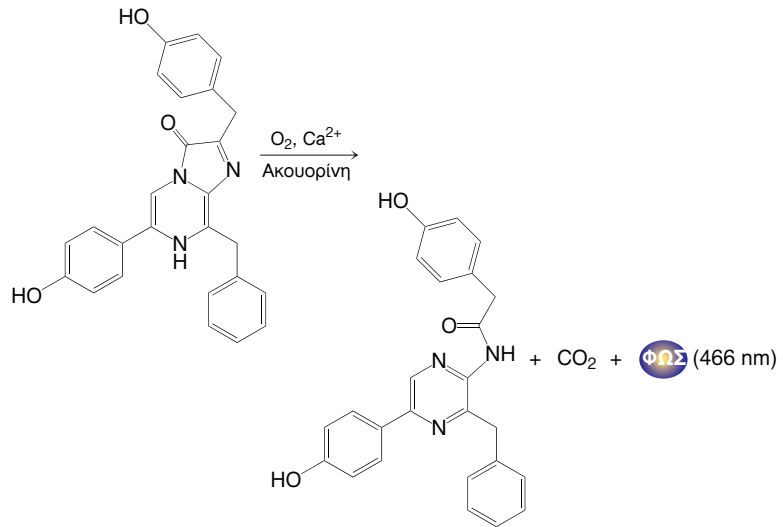


# Ένζυμα: Βασικές αρχές και κινητική



Η δραστηριότητα ενός ενζύμου είναι υπεύθυνη για τη λάμψη της φωταγούς μέδουσας (αριστερά). Το ένζυμο ακουορίνη καταλύει την οξείδωση μιας ένωσης από το οξυγόνο, με την παρουσία ασβεστίου, για να απελευθερώσει CO<sub>2</sub> και φως. [(Αριστερά) Fred Bavendam/Peter Arnold.]

Τα ένζυμα, οι καταλύτες των βιολογικών συστημάτων, είναι αξιοθαύμαστα μόρια που προσδιορίζουν τον τρόπο των χημικών μετασχηματισμών και μεσολαβούν στον μετασχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική ισχύς και η εξειδίκευσή τους. Η κατάλυση λαμβάνει χώρα σε μια ιδιαίτερη περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο. Σχεδόν όλα τα γνωστά ένζυμα είναι πρωτεΐνες. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες δεν έχουν το μονοπώλιο της κατάλυσης. Η ανακάλυψη των καταλυτικά ενεργών μορίων RNA παρέχει τις αναγκαίες ενδείξεις ότι το RNA ήταν ένας από τους πρώτους βιοκαταλύτες (Εδάφιο 2.2.2).

Οι πρωτεΐνες, ως μια τάξη μακρομορίων, καταλύουν πολύ αποτελεσματικά διάφορες χημικές αντιδράσεις λόγω της ικανότητάς τους να προσδένουν εξειδικευμένα μια ευρεία τάξη μορίων. Τα ένζυμα, χρησιμοποιώντας ολόκληρο το απόθεμα των ενδομοριακών τους δυνάμεων, φέρνουν μαζί τα υποστρώματα σε έναν άριστο προσανατολισμό, που είναι η προετοιμασία για τον σχηματισμό και τη διάσπαση χημικών δεσμών. Τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις με το να σταθεροποιούν τις μεταβατικές καταστάσεις, τις υψηλότερες ενεργειακά στερεοδιατάξεις στις πορείες των αντιδράσεων. Ένα ένζυμο, με το να σταθεροποιεί επιλεκτικά μια μεταβατική κατάσταση, προσδιορίζει ποια από τις αντιδράσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν όντως λαμβάνει χώρα.

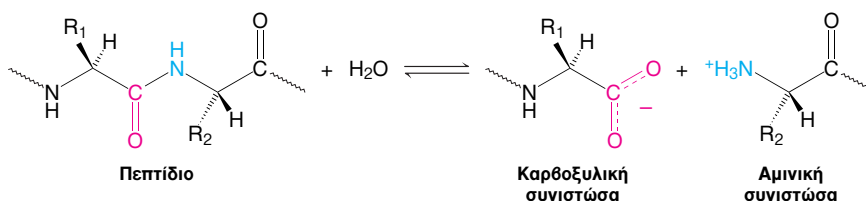
## ΠΕΡΙΓΡΑΦΑ

- 8.1 Τα ένζυμα είναι ισχυροί και σε μεγάλο βαθμό εξειδικευμένοι καταλύτες
- 8.2 Η ελεύθερη ενέργεια είναι μια χρήσιμη θερμοδυναμική συνάρτηση για την κατανόηση των ενζύμων
- 8.3 Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις διευκολύνοντας τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης
- 8.4 Το μοντέλο Michaelis-Menten εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων
- 8.5 Τα ένζυμα είναι δυνατόν να ανασταλούν από ειδικά μόρια
- 8.6 Οι βιταμίνες είναι συχνά πρόδρομες ενώσεις των συνενζύμων

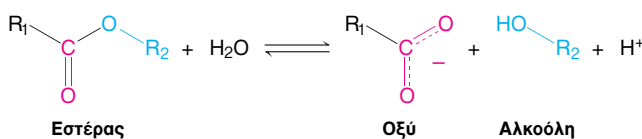
## 8.1 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΕΙΝΑΙ ΙΣΧΥΡΟΙ ΚΑΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΒΑΘΜΟ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις κατά ένα εκατομμύριο φορές ή περισσότερο (Πίνακας 8.1). Πράγματι, στα βιολογικά συστήματα οι περισσότερες αντιδράσεις δεν γίνονται καν σε αντιληπτή ταχύτητα χωρίς την παρουσία ενζύμων. Ακόμη και μια απλή αντίδραση, όπως είναι η ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα, καταλύεται από ένα ένζυμο, την ανθρακική ανυδράση (Υποκεφάλαιο 9.2). Η μεταφορά του CO<sub>2</sub> από τους ιστούς στο αίμα και στη συνέχεια στον κυψελιδικό αέρα χωρίς το ένζυμο αυτό δεν θα ήταν πλήρης. Στην πραγματικότητα, η ανθρακική ανυδράση είναι ένα από τα ταχύτερα ένζυμα που γνωρίζουμε. Κάθε μόριο ενζύμου μπορεί να ενυδατώνει 10<sup>6</sup> μόρια CO<sub>2</sub> ανά δευτερόλεπτο. Η αντίδραση που καταλύεται είναι 10<sup>7</sup> φορές ταχύτερη από εκείνη που δεν καταλύεται. Θα μελετήσουμε τον μηχανισμό κατάλυσης της ανθρακικής ανυδράσης στο Κεφάλαιο 9. Τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων, που ονομάζονται *υποστρώματα*. Ένα ένζυμο καταλύει συνήθως μια απλή χημική αντίδραση ή μια σειρά από πολύ συγγενικές αντιδράσεις. Στις ενζυμικές αντιδράσεις σπανίως συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις που οδηγούν στον άχρηστο σχηματισμό παραπροϊόντων, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις που δεν καταλύονται.

Ας πάρουμε ως παράδειγμα τα *πρωτεολυτικά ένζυμα*. Τα ένζυμα αυτά, *in vivo*, καταλύουν την *πρωτεϊνόλυση*, την υδρόλυση ενός πεπτιδικού δεσμού.



Τα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα καταλύουν επίσης την υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού, *in vitro*, που είναι μια διαφορετική αλλά σχετική αντίδραση. Τέτοιες αντιδράσεις παρακολουθούνται πιο εύκολα από ό,τι η πρωτεϊνόλυση και είναι χρήσιμες στην πειραματική έρευνα των ενζύμων αυτών.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.1** Αύξηση ταχύτητας από επιλεγμένα ένζυμα.

Ένζυμο	Μη ενζυμική ημιζωή	Μη καταλυόμενη ταχύτητα ( $k_{un}$ , $s^{-1}$ )	Καταλυόμενη ταχύτητα ( $k_{cat}$ , $s^{-1}$ )	Αύξηση ταχύτητας ( $k_{cat}/k_{un}$ )
Αποκαρβοξυλάση της OMP	78.000.000 χρόνια	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$
Σταφυλοκοκκική νουκλεάση	130.000 χρόνια	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
Νουκλεοζιτάση της AMP	69.000 χρόνια	$1,0 \times 10^{-11}$	60	$6,0 \times 10^{12}$
Καρβοξυπεπτιδάση A	7,3 χρόνια	$3,0 \times 10^{-9}$	578	$1,9 \times 10^{11}$
Ισομεράση των κετοστεροειδών	7 εβδομάδες	$1,7 \times 10^{-7}$	66.000	$3,9 \times 10^{11}$
Ισομεράση των φωσφορικών τριοζών	1,9 ημέρες	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^9$
Μουτάση του χορισμικού	7,4 ώρες	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$
Ανθρακική ανυδράση	5 δευτερόλεπτα	$1,3 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$

Συντομογραφίες: OMP, μονοφωσφορική οροτιδίνη· AMP, μονοφωσφορική αδενοσίνη.  
Πηγή: Κατά A. Radzicka and R. Wofenden. *Science* 267 (1995):90-93.

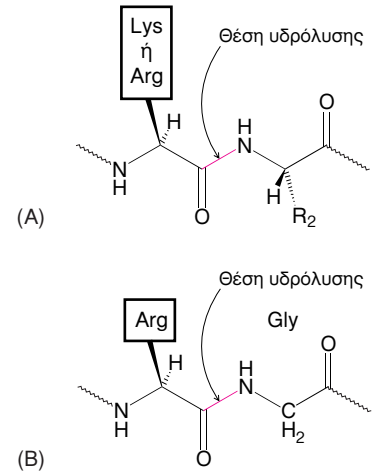
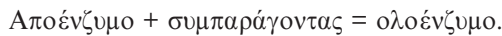
Τα πρωτεολυτικά ένζυμα διαφέρουν σημαντικά στον βαθμό εξειδίκευσης που έχουν ως προς το υπόστρωμα. Η σουμπτυλισίνη, η οποία βρέθηκε σε ορισμένα βακτήρια, δεν κάνει διακρίσεις: θα διασπάσει οποιονδήποτε δεσμό δίνοντας λίγη σημασία στη φύση των παρακείμενων πλευρικών αλυσίδων. Η θρυψίνη, ένα ένζυμο της πέψης, είναι απολύτως εξειδικευμένη στο να καταλύει μόνο τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυ-τελικό άκρο των καταλοίπων της λυσίνης και της αργινίνης (Εικόνα 8-1Α). Η θρομβίνη, ένα ένζυμο που συμμετέχει στην πήξη του αίματος, είναι περισσότερο εξειδικευμένη από τη θρυψίνη. Καταλύει την υδρόλυση των δεσμών Arg-Gly μόνο σε ειδικές αλληλουχίες πεπτιδίων (Εικόνα 8-1Β).

Η DNA πολυμεράση I, ένα ένζυμο που κατευθύνεται από ένα εκμαγείο (Υποκεφάλαιο 27.2), είναι ένας άλλος καταλύτης με υψηλή εξειδίκευση. Προσθέτει νουκλεοτίδια σε μια αλυσίδα DNA που συντίθεται με αλληλουχία η οποία προσδιορίζεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στην άλλη αλυσίδα DNA που χρησιμεύει ως εκμαγείο. Η DNA πολυμεράση I μεταφέρει τις πληροφορίες που δίνονται από το εκμαγείο με αξιοθαύμαστη ακρίβεια. Εισάγει το λάθος νουκλεοτίδιο στη νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα DNA με συχνότητα μικρότερη από ένα σε ένα εκατομμύριο φορές.

Η εξειδίκευση ενός ενζύμου οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου. Η ακρίβεια αυτή είναι αποτέλεσμα της πολύπλοκης τριδιάστατης δομής της ενζυμικής πρωτεΐνης.

