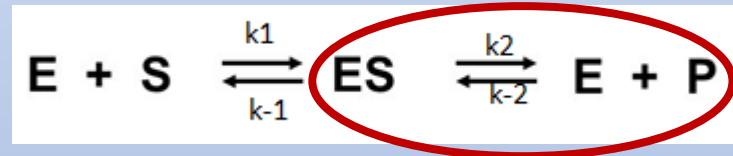
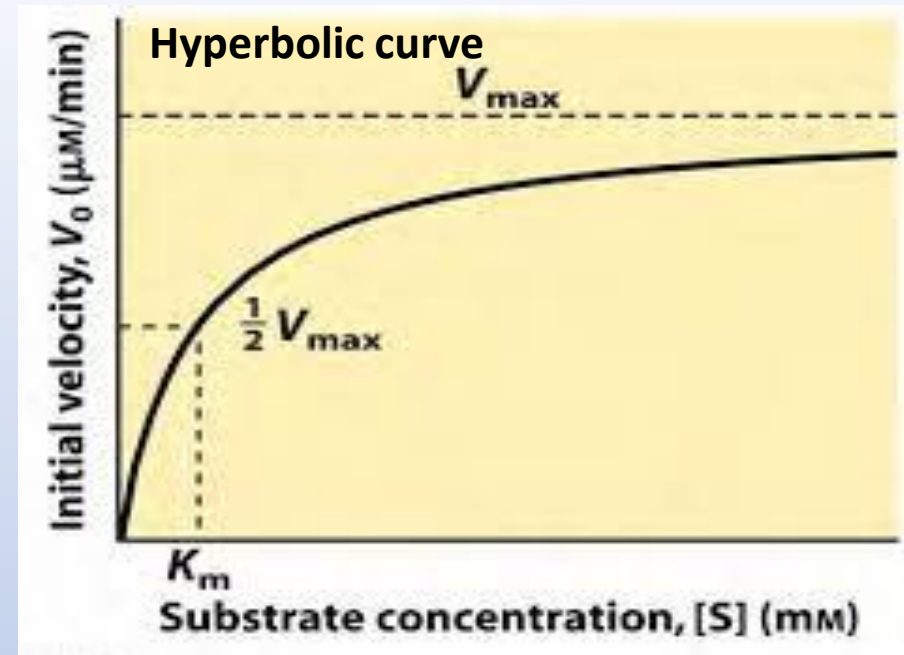


3. Κατάλυση με μεταλλικά ιόντα – ιονικοί δεσμοί αναδιοργανώνουν τα μόρια ώστε να μπορούν να αντιδράσουν ταχύτερα (σταθεροποιούν τη μεταβατική κατάσταση)

Ενζυμική κινητική (kinetics)

1. Η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζει την ταχύτητα της ενζυμικά-καταλυόμενης αντίδρασης

2. Το rate limiting step είναι αυτό που επιβραδύνει την overall αντίδραση, άρα η δεύτερη επιμέρους αντίδραση