### 8.1.1 Πολλά ένζυμα χρειάζονται συμπαραγόντες για δραστηριότητα

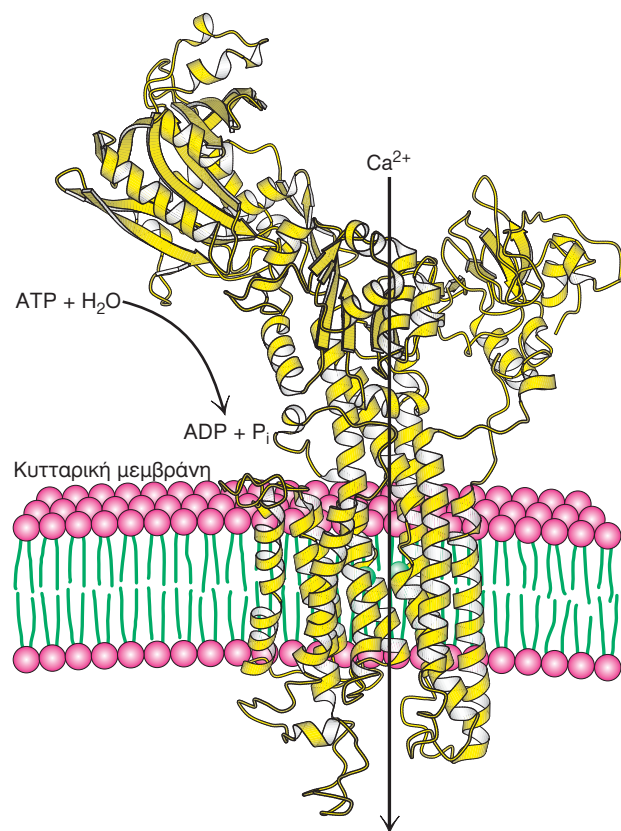
Η καταλυτική δραστηριότητα πολλών ενζύμων εξαρτάται από την παρουσία μικρών μορίων που ονομάζονται *συμπαραγόντες*, αν και ο ακριβής ρόλος ποικίλλει ανάλογα με τον συμπαραγόντα και το ένζυμο. Ένα ένζυμο χωρίς τον συμπαραγόντά του καλείται *αποένζυμο*. Το πλήρως καταλυτικά ενεργό ένζυμο καλείται *ολοένζυμο*.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.1 Εξειδίκευση ενζύμου.** (Α) Η θρυψίνη διασπά τους δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο των καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης, ενώ (Β) η θρομβίνη διασπά τους δεσμούς Arg-Gly ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.2 Συμπαραγόντες ενζύμων.**

Συμπαραγόντας	Ένζυμο
<b>Συνένζυμο</b>	
Πυροφωσφορική θειαμίνη	Πυροσταφυλική αφυδρογονάση
Φλαβινο-αδενινο-νουκλεοτίδιο	Οξειδάση των μονοαμινών
Νικοτιναμίδο-αδενινο-νουκλεοτίδιο	Γαλακτική αφυδρογονάση
Φωσφορική πυριδοξάλη	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
Συνένζυμο A (CoA)	Καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA
Βιοτίνη	Πυροσταφυλική καρβοξυλάση
5' -Δεοξαδενοσυλο-κοβαλαμίνη	Μουτάση του μεθυλομπλονικού
Τετραϋδροφυλλικό	Συνθάση του θυμιδυλικού
<b>Μέταλλο</b>	
Zn <sup>2+</sup>	Ανθρακική ανυδράση
Zn <sup>2+</sup>	Καρβοξυπεπτιδάση
Mg <sup>2+</sup>	EcoRV
Mg <sup>2+</sup>	Εξοκινάση
Ni <sup>2+</sup>	Ουρεάση
Mo	Αναγωγάση του νιτρικού
Se	Υπεροξειδάση του γλουταθείου
Mn <sup>2+</sup>	Δισμουτάση του σουπεροξειδίου
K <sup>+</sup>	Καρβοξυλάση του προπιονυλο-CoA



**ΕΙΚΟΝΑ 8.2** Ένα ένζυμο που μετασχηματίζει ενέργεια. Η ATPάση  $\text{Ca}^{2+}$  χρησιμοποιεί την ενέργεια υδρόλυσης της ATP για να μεταφέρει  $\text{Ca}^{2+}$  διά μέσου της μεμβράνης, παράγοντας μια βαθμίδωση συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$ .

Οι συμπράγοντες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: μέταλλα και μικρά οργανικά μόρια (Πίνακας 8.2). Παραδείγματος χάριν, το ένζυμο ανθρακική ανυδράση για τη δραστηκότητά του χρειάζεται  $\text{Zn}^{2+}$  (Εδάφιο 9.2.1). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Εδάφιο 21.1.5), η οποία υδρολύει γλυκογόνο για ενέργεια, χρειάζεται το μικρό οργανικό μόριο φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).

Οι συμπράγοντες που είναι μικρά οργανικά μόρια καλούνται *συνένζυμα*. Τα συνένζυμα, τα οποία παράγονται συχνά από βιταμίνες, μπορούν να είναι είτε χαλαρά είτε σφιχτά προσδεμένα στο ένζυμο. Εάν είναι σφιχτά προσδεμένα καλούνται *προσθετικές ομάδες*. Χαλαρά προσδεμένα συνένζυμα είναι περισσότερο όμοια με τα συνυποστρώματα διότι προσδέονται και απελευθερώνονται από το ένζυμο ακριβώς όπως τα υποστρώματα και τα προϊόντα. Εντούτοις, η χρησιμοποίηση των ίδιων συνενζύμων από μια ποικιλία ενζύμων και η προέλευσή τους από τις βιταμίνες τα ξεχωρίζει από τα κανονικά υποστρώματα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούν το ίδιο συνένζυμο έχουν συνήθως όμοιο μηχανισμό. Στο Κεφάλαιο 9 θα εξετάσουμε τη μηχανιστική σημασία των συμπαραγόντων στη δραστηκότητα των ενζύμων. Μια περισσότερο λεπτομερής εξέταση των βιταμινών συνενζύμων γίνεται στο Υποκεφάλαιο 8.6.

### 8.1.2 Τα ένζυμα μπορεί να μετασχηματίζουν ενέργεια από μια μορφή σε άλλη

Σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, η ενέργεια των αντιδρώντων μετατρέπεται με μεγάλη αποτελεσματικότητα σε μια διαφορετική μορφή. Παραδείγματος χάριν, στη φωτοσύνθεση η ενέργεια του φωτός μετατρέπεται σε ενέργεια χημικού δεσμού μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης ιόντων. Στα μιτοχόνδρια, η ελεύθερη ενέργεια που περιέχεται στα μικρά μόρια που προσλαμβάνονται με την τροφή, μετατρέπεται πρώτα στην ελεύθερη ενέργεια μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης ιόντων και στη συνέχεια σε ένα διαφορετικό είδος ενέργειας, την ελεύθερη ενέργεια της τριφωσφορικής αδενοσίνης. Ακολούθως, τα ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιήσουν την ενέργεια του χημικού δεσμού της ATP με πολλούς τρόπους: Το ένζυμο μωσίνη μετατρέπει την ενέργεια της ATP σε μηχανική ενέργεια

μυϊκής συστολής. Αντλίες στις μεμβράνες των κυττάρων και των οργανιδίων, οι οποίες μπορεί να θεωρηθούν ένζυμα που μετακινούν υποστρώματα μάλλον παρά να τα μεταβάλουν χημικά, δημιουργούν ηλεκτρικές και χημικές βαθμίδώσεις συγκέντρωσης χρησιμοποιώντας την ενέργεια της ATP για να μεταφέρουν μόρια και ιόντα (Εικόνα 8.2). Οι μοριακοί μηχανισμοί των ενζύμων αυτών που μετασχηματίζουν ενέργεια βρίσκονται στη φάση της διαλεύκανσης. Στα επόμενα κεφάλαια θα δούμε πώς κύκλοι διάκριτων βημάτων με ενιαία κατεύθυνση —πρόσδεση, χημικός μετασχηματισμός και απελευθέρωση— οδηγούν στη μετατροπή από μία μορφή ενέργειας σε άλλη.

### 8.1.3 Τα ένζυμα ταξινομούνται με βάση τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν

Πολλά ένζυμα έχουν κοινά ονόματα που δίνουν λίγες πληροφορίες για την αντίδραση που καταλύουν. Παραδείγματος χάριν, ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που εκκρίνεται από το πάγκρεας ονομάζεται θρυψίνη. Τα περισσότερα ένζυμα παίρνουν το όνομά τους από τα υποστρώματά τους και τις αντιδράσεις που

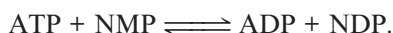
### ΠΙΝΑΚΑΣ 8.3 Έξι κύριες κατηγορίες ενζύμων.

Κατηγορία	Τύπος αντίδρασης	Παράδειγμα	Κεφάλαιο
1. Οξειδοαναγωγάσες	Οξειδωση-αναγωγή	Γαλακτική αφυδρογονάση	16
2. Μεταφοράσες	Μεταφορά ομάδας	Κινάση των μονοφωσφορικών νουκλεοζιτών (κινάση NMP)	9
3. Υδρολάσες	Αντιδράσεις υδρόλυσης (μεταφορά λειτουργικών ομάδων στο νερό)	Χυμοθρυψίνη	9
4. Λυάσες	Πρόσθεση ή αφαίρεση ομάδων για τον σχηματισμό διπλών δεσμών	Φουμαράση	17
5. Ισομεράσες	Ισομερείωση (ενδομοριακή μεταφορά ομάδας)	Ισομεράση των φωσφορικών τριοζών	16
6. Λιγάσες	Σύνδεση δύο υποστρωμάτων με δαπάνη την υδρόλυση της ATP	Συνθετάση του αμινοακυλο-tRNA	29

καταλύουν, με την προσθήκη της κατάληξης «-άση». Έτσι, μια ATPάση είναι ένα ένζυμο που διασπά ATP, ενώ η συνθάση της ATP είναι ένα ένζυμο που συνθέτει ATP.

Για να δοθεί κάποια συνέχεια στην ταξινόμηση των ενζύμων, η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας ίδρυσε το 1964 μια Επιτροπή Ονοματολογίας Ενζύμων για να αναπτύξει μια ονοματολογία για τα ένζυμα. Οι αντιδράσεις διαιρέθηκαν σε έξι κύριες ομάδες και αριθμήθηκαν από το 1 έως το 6 (Πίνακας 8.3). Οι ομάδες αυτές υποδιαιρέθηκαν και υποδιαιρέθηκαν περαιτέρω, έτσι ώστε ένας αριθμός με τέσσερα ψηφία τα οποία ακολουθούν τα γράμματα *EC* (από το Enzyme Commission) μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια την ταυτότητα όλων των ενζύμων.

Ας πάρουμε ως παράδειγμα την κινάση των μονοφωσφορικών νουκλεοζιτών (κινάση NMP), ένα ένζυμο που θα εξεταστεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο (Υποκεφάλαιο 9.4). Η κινάση αυτή καταλύει την αντίδραση:



Η κινάση NMP μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα από την ATP στην NMP για να σχηματίσει έναν διφωσφορικό νουκλεοζίτη (NDP) και ADP. Συνεπώς, είναι μια μεταφοράση ή μέλος της ομάδας 2. Εκτός από τις φωσφορικές ομάδες είναι δυνατόν να μεταφερθούν και πολλές άλλες ομάδες, όπως π.χ. σάκχαρα και μονάδες άνθρακα. Οι μεταφοράσες που αλλάζουν τη θέση μιας φωσφορικής ομάδας χαρακτηρίζονται ως 2.7. Η φωσφορική ομάδα γίνεται δεκτή από πολλές λειτουργικές ομάδες. Εάν ο δέκτης είναι μια φωσφορική ομάδα, η μεταφοράση ορίζεται ως 2.7.4. Ο τελικός αριθμός χαρακτηρίζει τον δέκτη ακριβέστερα. Όσον αφορά την NMP κινάση, ο δέκτης είναι ένας μονοφωσφορικός νουκλεοζίτης και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου είναι EC 2.7.4.4 Αν και τα κοινά ονόματα χρησιμοποιούνται συχνά, ο αριθμός ταξινόμησης χρησιμοποιείται όταν η ακριβής ταυτότητα του ενζύμου μπορεί να είναι ασαφής.

## 8.2 Η ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΕΙΝΑΙ ΜΙΑ ΧΡΗΣΙΜΗ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Μερικές από τις αρχές της θερμοδυναμικής αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 1 – με αξιοσημείωτη την ιδέα της *ελεύθερης ενέργειας* (*G*). Για να κατανοήσουμε πλήρως πώς λειτουργούν τα ένζυμα, πρέπει να μελετήσουμε δύο θερμοδυναμικές ιδιότητες της αντίδρασης: (1) τη διαφορά της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) μεταξύ των προϊόντων και των αντιδρώντων και (2) την ενέργεια που απαιτεί-

ται για να αρχίσει η μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα. Η πρώτη προσδιορίζει το κατά πόσον η αντίδραση θα γίνει αυθόρμητα, ενώ η δεύτερη προσδιορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Τα ένζυμα επηρεάζουν μόνο τη δεύτερη. Στην αρχή θα μελετήσουμε τη θερμοδυναμική των αντιδράσεων και στη συνέχεια (Υποκεφάλαιο 8.3) τις ταχύτητες των αντιδράσεων.

### 8.2.1 Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας δίνει πληροφορίες για το αυθόρμητο αλλά όχι για την ταχύτητα μιας αντίδρασης

Όπως αναφέρθηκε στο Εδάφιο 1.3.3, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) δείχνει αν μια αντίδραση μπορεί να γίνει αυθόρμητα:

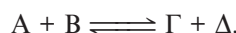
1. Μια αντίδραση μπορεί να γίνει αυθόρμητα *μόνον* εάν η  $\Delta G$  είναι αρνητική. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται *εξώεργες*.
2. Ένα σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία και καμία καθαρή μεταβολή δεν μπορεί να γίνει εάν η  $\Delta G$  ισούται με το μηδέν.
3. Μια αντίδραση δεν μπορεί να γίνει αυθόρμητα εάν η  $\Delta G$  είναι θετική. Για να γίνει μια τέτοια αντίδραση απαιτείται επιπρόσθετη ελεύθερη ενέργεια. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται *ενδόεργες*.

Πρέπει να δοθεί έμφαση σε δύο ακόμη σημεία. Η  $\Delta G$  μιας αντίδρασης εξαρτάται μόνο από τη διαφορά της ελεύθερης ενέργειας των προϊόντων (τελικό στάδιο) από την ελεύθερη ενέργεια των αντιδρώντων (αρχικό στάδιο). Η  $\Delta G$  μιας αντίδρασης είναι ανεξάρτητη από την πορεία (ή μοριακό μηχανισμό) ενός μετασχηματισμού. Ο μηχανισμός μιας αντίδρασης δεν επηρεάζει τη  $\Delta G$ . Παραδείγματος χάριν, η  $\Delta G$  της οξειδωσης της γλυκόζης σε  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$  που, είτε γίνεται με καύση *in vitro* είτε μέσα σε ένα κύτταρο από μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων, είναι η ίδια. Η  $\Delta G$  δεν δίνει πληροφορίες για την ταχύτητα μιας αντίδρασης. Μια αρνητική τιμή της  $\Delta G$  υποδηλώνει ότι μια αντίδραση μπορεί να γίνει αυθόρμητα, αλλά δεν καθορίζει εάν θα προχωρήσει με αισθητή ταχύτητα. Όπως θα συζητηθεί παρακάτω (Υποκεφάλαιο 8.3), η ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την *ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης* ( $\Delta G^\ddagger$ ), η οποία σε μεγάλο βαθμό είναι ανεξάρτητη από τη  $\Delta G$  της αντίδρασης.

### 8.2.2 Η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας μιας αντίδρασης σχετίζεται με τη σταθερά ισορροπίας

Όπως για κάθε αντίδραση, έτσι και για μια ενζυμική αντίδραση πρέπει να μπορούμε να προσδιορίσουμε τη  $\Delta G$  για να ξέρουμε εάν η αντίδραση είναι αυθόρμητη ή χρειάζεται εισαγωγή ελεύθερης ενέργειας. Για να προσδιορίσουμε αυτή τη σημαντική θερμοδυναμική παράμετρο, πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν τη φύση των αντιδρώντων και των προϊόντων καθώς επίσης και τις συγκεκριμένες τους.

Ας πάρουμε την αντίδραση



Η  $\Delta G$  της αντίδρασης αυτής δίνεται από

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\Gamma][\Delta]}{[A][B]}, \quad (1)$$

όπου η  $\Delta G^\circ$  είναι η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας,  $R$  είναι η σταθερά αερίων,  $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία και  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[\Gamma]$  και  $[\Delta]$  είναι οι μοριακές συγκεντρώσεις (ακριβέστερα, οι δραστηρότητες) των αντιδρώντων.

Η  $\Delta G^\circ$  είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κάτω από πρότυπες συνθήκες, δηλαδή όταν το κάθε ένα από τα αντιδρώντα A, B, Γ και Δ έχει συγκέντρωση 1,0 M (για ένα αέριο, συνήθως ως πρότυπη κατάσταση επιλέγεται η πίεση 1 ατμόσφαιρας). Έτσι, η  $\Delta G$  μιας αντίδρασης εξαρτάται από τη φύση των αντιδρώντων (που εκφράζεται στον όρο  $\Delta G^\circ$  της εξίσωσης 1) και από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων (που εκφράζονται με τον λογαριθμικό όρο της εξίσωσης 1).

Έχει υιοθετηθεί μια σύμβαση ώστε να απλοποιηθούν οι υπολογισμοί της ελεύθερης ενέργειας στις βιοχημικές αντιδράσεις. Ως πρότυπη κατάσταση ορίζεται εκείνη στην οποία το pH ισούται με 7. Συνεπώς, όταν το  $H^+$  είναι ένα από τα αντιδρώντα, στις εξισώσεις 1 και 4 (πιο κάτω) η δραστηριότητά του έχει την τιμή 1 (που αντιστοιχεί στο pH 7). Επίσης, η δραστηριότητα του  $H_2O$  στις οξειδώσεις αυτές λαμβάνεται ίση με 1. Η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας σε pH 7, που παριστάνεται με το σύμβολο  $\Delta G^{\circ'}$ , θα χρησιμοποιείται παντού στο βιβλίο αυτό. Η χιλιοθερμίδα (kilocalorie, kcal) και το kilojoule (kJ) θα χρησιμοποιούνται ως μονάδες ενέργειας. Μία χιλιοθερμίδα ισούται με 4,184 kJ.

Η σχέση μεταξύ της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας και της σταθεράς ισορροπίας μιας αντίδρασης προκύπτει εύκολα. Η εξίσωση αυτή είναι σημαντική διότι δείχνει την ενεργειακή σχέση μεταξύ των προϊόντων και των αντιδρώντων αναφορικά με τις συγκεντρώσεις τους. Στην ισορροπία,  $\Delta G = 0$ . Τότε η εξίσωση 1 γίνεται

$$0 = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[\Gamma][\Delta]}{[A][B]} \quad (2)$$

καθώς επίσης

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln \frac{[\Gamma][\Delta]}{[A][B]} \quad (3)$$

Η σταθερά ισορροπίας,  $K'_{eq}$ , κάτω από πρότυπες συνθήκες ορίζεται ως

$$K'_{eq} = \frac{[\Gamma][\Delta]}{[A][B]} \quad (4)$$

Αντικαθιστώντας το κλάσμα του δεύτερου μέλους της εξίσωσης (3) με  $K'_{eq}$  έχουμε

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K'_{eq} \quad (5)$$

$$\Delta G^{\circ'} = -2,303 RT \log_{10} K'_{eq} \quad (6)$$

η οποία μπορεί να μετασχηματιστεί εκ νέου για να δώσει

$$K'_{eq} = 10^{\Delta G^{\circ'}/(2,303RT)} \quad (7)$$

Αντικαθιστώντας  $R = 1,987 \times 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$  και  $T = 298 \text{ K}$  (που αντιστοιχεί στους 25°C) έχουμε

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ'}/1,36} \quad (8)$$

όπου η  $\Delta G^{\circ'}$  εκφράζεται σε  $\text{kcal mol}^{-1}$  λόγω της επιλογής των μονάδων για την  $R$  στην εξίσωση 7. Έτσι, η πρότυπη ελεύθερη ενέργεια και η σταθερά ισορροπίας μιας αντίδρασης συνδέονται με μια απλή σχέση. Παραδείγματος χάριν, μια σταθερά ισορροπίας με τιμή 10 αντιστοιχεί σε μια μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας των  $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $-5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) στους 25°C (Πίνακας 8.4). Επισημαίνεται ότι για κάθε αλλαγή της σταθεράς ισορροπίας κατά 10 φορές, η  $\Delta G^{\circ'}$  αλλάζει κατά  $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $-5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

#### Μονάδες ενέργειας—

Μία θερμίδα (cal) είναι ισοδύναμη με την ποσότητα της θερμότητας που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας ενός γραμμαρίου νερού από τους 14,5°C στους 15,5°C.

Μία χιλιοθερμίδα (kcal) είναι ίση με 1000 cal.

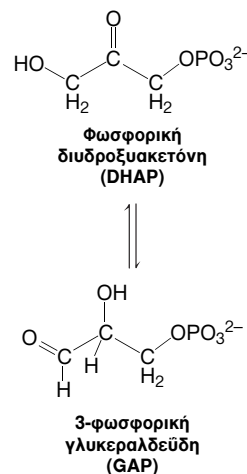
Ένα joule (J) είναι η ποσότητα ενέργειας που χρειάζεται για να εφαρμοστεί μια δύναμη ενός newton σε απόσταση ενός μέτρου.

Ένα kilojoule (kJ) είναι ίσο με 1000 joule.

$$1 \text{ kcal} = 4,184 \text{ kJ}$$

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.4** Σχέση μεταξύ της  $\Delta G^{\circ'}$  και της  $K'_{eq}$  (στους 25°C).

$K'_{eq}$	$\Delta G^{\circ'}$	
	$\text{kcal mol}^{-1}$	$\text{kJ mol}^{-1}$
$10^{-5}$	6,82	28,53
$10^{-4}$	5,46	22,84
$10^{-3}$	4,09	17,11
$10^{-2}$	2,73	11,42
$10^{-1}$	1,36	5,69
1	0	0
10	-1,36	-5,69
$10^2$	-2,73	-11,42
$10^3$	-4,09	-17,11
$10^4$	-5,46	-22,84
$10^5$	-6,82	-28,53



Ως παράδειγμα, ας υπολογίσουμε τη  $\Delta G^\circ$  και τη  $\Delta G$  της αντίδρασης ισομερείωσης της φωσφορικής διυδροξυακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στη γλυκόλυση (Εδάφιο 16.1.4). Στην ισορροπία, ο λόγος της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης προς τη φωσφορική διυδροξυακετόνη σε 25°C (298 K) και pH 7 είναι 0,0475. Έτσι,  $K'_{\text{eq}} = 0,0475$ . Η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας της αντίδρασης αυτής υπολογίζεται από την εξίσωση 6:

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -2,303 RT \log_{10} K'_{\text{eq}} \\ &= -2,303 \times 1,98 \times 10^{-3} \times 298 \times \log_{10} (0,0475) \\ &= +1,8 \text{ kcal mol}^{-1} (7,53 \text{ kJ mol}^{-1})\end{aligned}$$

Κάτω από τις συνθήκες αυτές η αντίδραση είναι ενδόεργη. Η φωσφορική διυδροξυακετόνη δεν θα μετατραπεί αυθόρμητα σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη.

Τώρα, ας υπολογίσουμε τη  $\Delta G$  της αντίδρασης αυτής όταν η αρχική συγκέντρωση της φωσφορικής διυδροξυακετόνης είναι  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  και η αρχική συγκέντρωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης είναι  $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ . Τοποθετώντας τις τιμές αυτές στην εξίσωση 1 έχουμε

$$\begin{aligned}\Delta G &= 1,80 \text{ kcal mol}^{-1} + 2,303RT \log_{10} \frac{3 \times 10^{-6} \text{ M}}{2 \times 10^{-4} \text{ M}} \\ &= 1,80 \text{ kcal mol}^{-1} - 2,49 \text{ kcal mol}^{-1} \\ &= -0,69 \text{ kcal mol}^{-1} (-2,89 \text{ kJ mol}^{-1})\end{aligned}$$

Αυτή η αρνητική τιμή για τη  $\Delta G$  υποδηλώνει ότι η ισομερείωση της φωσφορικής διυδροξυακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη είναι εξώεργη και μπορεί να γίνει αυθόρμητα όταν οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις που καθορίστηκαν παραπάνω. Επισημαίνεται ότι η  $\Delta G$  της αντίδρασης αυτής είναι αρνητική αν και η  $\Delta G^\circ$  είναι θετική. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το εάν η  $\Delta G$  μιας αντίδρασης θα είναι μεγαλύτερη, μικρότερη ή ίδια με τη  $\Delta G^\circ$  εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων. Το κριτήριο του αυθόρμητου μιας αντίδρασης είναι η  $\Delta G$  και όχι η  $\Delta G^\circ$ . Το σημείο αυτό είναι σημαντικό διότι αντιδράσεις που δεν είναι αυθόρμητες με βάση τη  $\Delta G^\circ$  μπορούν να γίνουν αυθόρμητες ρυθμίζοντας τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων. Η αρχή αυτή είναι η βάση της σύζευξης των αντιδράσεων για τον σχηματισμό μεταβολικών πορειών (Κεφάλαιο 14).

### 8.2.3 Τα ένζυμα μεταβάλλουν μόνο την ταχύτητα και όχι την ισορροπία της αντίδρασης

Επειδή τα ένζυμα είναι τόσο εντυπωσιακοί καταλύτες, είναι δελεαστικό να αποδίδουμε σε αυτά δυνάμεις που δεν έχουν. Ένα ένζυμο δεν μπορεί να μεταβάλει τους νόμους της θερμοδυναμικής και ως εκ τούτου δεν μπορεί να μεταβάλει την ισορροπία μιας χημικής αντίδρασης. Η ανικανότητα αυτή σημαίνει ότι ένα ένζυμο επιταχύνει την αντίδραση και προς τις δύο κατευθύνσεις ακριβώς κατά τον ίδιο παράγοντα. Ας πάρουμε την αλληλομετατροπή των Α και Β. Ας υποθέσουμε ότι χωρίς την παρουσία ενζύμου η προς τα δεξιά κινητική σταθερά ( $k_F$ ) είναι  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  και η αντίστροφη κινητική σταθερά ( $k_R$ ) είναι  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Η σταθερά ισορροπίας  $K$  δίνεται από τον λόγο αυτών των κινητικών σταθερών:

$$\begin{aligned} & \text{A} \xrightleftharpoons[10^{-6} \text{ s}^{-1}]{10^{-4} \text{ s}^{-1}} \text{B} \\ K &= \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} = \frac{k_F}{k_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100.\end{aligned}$$



Η συγκέντρωση ισορροπίας του B είναι 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του A, ανεξαρτήτως εάν το ένζυμο είναι παρόν ή όχι. Εντούτοις, χωρίς την παρουσία ενζύμου θα χρειαστεί αρκετό χρόνο για να επιτευχθεί αυτή η ισορροπία, ενώ όταν υπάρχει ένα κατάλληλο ένζυμο η ισορροπία θα επιτευχθεί πολύ γρήγορα. Τα ένζυμα επιταχύνουν την επίτευξη της ισορροπίας αλλά δεν μεταβάλλουν τη θέση της. Η θέση ισορροπίας είναι συνάρτηση μόνο της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων.

### 8.3 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΔΙΕΥΚΟΛΥΝΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

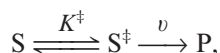
Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων ερμηνεύει την ισορροπία της αντίδρασης. Τα ένζυμα επιταχύνουν την επίτευξη της ισορροπίας αυτής. Πώς είναι δυνατόν να εξηγηθεί η αύξηση της ταχύτητας με όρους της θερμοδυναμικής; Για να γίνει αυτό, πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν όχι τα τελικά σημεία της αντίδρασης αλλά η χημική πορεία μεταξύ των τελικών σημείων.