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

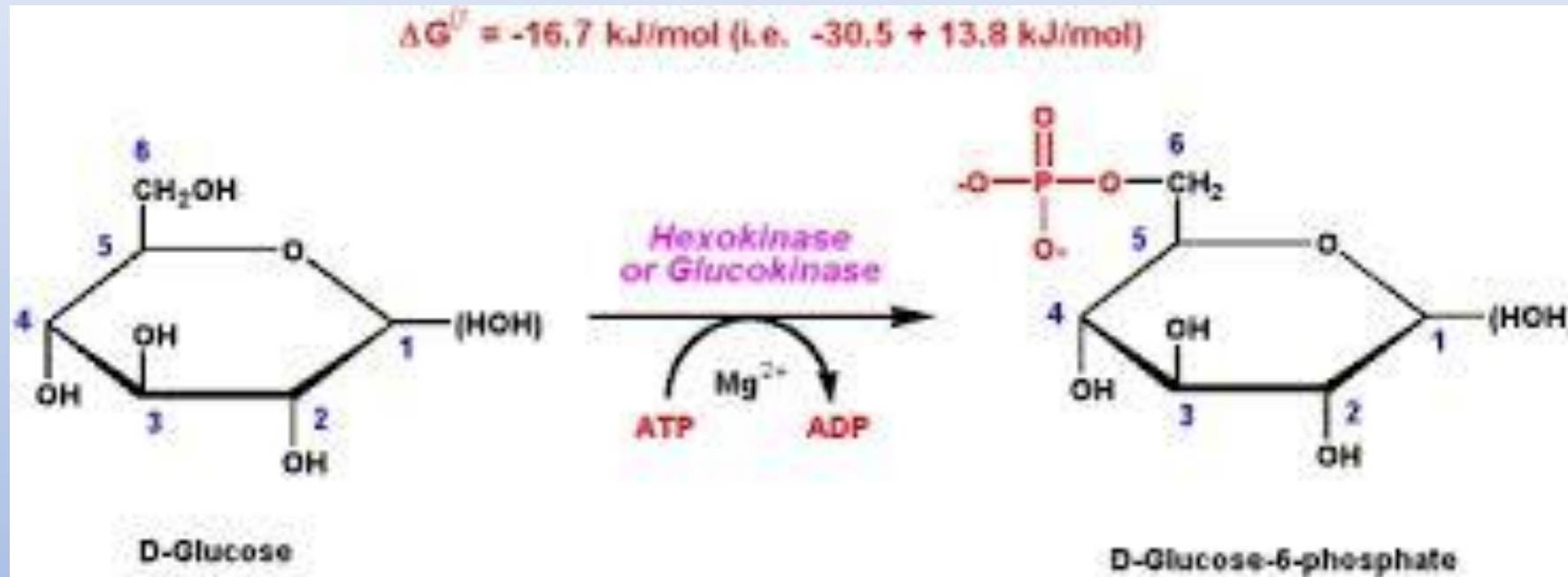
Michaelis-Menten εξίσωση

$$\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \equiv K_M$$

σταθερά Michaelis

Ένζυμα με 2 ή περισσότερα υποστρώματα

πχ. εξοκινάση (1^ο γλυκολυτικό ένζυμο), υποστρώματα ATP και γλυκόζη



Επίσης υπακούουν στην Michaelis-Menten κινητική

Η εξοκινάση έχει 2 K_m , μια για κάθε υπόστρωμα

Αναστολή Ενζύμων

- Η δράση των ενζύμων μπορεί να ανασταλθεί
- Η αναστρεπτή αναστολή (reversible inhibition) μπορεί να είναι:

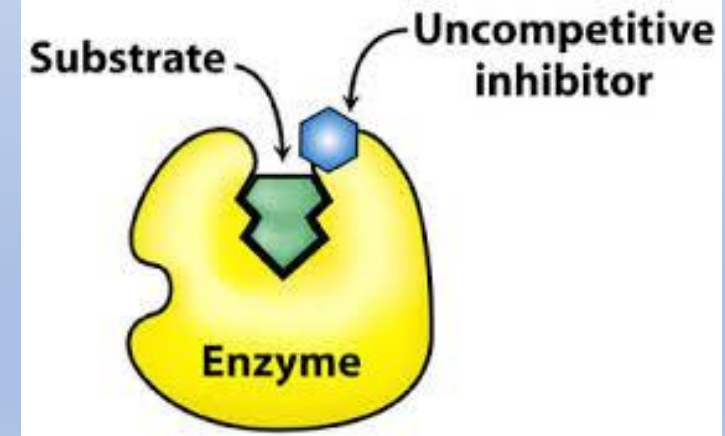
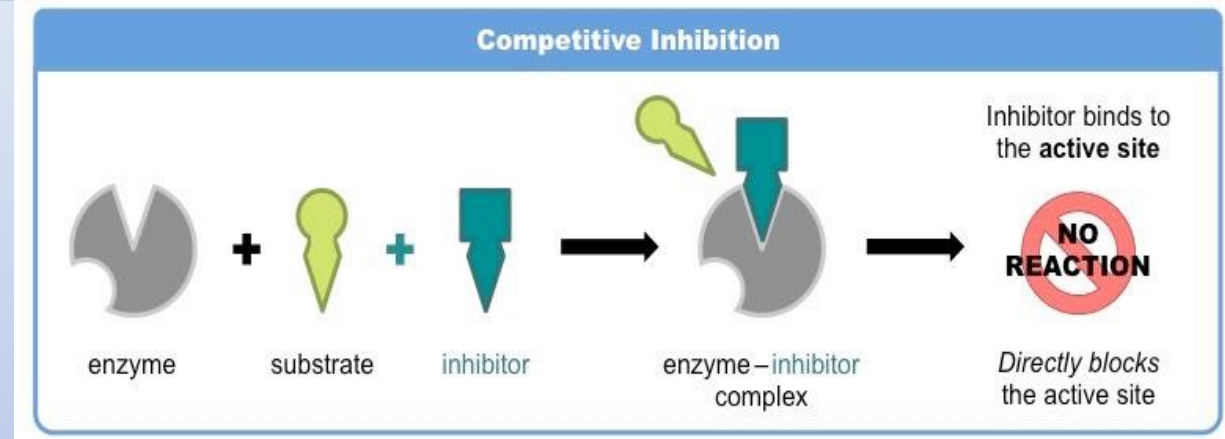
1. Competitive (ανταγωνιστική)

– ο αναστολέας ανταγωνίζεται το υπόστρωμα για την ενεργή θέση του ενζύμου

2. Uncompetitive – ο

αναστολέας δένει στο ένζυμο αλλά όχι στο ενεργό του κέντρο

3. Mixed (μικτή) – ο αναστολέας δένει στο ένζυμο αλλά όχι στο ενεργό του κέντρο ή και στο ES σύμπλεγμα



- Η μη αναστρεπτή αναστολή (irreversible inhibition) περιλαμβάνει μόνιμη δυσλειτουργία στο ένζυμο (πχ. Καταστροφή μιας ενεργής ομάδας)

Ρυθμιστικά Ένζυμα

- Στις αλυσιδωτές αντιδράσεις (chain reactions) υπάρχει **1** ένζυμο που ρυθμίζει τον ρυθμό παραγωγής του τελικού προϊόντος, καθώς καταλύει την πιο αργή (**rate-limiting**) αντίδραση
- Αυτό το ένζυμο λέγεται **ρυθμιστικό** και συνήθως είναι αυτό που καταλύει την 1^η αντίδραση
- Η καταλυτική ικανότητα του ρυθμιστικού ενζύμου επιδέχεται τροποποίηση, δρώντας λιγότερο ή περισσότερο καταλυτικά, και έτσι λέγεται **αλλοστερικό ένζυμο**

αλλοστερικό ένζυμο

Ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται όταν δένεται ένας αλλοστερικός ρυθμιστής (πχ. μια πρωτεΐνη ή ενεργή ομάδα πχ φώσφορος από κινάσες)

Ενεργοποιείται όταν ένα μέρος του κόβεται πρωτεολυτικά (πχ τρυψίνη στομάχου)

Feedback inhibition: όταν συσσωρεύεται το προϊόν της αντίδρασης όπου το αλλοστερικό ένζυμο δρά, το προϊόν δρα αυτόματα ως αλλοστερικός αναστολέας, αναστέλλοντας περαιτέρω παραγωγή προϊόντος

Διαφορετική κινητική από Michaelis – Menten (sigmoidal curve)

SIGMOID CURVE OF ALLOSTERIC ENZYME:

Allosteric Enzyme Kinetics: Sigmoid Curve instead of Hyperbola.