Μια χημική αντίδραση μετατροπής ενός υποστρώματος S σε ένα προϊόν P λαμβάνει χώρα μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης  $S^\ddagger$  που έχει υψηλότερη ελεύθερη ενέργεια από ό,τι το S ή το P. Ο διπλός σταυρός στίξης ( $\ddagger$ ) υποδηλώνει μια θερμοδυναμική ιδιότητα μιας μεταβατικής κατάστασης. Κατά την πορεία μιας αντίδρασης, η μεταβατική κατάσταση, λόγω της υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, είναι η πιο σπάνια καταλαμβανόμενη διαμόρφωση. Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της μεταβατικής κατάστασης και του υποστρώματος καλείται *ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης κατά Gibbs*, ή απλά *ενέργεια ενεργοποίησης* που συμβολίζεται με  $\Delta G^\ddagger$ , όπως αναφέρθηκε στο Εδάφιο 8.2.1 (Εικόνα 8.3).

$$\Delta G^\ddagger = G_{S^\ddagger} - G_S.$$

Επισημαίνεται ότι η ενέργεια ενεργοποίησης, η  $\Delta G^\ddagger$ , δεν υπεισέρχεται στον τελικό υπολογισμό της  $\Delta G$  της αντίδρασης, διότι η ενέργεια που απαιτείται για να φθάσει στη μεταβατική κατάσταση επιστρέφεται όταν η μεταβατική κατάσταση σχηματίσει το προϊόν. Το φράγμα της ενέργειας ενεργοποίησης υποδηλώνει άμεσα πώς τα ένζυμα αυξάνουν την ταχύτητα της αντίδρασης δίχως να μεταβάλλουν τη  $\Delta G$  της αντίδρασης: τα ένζυμα λειτουργούν για να ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης, ή με άλλα λόγια, τα ένζυμα διευκολύνουν τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης.

Μια προσέγγιση για να κατανοήσουμε πώς τα ένζυμα επιτυγχάνουν τη διευκόλυνση αυτή είναι να θεωρήσουμε ότι η μεταβατική κατάσταση ( $S^\ddagger$ ) και το υπόστρωμα (S) βρίσκονται σε ισορροπία.

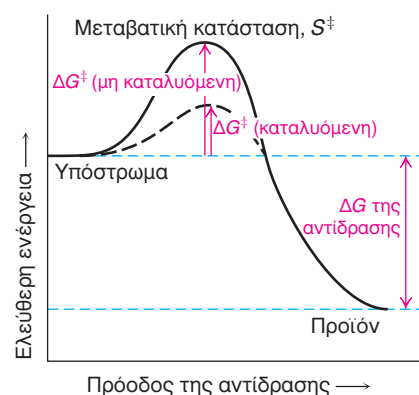


στην οποία  $K^\ddagger$  είναι η σταθερά ισορροπίας για τον σχηματισμό της  $S^\ddagger$  και  $\nu$  είναι η ταχύτητα του σχηματισμού του προϊόντος από  $S^\ddagger$ .

Η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της  $S^\ddagger$ :

$$\text{Ταχύτητα} \propto [S^\ddagger]$$

διότι μόνο η  $S^\ddagger$  μετατρέπεται σε προϊόν. Η συγκέντρωση της  $S^\ddagger$  με τη σειρά της σχετίζεται με τη διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της  $S^\ddagger$  και του S, διότι αυτά τα δύο χημικά είδη θεωρήθηκαν ότι βρίσκονται σε ισορροπία.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.3** Τα ένζυμα ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης. Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις με το να ελαττώνουν τη  $\Delta G^\ddagger$ , την ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης.

Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ αυτών των δύο ειδών, τόσο μικρότερο είναι η ποσότητα της  $S^\ddagger$ .

Επειδή η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της  $S^\ddagger$ , και η συγκέντρωση της  $S^\ddagger$  εξαρτάται από τη  $\Delta G^\ddagger$ , η ταχύτητα της αντίδρασης  $V$  εξαρτάται από τη  $\Delta G^\ddagger$ . Ειδικότερα,

$$V = v[S^\ddagger] = \frac{kT}{h} [S]e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Στην εξίσωση αυτή,  $k$  είναι η σταθερά Boltzmann και  $h$  είναι η σταθερά Planck. Η τιμή του  $kT/h$  στους 25°C είναι  $6,2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ . Ας υποθέσουμε ότι η ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης είναι  $6,82 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $28,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Τότε ο λόγος  $[S^\ddagger]/[S]$  είναι  $10^{-5}$  (βλ. Πίνακα 8.4). Εάν υποθέσουμε χάριν απλότητας ότι  $[S] = 1 \text{ M}$ , τότε η ταχύτητα της αντίδρασης  $V$  είναι  $6,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Εάν η  $\Delta G^\ddagger$  ελαττωθεί κατά  $1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) η αναλογία  $[S^\ddagger]/[S]$  είναι  $10^{-4}$  και η ταχύτητα της αντίδρασης θα είναι  $6,2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Όπως δείχνει ο Πίνακας 8-4, μια ελάττωση στη  $\Delta G^\ddagger$  κατά  $1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$  παράγει μια  $V$  δέκα φορές μεγαλύτερη. Μια σχετικά μικρή ελάττωση στη  $\Delta G^\ddagger$  (20% στην αντίδραση αυτή) έχει ως αποτέλεσμα την πολύ μεγαλύτερη αύξηση της  $V$ .

Έτσι, βλέπουμε το κλειδί για το πώς λειτουργούν τα ένζυμα: *Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις με το να ελαττώνουν τη  $\Delta G^\ddagger$ , την ενέργεια ενεργοποίησης.* Ο συνδυασμός ενζύμου-υποστρώματος δημιουργεί μια καινούργια πορεία αντίδρασης, της οποίας η ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης είναι χαμηλότερη από εκείνη της αντίδρασης χωρίς ένζυμο (Εικόνα 8.3). Χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης σημαίνει ότι περισσότερα μόρια έχουν την απαιτούμενη ενέργεια να φθάσουν στη μεταβατική κατάσταση. Η ελάττωση του φράγματος ενεργοποίησης είναι ανάλογη με το χαμήλωμα του ύψους του πήχη του άλματος εις ύψος· περισσότεροι αθλητές θα είναι ικανοί να περάσουν επάνω από τον πήχη. *Η ουσία της κατάλυσης είναι η ειδική πρόσδεση της μεταβατικής κατάστασης.*

### 8.3.1 Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος είναι το πρώτο βήμα στην ενζυμική κατάλυση

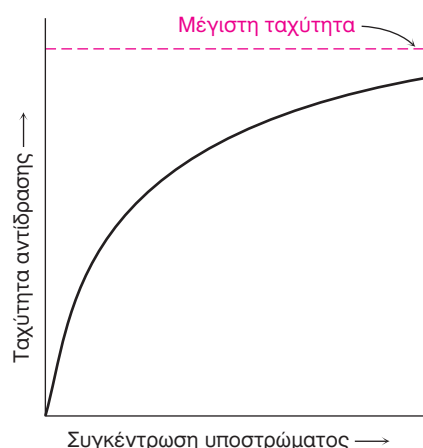
Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής ισχύος των ενζύμων πηγάζει από το ότι φέρνουν τα υποστρώματά τους κοντά σε ευνοϊκό προσανατολισμό για να προαγάγουν τον σχηματισμό των μεταβατικών καταστάσεων μέσα σε σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος (ES). Τα υποστρώματα προσδένονται σε μια ειδική περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται *ενεργό κέντρο* (active site). Τα περισσότερα ένζυμα είναι πολύ επιλεκτικά με τα υποστρώματα που προσδένουν. Πράγματι, η καταλυτική εξειδίκευση των ενζύμων κατά ένα μέρος εξαρτάται από την εξειδίκευση της πρόσδεσης.

Ποια είναι η ένδειξη της ύπαρξης ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος;

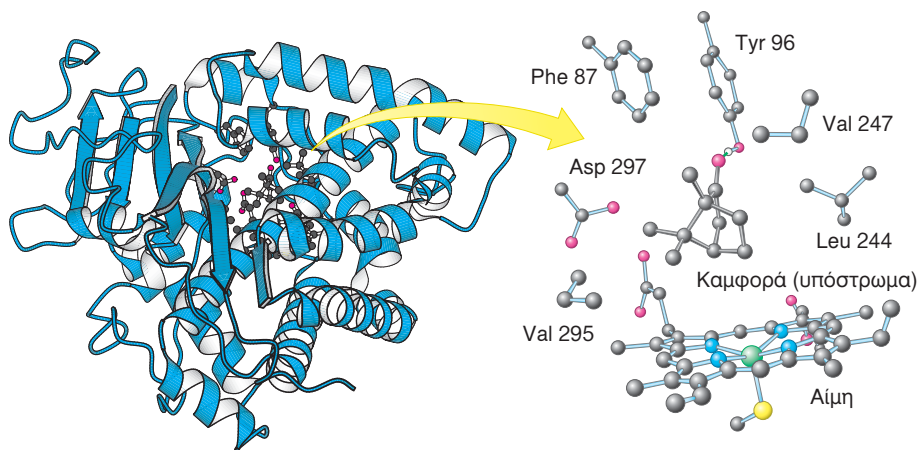
1. Το πρώτο στοιχείο ήταν η παρατήρηση ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος μέχρις ότου επιτευχθεί μια μέγιστη ταχύτητα (Εικόνα 8.4). Αντιθέτως, μη καταλυόμενες αντιδράσεις δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο του κορεσμού. *Το γεγονός ότι μια αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο έχει μια μέγιστη ταχύτητα υποδηλώνει τον σχηματισμό ενός ξεχωριστού συμπλόκου ES.* Σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος, οι καταλυτικές περιοχές των μορίων του ενζύμου είναι κατειλημμένες και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης δεν μπορεί να αυξηθεί. Αν και έμμεσα, αυτή είναι η πλέον γενική ένδειξη για την ύπαρξη συμπλόκων ES.

«Πιστεύω ότι τα ένζυμα είναι μόρια που έχουν συμπληρωματική δομή με ενεργοποιημένα σύμπλοκα των αντιδράσεων που καταλύουν, δηλαδή, με τη μοριακή διαμόρφωση που είναι ενδιάμεση μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων της αντίδρασης, για αυτές τις καταλυόμενες πορείες. Έτσι, η έλξη του ενζύμου για το ενεργοποιημένο σύμπλοκο θα μπορούσε να οδηγήσει σε ελάττωση της ενέργειάς του και επομένως σε ελάττωση της ενέργειας ενεργοποίησης και σε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης».

—LINUS PAULING  
*Nature* 161(1948):707



**ΕΙΚΟΝΑ 8.4** Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Μια αντίδραση που καταλύεται από ένζυμο φθάνει σε μια μέγιστη ταχύτητα.



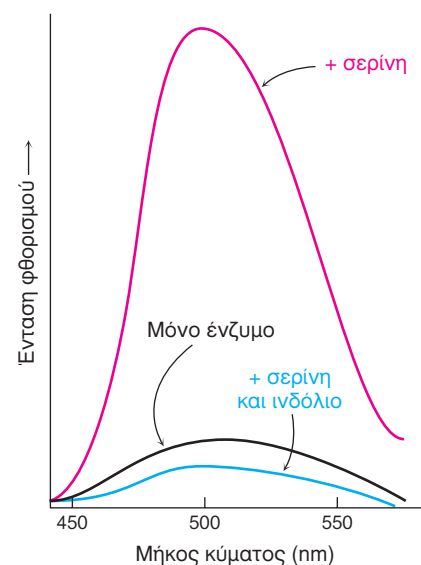
**ΕΙΚΟΝΑ 8.5** Δομή ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. (Αριστερά) Το ένζυμο κυτόχρωμα P450 απεικονίζεται προσδεμένο στο υπόστρωμά του (καμφορά). (Δεξιά) Στο ενεργό κέντρο, το υπόστρωμα περιβάλλεται από κατάλοιπα του ενζύμου. Επισημαίνεται η παρουσία ενός συμπάραγοντα αίμης.

2. Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X παρέχει υψηλής πιστότητας εικόνες υποστρωμάτων και αναλόγων υποστρωμάτων που είναι προσδεμένα στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων (Εικόνα 8.5). Στο Κεφάλαιο 9 θα δούμε λεπτομερώς αρκετά από τα σύμπλοκα αυτά. Επιπλέον, μελέτες με ακτίνες X που έγιναν σε χαμηλές θερμοκρασίες (για να επιβραδυνθούν οι αντιδράσεις) παρέχουν αποκαλυπτικές εικόνες των συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος και των επακόλουθων αντιδράσεών τους. Μια νέα τεχνική, η κρυσταλλογραφία διάκρισης χρόνου, εξαρτάται από τη συγκρυστάλλωση ενός φωτοασταθούς αναλόγου υποστρώματος με το ένζυμο.

3. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πολλών ενζύμων και υποστρωμάτων αλλάζουν με τον σχηματισμό ενός συμπλόκου ES. Οι αλλαγές αυτές είναι ιδιαίτερα έντονες εάν το ένζυμο περιέχει μια έγχρωμη προσθετική ομάδα. Η συνθετάση της θρυπτοφάνης, ένα βακτηριακό ένζυμο, παρέχει μια ωραία εικόνα διότι περιέχει ως προσθετική ομάδα τη φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη σύνθεση της L-θρυπτοφάνης από L-σερίνη και ινδόλιο. Η προσθήκη της L-σερίνης στο ένζυμο προκαλεί μια αξιοσημείωτη αύξηση στον φθορισμό της ομάδας της φωσφορικής πυριδοξάλης (Εικόνα 8.6). Η προσθήκη, στη συνέχεια, του ινδολίου, του δεύτερου υποστρώματος, μειώνει τον φθορισμό σε επίπεδο χαμηλότερο ακόμη και από εκείνον που έχει από μόνο του το ένζυμο. Έτσι, η φασματοσκοπία φθορισμού αποκαλύπτει την ύπαρξη ενός συμπλόκου ενζύμου-σερίνης και ενός συμπλόκου ενζύμου-σερίνης-ινδολίου. Άλλες τεχνικές φασματοσκοπίας, όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός και ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός, δίνουν επίσης πολλές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις ES.

### 8.3.2 Τα ενεργά κέντρα των ενζύμων έχουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά

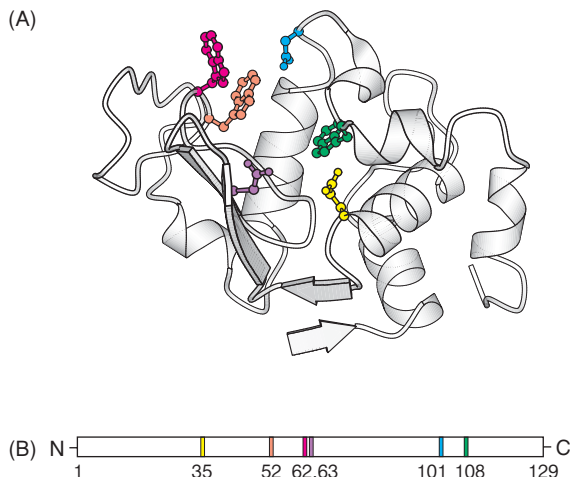
Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου είναι η περιοχή όπου προσδένονται τα υποστρώματα (και ο συμπάραγοντας, εάν υπάρχει). Περιέχει επίσης τα κατάλοιπα που συμμετέχουν απευθείας στη σύνθεση ή τη διάσπαση δεσμών. Τα κατάλοιπα αυτά ονομάζονται καταλυτικές ομάδες. Στην ουσία, η αλληλεπίδραση του ενζύμου και του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο προάγει τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης. Το ενεργό κέντρο είναι η περιοχή του ενζύμου που ελαττώνει περισσότερο άμεσα τη  $\Delta G^\ddagger$  της αντίδρασης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας που είναι χαρακτηριστική της δράσης του εν-



**ΕΙΚΟΝΑ 8.6** Αλλαγές στα φωτομετρικά χαρακτηριστικά με τον σχηματισμό ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Η ένταση φθορισμού της ομάδας της φωσφορικής πυριδοξάλης στο ενεργό κέντρο της συνθετάσης της θρυπτοφάνης αλλάζει με την προσθήκη των υποστρωμάτων σερίνης και ινδολίου.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.7 Τα ενεργά κέντρα μπορεί να περιλαμβάνουν απομακρυσμένα κατάλοιπα.**  
(Α) Σχεδιάγραμμα του ενζύμου λυσοζύμη, στο οποίο αρκετά συστατικά του ενεργού κέντρου φαίνονται έγχρωμα. (Β) Μια σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς δομής της λυσοζύμης δείχνει ότι το ενεργό κέντρο απαρτίζεται από κατάλοιπα που προέρχονται από διαφορετικά μέρη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.



ζύμου. Αν και τα ένζυμα διαφέρουν ευρέως ως προς τη δομή, την εξειδίκευση και τον τρόπο της κατάλυσης, μπορεί να αναφερθεί ένας αριθμός από γενικεύσεις που αφορούν το ενεργό κέντρο.

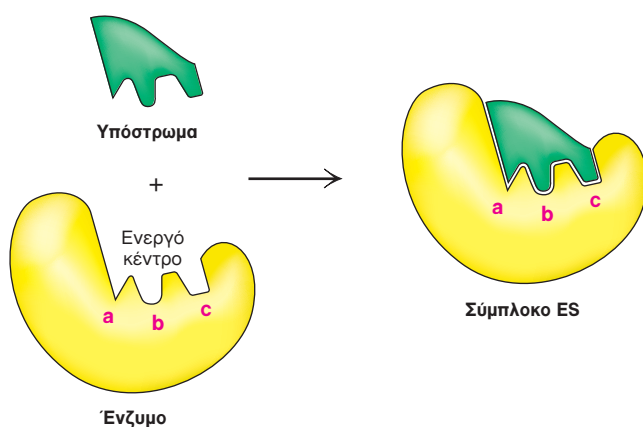
1. Το ενεργό κέντρο είναι μια τριδιάστατη εσοχή που έχει σχηματιστεί από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές μιας γραμμικής αλληλουχίας αμινοξέων. Πράγματι, κατάλοιπα μακριά το ένα από το άλλο στην αλληλουχία ίσως αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά από ό,τι παρακείμενα κατάλοιπα στην αλληλουχία των αμινοξέων. Στη λυσοζύμη, ένα ένζυμο που αποικοδομεί τα κυτταρικά τοιχώματα μερικών βακτηρίων, οι σημαντικές ομάδες του ενεργού κέντρου προσφέρονται από τα κατάλοιπα που αριθμούνται ως 35, 52, 62, 63, 101 και 108 στην αλληλουχία των 129 αμινοξέων (Εικόνα 8.7).

2. Το ενεργό κέντρο καταλαμβάνει ένα σχετικά μικρό μέρος από τον συνολικό όγκο ενός ενζύμου. Τα περισσότερα από τα κατάλοιπα των αμινοξέων σε ένα ένζυμο δεν έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα. Αυτό εγείρει το ερώτημα γιατί τα ένζυμα είναι τόσο μεγάλα. Σχεδόν όλα τα ένζυμα αποτελούνται από 100 και πλέον κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία τους προσδίνουν μια μάζα μεγαλύτερη από 10 kD και διάμετρο μεγαλύτερη από 25Å. Τα «επιπλέον» αμινοξέα χρησιμεύουν ως πλαίσιο στήριξης για να δημιουργήσουν το τριδιάστατο ενεργό κέντρο από αμινοξέα που βρίσκονται στην πρωτοταγή δομή το ένα μακριά από το άλλο. Τα αμινοξέα που βρίσκονται στην πρωτοταγή δομή το ένα κοντά στο άλλο συχνά παρεμποδίζονται στερεοχημικά να υιοθετήσουν τις δομικές σχέσεις που είναι αναγκαίες για να σχηματίσουν το ενεργό κέντρο. Σε πολλές πρωτεΐνες, τα αμινοξέα που απομένουν απαρτίζουν ρυθμιστικές περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, ή διαύλους για να φέρνουν τα υποστρώματα στα ενεργά κέντρα.

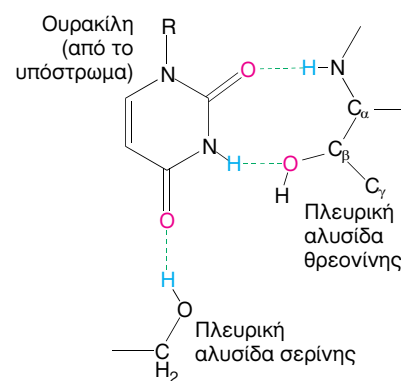
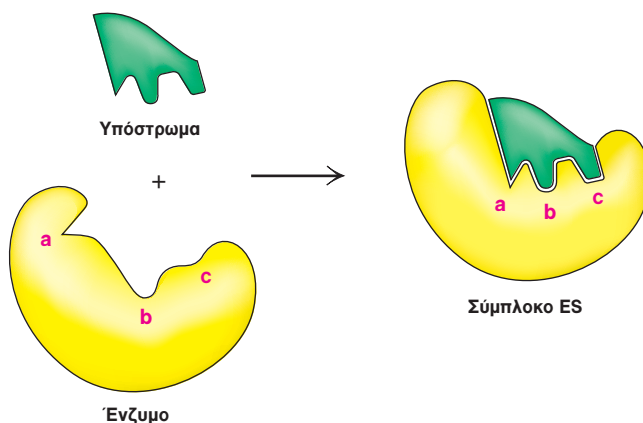
3. Τα ενεργά κέντρα είναι εσοχές ή σχισμές. Σε όλα τα ένζυμα με γνωστή δομή, τα μόρια του υποστρώματος προσδένονται σε μια εσοχή ή σε μια σχισμή. Το νερό συνήθως δεν περιλαμβάνεται, εκτός και αν είναι ένα αντιδρόν. Ο μη πολικός χαρακτήρας των περισσότερων εσοχών αυξάνει την πρόσδεση του υποστρώματος καθώς επίσης και την κατάλυση. Εντούτοις, η εσοχή μπορεί να περιέχει και πολικά κατάλοιπα. Στο μη πολικό μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου, κάποια από τα κατάλοιπα αυτά αποκτούν ειδικές ιδιότητες που είναι ουσιώδεις για την πρόσδεση του υποστρώματος ή την κατάλυση. Οι εσωτερικές θέσεις αυτών των πολικών καταλοίπων είναι βιολογικά κρίσιμες εξαιρέσεις από τον γενικό κανόνα όπου τα πολικά κατάλοιπα εκτίθενται στο νερό.

4. Τα υποστρώματα προσδένονται στα ένζυμα με πολλαπλές ασθενείς έλξεις. Τα σύ-

μπλοκα ES έχουν συνήθως σταθερές ισορροπίες που κυμαίνονται από  $10^{-2}$  έως  $10^{-8}$  M, οι οποίες αντιστοιχούν σε τιμές ελεύθερης ενέργειας της αλληλεπίδρασης από  $-3$  έως  $-12$  kcal mol $^{-1}$  (από  $-13$  έως  $-50$  kJ mol $^{-1}$ ). Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στα σύμπλοκα ES είναι πολύ ασθενέστερες από τους ομοιοπολικούς δεσμούς, που έχουν ενέργειες μεταξύ  $-50$  και  $-110$  kcal mol $^{-1}$  (μεταξύ  $-210$  και  $-460$  kJ mol $^{-1}$ ). Όπως συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 1 (Εδάφιο 1.3.1), οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις των βιομορίων επιτυγχάνονται με τη μεσολάβηση ηλεκτροστατικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων van der Waals και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Στην πρόσδεση, οι δυνάμεις van der Waals γίνονται σημαντικές μόνον όταν αρκετά άτομα του υποστρώματος μπορούν ταυτόχρονα να έλθουν κοντά σε πολλά άτομα του ενζύμου. Ως εκ τούτου, το ένζυμο και το υπόστρωμα θα έπρεπε να έχουν συμπληρωματικά σχήματα. Ο κατευθυντικός χαρακτήρας των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος συχνά επιβάλλει τον υψηλό βαθμό της εξειδίκευσης, όπως είδαμε στη ριβονουκλεάση, ένα ένζυμο που αποικοδομεί RNA (Εικόνα 8.8).



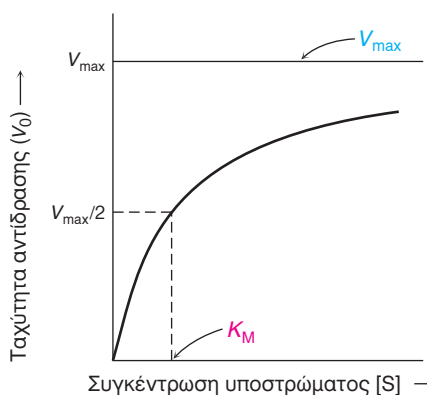
5. Η εξειδίκευση της πρόσδεσης εξαρτάται από την επακριβώς καθορισμένη τοποθέτηση των ατόμων στο ενεργό κέντρο. Επειδή το ένζυμο και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν με δυνάμεις μικρής εμβέλειας οι οποίες απαιτούν κοντινή επαφή, ένα υπόστρωμα για να εφαρμόσει σε μια περιοχή πρέπει να έχει ένα ταιριαστό σχήμα. Η μεταφορική έννοια του κλειδιού και της κλειδαριάς του Emil Fischer (Εικόνα 8.9), που διατυπώθηκε το 1899, αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική. Εντούτοις, τώρα ξέρουμε ότι τα ένζυμα είναι εύκαμπτα και ότι τα σχήματα των ενεργών κέντρων τροποποιούνται σημαντικά με την πρόσδεση του υποστρώματος, όπως παρουσιάστηκε από τον Daniel E. Koshland, Jr., το 1958. Τα ενεργά κέντρα μερικών ενζύμων έχουν σχήμα που είναι συμπληρωματικό προς εκείνο της μεταβατικής κατάστασης μόνο μετά την πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτή η πορεία της δυναμικής αναγνώρισης ονομάζεται *επαγόμενη προσαρμογή* (Εικόνα 8.10).



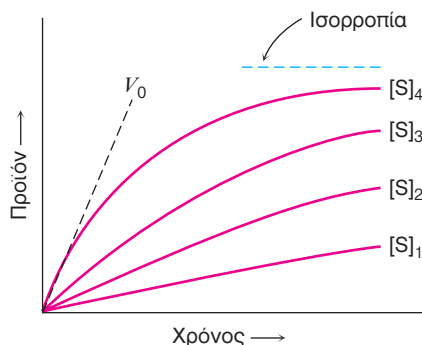
**ΕΙΚΟΝΑ 8.8** Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Το ένζυμο ριβονουκλεάση σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το συστατικό ουριδίνη του υποστρώματος. [Κατά F.M. Richards, H.W. Wyckoff, και N. Allewell. In *The Neurosciences: Second Study Program*, F.O. Schmidt, ed. (Rockefeller University Press, 1970) p. 970.]

**ΕΙΚΟΝΑ 8.9** Μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς της πρόσδεσης ενζύμου-υποστρώματος. Στο μοντέλο αυτό, το ενεργό κέντρο του μη προσδεμένου ενζύμου έχει συμπληρωματικό σχήμα προς εκείνο του υποστρώματος.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.10** Μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής της πρόσδεσης ενζύμου-υποστρώματος. Στο μοντέλο αυτό, το ένζυμο αλλάζει σχήμα κατά την πρόσδεση του υποστρώματος. Το ενεργό κέντρο έχει συμπληρωματικό σχήμα προς εκείνο του υποστρώματος μόνον μετά την πρόσδεση του υποστρώματος.



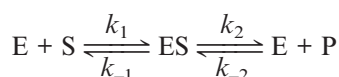
**ΕΙΚΟΝΑ 8.11** Κινητική Michaelis-Menten. Ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωτικά. Η σταθερά Michaelis ( $K_M$ ) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$ .



**ΕΙΚΟΝΑ 8.12** Προσδιορίζοντας την αρχική ταχύτητα. Η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση του χρόνου. Η αρχική ταχύτητα ( $V_0$ ) για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος προσδιορίζεται από την κλίση της καμπύλης στην αρχή της αντίδρασης, όταν η αντίστροφη αντίδραση είναι ασήμαντη.

## 8.4 ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ MICHAELIS-MENTEN ΕΞΗΓΕΙ ΤΙΣ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΛΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

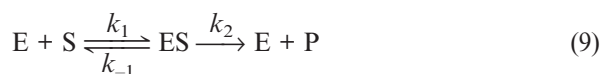
Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για να κατανοήσουμε πώς λειτουργούν τα ένζυμα, χρειαζόμαστε μια κινητική περιγραφή της δραστηριότητάς τους. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.11. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Προτού μπορέσουμε να εξηγήσουμε με ακρίβεια αυτή τη γραφική παράσταση, χρειάζεται να κατανοήσουμε πώς παράγεται. Ας θεωρήσουμε ότι ένα ένζυμο καταλύει τη μετατροπή του  $S$  σε  $P$  με την ακόλουθη πορεία:



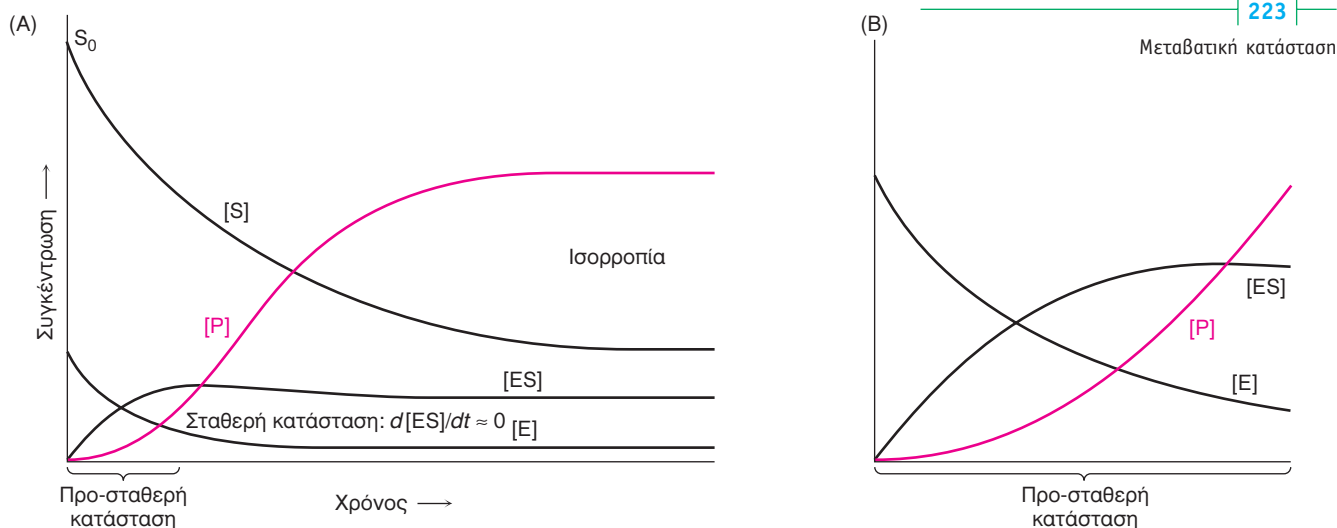
Η έκταση του σχηματισμού του προϊόντος προσδιορίζεται ως λειτουργία του χρόνου για μια σειρά συγκεντρώσεων του υποστρώματος (Εικόνα 8.12). Όπως αναμένεται, σε κάθε περίπτωση, η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται αυξάνεται με τον χρόνο, αν και τελικά φθάνει ο χρόνος όπου δεν υπάρχει καθαρή αλλαγή στις συγκεντρώσεις του  $S$  και του  $P$ . Το ένζυμο ακόμη μετατρέπεται ενεργά το υπόστρωμα σε προϊόν και τανάπαλιν, αλλά έχει επιτευχθεί το σημείο ισορροπίας της αντίδρασης. Η Εικόνα 8.13Α δείχνει τις αλλαγές που παρατηρούνται σε όλα τα στοιχεία που συμμετέχουν στην αντίδραση σε συνάρτηση με τον χρόνο έως ότου επιτευχθεί ισορροπία.

Η ενζυμική κινητική προσεγγίζεται πιο εύκολα εάν μπορούμε να αγνοήσουμε την αντίστροφη αντίδραση. Ορίζουμε τη  $V_0$  ως την ταχύτητα της αύξησης του προϊόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο όταν η  $[P]$  είναι χαμηλή· δηλαδή σε χρόνους κοντά στο μηδέν (όθεν,  $V_0$ ) (Εικόνα 8.13B). Επομένως, για τη γραφική παράσταση της Εικόνας 8.11, η  $V_0$  προσδιορίζεται για κάθε συγκέντρωση του υποστρώματος μετρώντας την ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος σε μικρούς χρόνους προτού συσσωρευθεί προϊόν (Εικόνα 8.12).

Αρχίζουμε την εξέταση της κινητικής της ενζυμικής δραστηριότητας με τη γραφική παράσταση της Εικόνας 8.11. Σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος  $[S]$ , η ταχύτητα  $V_0$  είναι σχεδόν ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος  $[S]$ , η ταχύτητα  $V$  είναι σχεδόν ανεξάρτητη από το  $[S]$ . Το 1913, ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα απλό μοντέλο που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι ότι ένα ειδικό σύμπλοκο  $ES$  είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στην κατάλυση. Το μοντέλο που προτάθηκε, το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι



Ένα ένζυμο  $E$  αντιδρά με το υπόστρωμα  $S$  για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο  $ES$  με μια κινητική σταθερά  $k_1$ . Το σύμπλοκο  $ES$  μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να διασπαστεί σε  $E$  και  $S$  με μια κινητική σταθερά  $k_{-1}$ , ή να σχηματίσει προϊόν  $P$  με μια κινητική σταθερά  $k_2$ . Πάλι, θεωρούμε ότι το προϊόν δεν επανέρχεται στο αρχικό υπόστρωμα, μια συνθήκη που ισχύει στο αρχικό στάδιο μιας αντίδρασης προτού η συγκέντρωση του προϊόντος αυξηθεί σημαντικά.



Θέλουμε μια σχέση που να συνδέει την ταχύτητα της κατάλυσης με τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του ενζύμου και με τις ταχύτητες των επιμέρους βημάτων. Το σημείο εκκίνησης είναι ότι η ταχύτητα κατάλυσης είναι ίση με το γινόμενο της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] επί την  $k_2$ .

$$V_0 = k_2[ES] \quad (10)$$

Τώρα χρειάζεται να εκφράσουμε το [ES] με όρους γνωστών ποσοτήτων. Οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του ES δίνονται από:

$$\text{Ταχύτητα σχηματισμού του ES} = k_1[E][S] \quad (11)$$

$$\text{Ταχύτητα διάσπασης του ES} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (12)$$

Για να απλοποιήσουμε τα πράγματα, θα δουλέψουμε με την παραδοχή της σταθερής κατάστασης (steady-state). Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων, στην περίπτωση αυτή το ES, παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Αυτό συμβαίνει όταν οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου ES είναι ίσες. Θέτοντας ίσα τα δεξιά μέλη των εξισώσεων 11 και 12 έχουμε

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (13)$$

Ανασχηματίζοντας την εξίσωση 13, έχουμε

$$[E][S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (14)$$

Η εξίσωση 14 μπορεί να απλοποιηθεί με τον ορισμό μιας νέας σταθεράς, της  $K_M$ , που ονομάζεται σταθερά Michaelis:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (15)$$

Επισημαίνεται ότι η  $K_M$  έχει μονάδες συγκέντρωσης. Η  $K_M$  είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος.

Βάζοντας την εξίσωση 15 μέσα στη εξίσωση 14 και λύνοντας για [ES] έχουμε

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (16)$$

**ΕΙΚΟΝΑ 8.13** Αλλαγές στη συγκέντρωση των ενώσεων που λαμβάνουν μέρος σε μια ενζυμική αντίδραση σε συνάρτηση με τον χρόνο. Αλλαγές συγκέντρωσης κάτω από συνθήκες (Α) σταθερής κατάστασης και (Β) προ-σταθερή κατάσταση.

Ας εξετάσουμε τώρα τον αριθμητή της εξίσωσης 16. Η συγκέντρωση του μη προσδεμένου υποστρώματος [S] είναι περίπου ίση με τη συγκέντρωση του συνολικού υποστρώματος, με την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ μικρότερη από εκείνη του υποστρώματος. Η συγκέντρωση του μη προσδεμένου ενζύμου [E] είναι ίση με εκείνη του ολικού ενζύμου [E]<sub>T</sub> μείον τη συγκέντρωση του συμπλόκου ES.

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (17)$$

Αντικαθιστώντας το [E] με [E]<sub>T</sub> - [ES] στην εξίσωση 16 έχουμε,

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{K_M} \quad (18)$$

Λύνοντας την εξίσωση 18 ως προς [ES] έχουμε

$$[ES] = \frac{[E]_T [S] / K_M}{1 + [S] / K_M} \quad (19)$$

ή

$$[ES] = \frac{[E]_T [S] / K_M}{1 + [S] / K_M} \quad (20)$$

Αντικαθιστώντας με τη σχέση αυτή το [ES] στην εξίσωση 10 έχουμε,

$$V_0 = k_2 [E]_T \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (21)$$

Η μέγιστη ταχύτητα  $V_{\max}$  επιτυγχάνεται όταν οι καταλυτικές περιοχές του ενζύμου είναι κορεσμένες με υπόστρωμα, δηλαδή όταν η [ES] = [E]<sub>T</sub>. Έτσι έχουμε

$$V_{\max} = k_2 [E]_T. \quad (22)$$

Τοποθετώντας την εξίσωση 22 στην εξίσωση 21 παράγεται η εξίσωση *Michaelis-Menten*:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (23)$$

Η εξίσωση αυτή εξηγεί τα κινητικά δεδομένα που δίνονται στην Εικόνα 8.11. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η [S] είναι πολύ μικρότερη από την  $K_M$ ,  $V_0 = (V_{\max}/K_M)[S]$  δηλαδή, η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η [S] είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ ,  $V_0 = V_{\max}$  δηλαδή, η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Η έννοια της  $K_M$  είναι προφανής από την εξίσωση 23. Όταν [S] =  $K_M$ , τότε  $V_0 = V_{\max}/2$ . Έτσι η  $K_M$  είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Η  $K_M$  είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό μιας ενζυμικής αντίδρασης και είναι σπουδαία για τη βιολογική λειτουργία.

Η φυσιολογική συνέπεια της  $K_M$  καταδεικνύεται από την ευαισθησία μερικών ατόμων στην αιθανόλη. Τέτοια άτομα μετά από κατανάλωση ακόμη και μικρών ποσοτήτων αλκοόλης παρουσιάζουν έξαψη προσώπου και ταχυκαρδία. Στο ήπαρ, η αλκοολική αφυδρογονάση μετατρέπει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη.





Φυσιολογικά, η ακεταλδεϋδη, η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι η αιτία των συμπτωμάτων, μετατρέπεται σε οξικό με την αφυδρογονάση της ακεταλδεϋδης.



Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν δύο μορφές της αφυδρογονάσης της ακεταλδεϋδης, μία του μιτοχονδρίου με χαμηλό  $K_M$  και μία του κυτοσολίου με υψηλό  $K_M$ . Σε ευπαθή άτομα, το μιτοχονδριακό ένζυμο είναι λιγότερο ενεργό λόγω της αντικατάστασης ενός μοναδικού αμινοξέος, και έτσι στην ακεταλδεϋδη επιδρά μόνο το ένζυμο του κυτοσολίου. Επειδή το ένζυμο αυτό έχει υψηλό  $K_M$ , λιγότερη ακεταλδεϋδη μετατρέπεται σε οξικό και ως εκ τούτου η περίσσεια ακεταλδεϋδης περνά στο αίμα, πράγμα που εξηγεί τα συμπτώματα.

#### 8.4.1 Η σπουδαιότητα των τιμών $K_M$ και $V_{\max}$



**CONCEPTUAL INSIGHTS, Steady-State Enzyme Kinetics:** Μάθετε πώς οι κινητικές παράμετροι  $K_M$  και  $V_{\max}$  μπορούν να προσδιοριστούν πειραματικά χρησιμοποιώντας το εργαστήριο προσομοίωσης ενζυμικής κινητικής σε αυτό το μάθημα των πολυμέσων.

Η σταθερά Michaelis,  $K_M$ , και η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{\max}$ , απορρέουν άμεσα από τις ταχύτητες της κατάλυσης που μετρώνται σε μια ποικιλία συγκεντρώσεων του υποστρώματος εάν ένα ένζυμο λειτουργεί σύμφωνα με το απλό σχήμα που δίνεται στην εξίσωση 23. Ο προσδιορισμός της  $K_M$  και της  $V_{\max}$  συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση των προγραμμάτων προσομοίωσης δεδομένων με τη βοήθεια ενός υπολογιστή (βλ. το παράρτημα του κεφαλαίου αυτού για εναλλακτικούς τρόπους προσδιορισμού των  $K_M$  και  $V_{\max}$ ). Οι τιμές της  $K_M$  των ενζύμων ποικίλουν (Πίνακας 8.5). Για τα περισσότερα ένζυμα, η  $K_M$  έχει τιμές μεταξύ  $10^{-1}$  και  $10^{-7}$  Μ. Η τιμή  $K_M$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η σταθερά Michaelis,  $K_M$ , έχει δύο έννοιες. Πρώτον, η  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί. Έτσι, η  $K_M$  παρέχει ένα μέτρο της συγκέντρωσης του υποστρώματος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί σημαντική κατάλυση. Πράγματι, για πολλά ένζυμα, πειραματικές

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.5** Τιμές  $K_M$  μερικών ενζύμων.

Ένζυμο	Υπόστρωμα	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )
Χυμοθρυψίνη	Ακετυλο-L-θρυπτοφαναμίδιο	5000
Λυσοζύμη	Εξα-N-ακετυλογλυκοζαμίνη	6
β-Γαλακτοζιτάση	Λακτόζη	4000
Απαμινάση της θρεονίνης	Θρεονίνη	5000
Ανθρακική ανυδράση	CO <sub>2</sub>	8000
Πενικιλινάση	Βενζυλοπενικιλίνη	50
Πυροσταφυλική καρβοξυλάση	Πυροσταφυλικό	400
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1000
	ATP	60
Συνθετάση του αργινινο-tRNA	Αργινίνη	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

ενδείξεις υποδηλώνουν ότι η  $K_M$  παρέχει μια προσέγγιση της συγκέντρωσης του υποστρώματος *in vivo*. Όταν η  $K_M$  είναι γνωστή, το κλάσμα των κέντρων που έχουν καταληφθεί,  $f_{ES}$ , σε οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (24)$$

Δεύτερον, η  $K_M$  σχετίζεται με τις κινητικές σταθερές των επιμέρους βημάτων στο καταλυτικό σχήμα που δίνεται στην εξίσωση 9. Στην εξίσωση 15, η  $K_M$  ορίζεται ως  $(k_{-1} + k_2)/k_1$ . Ας πάρουμε μια οριακή περίπτωση κατά την οποία η  $k_{-1}$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $k_2$ . Κάτω από αυτές τις περιστάσεις, το σύμπλοκο ES διασπάται σε E και S πολύ πιο γρήγορα από ό,τι σχηματίζεται το προϊόν. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ( $k_{-1} \gg k_2$ ),

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (25)$$

Η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES δίνεται από

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (26)$$

Με άλλα λόγια, η  $K_M$  είναι ίση με τη σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES εάν η  $k_2$  είναι πολύ μικρότερη από την  $k_{-1}$ . Όταν ισχύει η συνθήκη αυτή, η  $K_M$  παρέχει ένα μέτρο της δύναμης του συμπλόκου ES: η υψηλή τιμή της  $K_M$  δείχνει ασθενή πρόσδεση, ενώ η χαμηλή τιμή της  $K_M$  δείχνει ισχυρή πρόσδεση. Πρέπει να τονιστεί ότι η  $K_M$  δίνει ένα μέτρο της συγγένειας του συμπλόκου ES μόνο όταν η  $k_{-1}$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $k_2$ .

Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{\max}$ , αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής (turnover number) ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{\max}$ , ισούται με την κινητική σταθερά  $k_2$ , η οποία ονομάζεται και  $k_{\text{cat}}$ . Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{\max}$ , αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου εάν είναι γνωστή η συγκέντρωση των ενεργών κέντρων  $[E]_T$  διότι

$$V_{\max} = k_2 [E]_T$$

οπότε

$$k_2 = V_{\max}/[E]_T \quad (27)$$

Παραδείγματος χάριν, ένα διάλυμα ανθρακικής ανυδράσης  $10^{-6}$  M, όταν είναι πλήρως κορεσμένη με υπόστρωμα, καταλύει τον σχηματισμό 0,6 M  $\text{H}_2\text{CO}_3$  ανά δευτερόλεπτο. Ως εκ τούτου, η  $k_2$  ισούται με  $6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ . Αυτός ο αριθμός μετατροπής είναι ένας από τους μεγαλύτερους που είναι γνωστός. Κάθε γύρος κατάλυσης γίνεται σε χρόνο ίσο με  $1/k_2$ , ο οποίος για την ανθρακική ανυδράση ισούται με 1,7 μs. Ο αριθμός μετατροπής των περισσότερων ενζύμων με τα φυσιολογικά υποστρώματά τους κυμαίνεται από 1 έως  $10^4$  ανά δευτερόλεπτο (Πίνακας 8.6).

#### 8.4.2 Η κινητική τελειότητα στην ενζυμική κατάλυση: Το κριτήριο $k_{\text{cat}}/K_M$

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ , η ταχύτητα κατάλυσης είναι ίση με την  $k_{\text{cat}}$ , τον αριθμό μετατροπής, όπως περιγράφηκε στο Εδάφιο 8.4.1. Εντούτοις, τα περισσότερα ένζυμα δεν είναι συνήθως κορεσμένα με υπόστρωμα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο λόγος  $[S]/K_M$  κυμαίνεται τυπικά μεταξύ 0,01 και 1,0. Όταν  $[S] \ll K_M$ , η ενζυμική ταχύτητα είναι πολύ μικρότερη από την  $k_{\text{cat}}$ , διότι τα περισσότερα από τα ενεργά

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.6** Μέγιστοι αριθμοί μετατροπής μερικών ενζύμων.

Ένζυμο	Αριθμός μετατροπής (ανά δευτερόλεπτο)
Ανθρακική ανυδράση	600, 000
Ισομεράση των 3-κετοστεροειδών	280, 000
Ακετυλοχολινεστεράση	25, 000
Πενικιλινάση	2, 000
Γαλακτική Αφυδρογονάση	1, 000
Χυμοθρυψίνη	100
DNA πολυμεράση I	15
Συνθετάση της θρυποφάνης	2
Λυσοζύμη	0,5

γά κέντρα δεν έχουν καταληφθεί από το υπόστρωμα. Υπάρχει κάποια ποσότητα που να χαρακτηρίζει την κινητική ενός ενζύμου κάτω από αυτές τις περισσότερες τυπικές κυτταρικές συνθήκες; Πράγματι υπάρχει, όπως μπορεί να δειχθεί εάν συνδυάσουμε τις εξισώσεις 10 και 16 για να δώσουν

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [E][S]. \quad (28)$$

Όταν  $[S] \ll K_M$ , η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου,  $[E]$ , είναι σχεδόν ίση με την ολική συγκέντρωση του ενζύμου  $[E]_T$ , και έτσι έχουμε

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [S][E]_T. \quad (29)$$

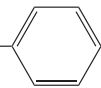
Έτσι, όταν  $[S] \ll K_M$ , η ενζυμική ταχύτητα εξαρτάται από τις τιμές των  $k_{\text{cat}}/K_M$ ,  $[S]$  και  $[E]_T$ . Κάτω από τις συνθήκες αυτές, ο λόγος  $k_{\text{cat}}/K_M$  είναι η κινητική σταθερά για την αλληλεπίδραση του S και του E και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέτρο της καταλυτικής αποτελεσματικότητας. Παραδείγματος χάριν, χρησιμοποιώντας τις τιμές  $k_{\text{cat}}/K_M$  μπορούμε να συγκρίνουμε την προτίμηση ενός ενζύμου για διαφορετικά υποστρώματα. Ο Πίνακας 8.7 δείχνει τις τιμές  $k_{\text{cat}}/K_M$  για αρκετά διαφορετικά υποστρώματα της χυμοθρυψίνης (Εδάφιο 9.1.1). Η χυμοθρυψίνη έχει σαφώς προτίμηση να διασπά πεπτιδικούς δεσμούς κοντά σε ογκώδεις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες.

Πόσο αποτελεσματικό μπορεί να γίνει ένα ένζυμο; Μπορούμε να προσεγγίσουμε την ερώτηση αυτή προσδιορίζοντας εάν υπάρχουν φυσικά όρια στην τιμή του λόγου  $k_{\text{cat}}/K_M$ . Επισημαίνεται ότι ο λόγος αυτός εξαρτάται από τις  $k_1$ ,  $k_{-1}$  και  $k_2$ , όπως μπορεί να αποδειχθεί εάν αντικαταστήσουμε το  $K_M$ :

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{cat}}}{k_{-1} + k_{\text{cat}}/k_1} = \frac{K_{\text{cat}}}{k_{\text{cat}} + k_{-1}} k_1 < k_1. \quad (30)$$

Ας υποθέσουμε ότι η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος ( $k_{\text{cat}}$ ) είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάσπασης του συμπλόκου ES ( $k_{-1}$ ). Τότε η τιμή  $k_{\text{cat}}/K_M$  πλησιάζει την  $k_1$ . Έτσι το ανώτατο όριο στην τιμή του  $k_{\text{cat}}/K_M$  καθορίζεται από την  $k_1$ , δηλαδή την ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου ES. Αυτή η ταχύτητα δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη συχνότητα συνάντησης ενός ενζύμου με το υπόστρωμά του, που εξαρτάται αποκλειστικά από το φαινόμενο της διάχυσης. Η διάχυση περιορίζει την τιμή της  $k_1$  έτσι ώστε δεν μπορεί να είναι υψηλότερη από τα όρια  $10^8$  και  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ως εκ τούτου, το ανώτερο όριο του λόγου  $k_{\text{cat}}/K_M$  είναι μεταξύ  $10^8$  και  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.7** Προτιμήσεις της χυμοθρυψίνης για υποστρώματα.

Αμινοξύ στον εστερά	Πλευρική αλυσίδα αμινοξέος	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )
Γλυκίνη	—H	$1,3 \times 10^{-1}$
Βαλίνη	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{—CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,0
Νορβαλίνη	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3,6 \times 10^2$
Νορλευκίνη	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3,0 \times 10^3$
Φαινυλαλανίνη	—CH <sub>2</sub> — 	$1,0 \times 10^5$

Πηγή: Κατά A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

**Φαινόμενο της Κίρκης—**

Η χρησιμοποίηση ελκτικών δυνάμεων για την προσέλκυση ενός υποστρώματος σε μια περιοχική μέσα στην οποία υφίσταται έναν μετασχηματισμό της δομής του, όπως ορίζεται από τον William P. Jencks, έναν ενζυμολόγο ο οποίος επινόησε τον όρο.

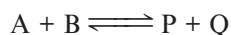
Η Κίρκη, γυναικεία μορφή της ελληνικής μυθολογίας, προσέλκυσε τους άνδρες του Οδυσσέα στο σπίτι της και τους μεταμόρφωσε σε χοίρους.

Οι λόγοι  $k_{cat}/K_M$  των ενζύμων δισμουτάση του σουπεροξειδίου, ακετυλοχολινεστεράση και ισομεράση των φωσφορικών τριοζών είναι μεταξύ  $10^8$  και  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ένζυμα όπως αυτά, τα οποία έχουν τους λόγους  $k_{cat}/K_M$  στο ανώτατο όριο, έχουν επιτύχει την *κινητική τελειότητα*. Η καταλυτική τους ταχύτητα περιορίζεται μόνον από τον ρυθμό με τον οποίο συναντούν το υπόστρωμα μέσα στο διάλυμα (Πίνακας 8.8). Κάθε επιπρόσθετο κέρδος στην καταλυτική ταχύτητα προέρχεται μόνο από την ελάττωση του χρόνου διάχυσης. Υπενθυμίζεται ότι το ενεργό κέντρο είναι μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής δομής του ενζύμου. Ακόμη, για τα καταλυτικά τέλεια ένζυμα, κάθε συνάντηση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος είναι παραγωγική. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να υπάρχουν ελκτικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις οι οποίες προσελκύουν το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο. Οι δυνάμεις αυτές αναφέρονται μερικές φορές ποιητικά ως *φαινόμενο της Κίρκης* (Circe effects).

Το όριο που επιβάλλεται από τον ρυθμό της διάχυσης στο διάλυμα μπορεί να ξεπεραστεί εν μέρει με τον περιορισμό των υποστρωμάτων και των προϊόντων στον περιορισμένο όγκο ενός πολυενζυμικού συμπλόκου. Πράγματι, μερικές σειρές ενζύμων είναι συνδεδεμένες σε οργανωμένα συγκροτήματα (Εδάφιο 17.1.9) έτσι ώστε το προϊόν του ενός ενζύμου να βρίσκεται πολύ γρήγορα από το επόμενο ένζυμο. Κατ' ουσίαν, τα προϊόντα διοχετεύονται από το ένα ένζυμο στο άλλο, όπως σε μια γραμμή παραγωγής.

### 8.4.3 Οι περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν πολλαπλά υποστρώματα

Οι περισσότερες αντιδράσεις στα βιολογικά συστήματα περιλαμβάνουν συνήθως δύο υποστρώματα και δύο προϊόντα και αντιπροσωπεύονται από την αντίδραση δύο υποστρωμάτων:



Η πλειονότητα τέτοιων αντιδράσεων χρειάζονται τη μεταφορά μιας λειτουργικής ομάδας, όπως είναι η φωσφορική ή μια ομάδα αμμωνίου, από το ένα υπόστρωμα στο άλλο. Στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μεταξύ των υποστρωμάτων. Αντιδράσεις πολλαπλών υποστρωμάτων μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: τη *διαδοχική αντικατάσταση* και τη *διπλή αντικατάσταση*.

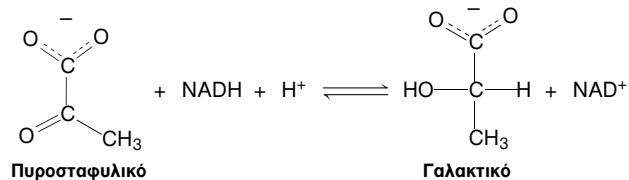
**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.8** Ένζυμα των οποίων ο λόγος  $k_{cat}/K_M$  πλησιάζει την ελεγχόμενη από τη διάχυση ταχύτητα της συνάντησης.

Ένζυμο	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
Ακετυλοχολινεστεράση	$1,6 \times 10^8$
Ανθρακική ανυδράση	$8,3 \times 10^7$
Καταλάση	$4 \times 10^7$
Κροτωνάση	$2,8 \times 10^8$
Φουμαράση	$1,6 \times 10^8$
Ισομεράση των φωσφορικών τριοζών	$2,4 \times 10^8$
$\beta$ -Λακταμάση	$1 \times 10^8$
Δισμουτάση του σουπεροξειδίου	$7 \times 10^9$

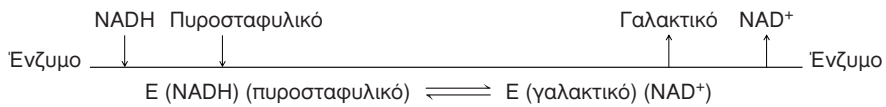
Πηγή: Κατά A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 4.5.

**Διαδοχική αντικατάσταση.** Στον διαδοχικό μηχανισμό όλα τα υποστρώματα πρέπει να προσδεθούν στο ένζυμο προτού απελευθερωθεί οποιοδήποτε προϊόν. Συνεπώς, σε μια αντίδραση δύο υποστρωμάτων σχηματίζεται ένα *τριμερές σύμπλοκο* του ενζύμου και των δύο υποστρωμάτων. Υπάρχουν δύο τύποι διαδοχικού μηχανισμού: ο διατεταγμένος, στον οποίο τα υποστρώματα προσδένονται στο ένζυμο με μια καθορισμένη σειρά, και ο τυχαίος.

Πολλά ένζυμα που έχουν ως υπόστρωμα  $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADH}$  εμφανίζουν τον διαδοχικό διατεταγμένο μηχανισμό. Ας πάρουμε τη γαλακτική αφυδρογονάση, ένα σημαντικό ένζυμο στον μεταβολισμό της γλυκόζης (Εδάφιο 16.1.9). Το ένζυμο αυτό ανάγει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό ενώ οξειδώνει το  $\text{NADH}$  σε  $\text{NAD}^+$ .

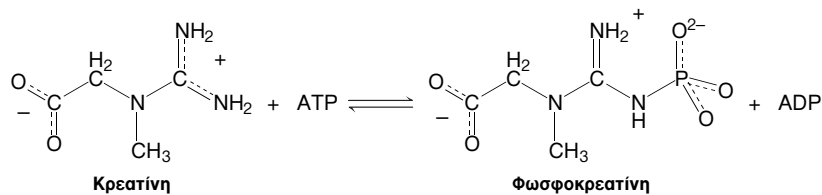


Στον διατεταγμένο διαδοχικό μηχανισμό, το συνένζυμο προσδένεται πάντοτε πρώτο και το γαλακτικό απελευθερώνεται πάντοτε πρώτο. Αυτή η σειρά μπορεί να αντιπροσωπευθεί με μια σημειογραφία που αναπτύχθηκε από τον W. Wallace Cleland:

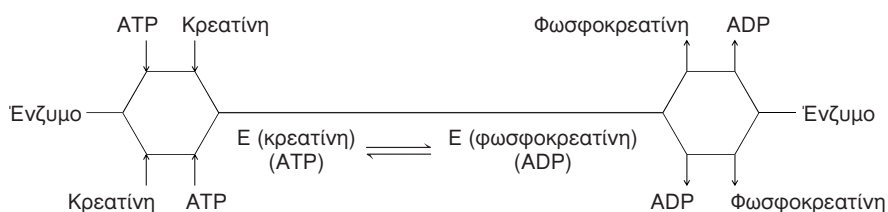


Το ένζυμο υπάρχει ως ένα τριμερές σύμπλοκο: πρώτα *απαρτίζεται* από το ένζυμο και τα υποστρώματα και, μετά την κατάλυση, από το ένζυμο και τα προϊόντα.

Στον τυχαίο διαδοχικό μηχανισμό, η σειρά της προσθήκης των υποστρωμάτων και της απελευθέρωσης των προϊόντων είναι τυχαία. Διαδοχικές τυχαίες αντιδράσεις απεικονίζονται από τον σχηματισμό της φωσφοκρεατίνης και της  $\text{ADP}$  από την  $\text{ATP}$  και την κρεατίνη, μια αντίδραση που καταλύεται από την κινάση της κρεατίνης (Εδάφιο 14.1.5).

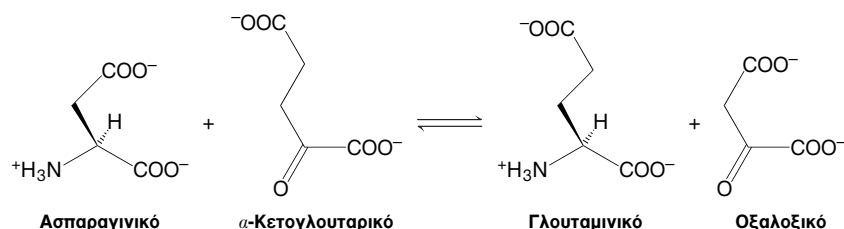


Η φωσφοκρεατίνη είναι μια σημαντική πηγή ενέργειας στους μυς. Διαδοχικές τυχαίες αντιδράσεις μπορούν να παρασταθούν με τη σημειογραφία του Cleland.

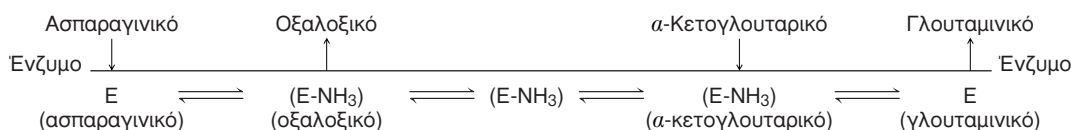


Αν και η σειρά κάποιων γεγονότων είναι τυχαία, η αντίδραση γίνεται μέσω των τριμερών συμπλόκων περιλαμβάνοντας πρώτα τα υποστρώματα και μετά τα προϊόντα.

**Αντιδράσεις διπλής αντικατάστασης.** Στις αντιδράσεις διπλής αντικατάστασης, ή αντιδράσεις πινγκ-πονγκ, απελευθερώνονται ένα ή περισσότερα προϊόντα προτού προσδεθούν όλα τα υποστρώματα στο ένζυμο. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό στις αντιδράσεις διπλής αντικατάστασης είναι η ύπαρξη ενός υποκατεστημένου ενζυμικού ενδιάμεσου, στο οποίο το ένζυμο είναι προσωρινά τροποποιημένο. Αντιδράσεις που μετακινούν αμινικές ομάδες μεταξύ αμινοξέων και  $\alpha$ -κετοξέων είναι κλασικά παραδείγματα των μηχανισμών διπλής αντικατάστασης. Το ένζυμο ασπαραγινική αμινομεταφοράση (Εδάφιο 23.3.1) καταλύει τη μεταφορά μιας αμινικής ομάδας από το ασπαραγινικό στο  $\alpha$ -κετογλουταρικό.



Η σειρά των γεγονότων μπορεί να εικονογραφηθεί με το ακόλουθο διάγραμμα.

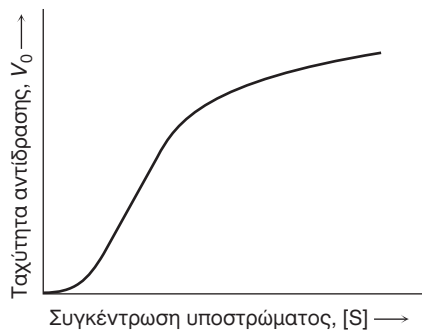


Μετά την πρόσδεση του ασπαραγινικού στο ένζυμο, το ένζυμο αφαιρεί την αμινική ομάδα του ασπαραγινικού από το υποκατεστημένο ενζυμικό ενδιάμεσο. Στη συνέχεια αποχωρεί το πρώτο προϊόν, το οξαλοξικό. Το δεύτερο υποστρώμα, το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, δέχεται την αμινική ομάδα από το τροποποιημένο ένζυμο και στη συνέχεια απελευθερώνεται το γλουταμινικό ως το τελικό προϊόν. Στη σημειογραφία του Cleland, τα υποστρώματα εμφανίζονται να αναπηδούν επάνω στο ένζυμο κατ' αναλογία με το μπαλάκι του πινγκ-πονγκ που αναπηδά επάνω σε ένα τραπέζι.

#### 8.4.4 Τα αλλοστερικά ένζυμα δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten

Το μοντέλο Michaelis-Menten έχει επηρεάσει πολύ την ανάπτυξη της χημείας των ενζύμων. Η ελκυστικότητά του έγκειται στην απλότητά του και την ευρεία εφαρμογή του. Εντούτοις, οι κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων δεν μπορούν να εξηγηθούν με το μοντέλο Michaelis-Menten. Μια σημαντική ομάδα ενζύμων τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten περιλαμβάνει τα αλλοστερικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα.

Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν συχνά σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις (Εικόνα 8.14) της ταχύτητας της αντίδρασης  $V_0$  σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , παρά ορθογώνιες υπερβολές που προβλέπονται από την εξίσωση Michaelis-Menten (εξίσωση 23). Στα αλλοστερικά ένζυμα, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων στο ίδιο μόριο. Ένα πιθανό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής μεταξύ υπομονάδων είναι ότι η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται *συνεργειακά*, δηλαδή, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο διευκολύνει την πρόσδεση στα άλλα ενεργά κέντρα. Όπως θα περιγραφεί στο Κεφάλαιο 10, από τέτοια συνεργειακό-



**ΕΙΚΟΝΑ 8.14** Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

τητα προκύπτει μια σιγμοειδής γραφική παράσταση της  $V_0$  σε συνάρτηση με το  $[S]$ . Επιπλέον, η δραστηριότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα. Με τον τρόπο αυτό οι καταλυτικές ιδιότητες των αλλοστερικών ενζύμων μπορούν να ρυθμιστούν για να αντιμετωπιστούν οι άμεσες ανάγκες ενός κυττάρου (Κεφάλαιο 10). Για τον λόγο αυτό, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες του κυττάρου.

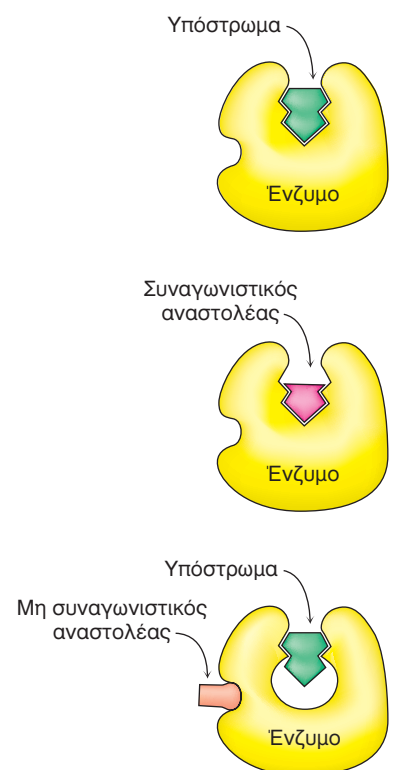
## 8.5 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΕΙΝΑΙ ΔΥΝΑΤΟΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΑΛΟΥΝ ΑΠΟ ΕΙΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Η ρύθμιση των αλλοστερικών ενζύμων τυποποιεί το είδος του ελέγχου. Επιπλέον, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής ενζύμων. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης: κατάλοιπα κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων. Η αξία των αναλόγων της μεταβατικής κατάστασης ως δυναμικών αναστολέων θα συζητηθεί παρακάτω.

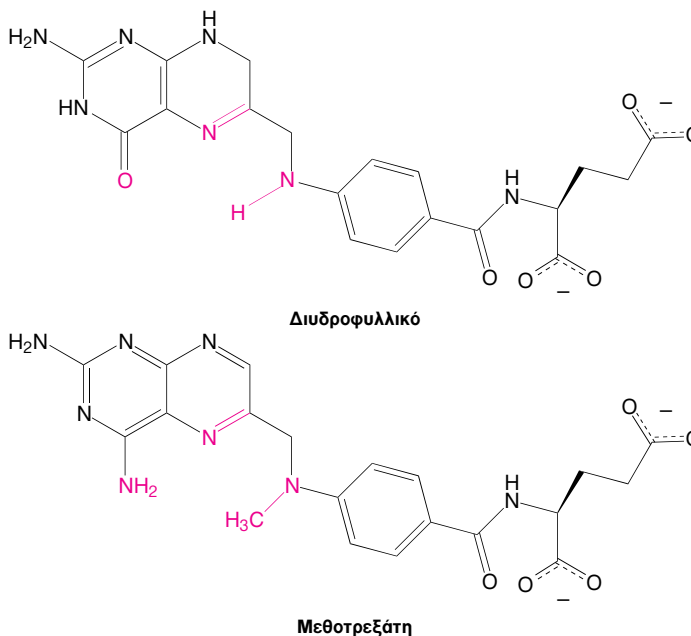
Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι πολύ σπουδαία φάρμακα. Η πενικιλίνη δρα τροποποιώντας ομοιοπολικά το ένζυμο τρανσπεπτιδάση και ως εκ τούτου σκοτώνει τα βακτήρια εμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Εδάφιο 8.5.5). Η ασπιρίνη δρα τροποποιώντας ομοιοπολικά την κυκλοξυγονάση, ελαττώνοντας τη σύνθεση των φλεγμονωδών σημάτων.

Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 8.15). Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Η μεθοτρεξάτη είναι ένα δομικό ανάλογο του διυδροφυλλικού, ενός υποστρώματος του ενζύμου αναγωγή του διυδροφυλλικού, το οποίο παίζει ρόλο στη βιοσύνθεση των πουρινών και πυριμιδινών (Εικόνα 8.16). Προσδέεται στην αναγωγή του διυδροφυλλικού 1000 φορές πιο στέρεα από ό,τι το φυσικό υπόστρωμα και αναστέλλει τη σύνθεση των βάσεων των νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης (Εικόνα 8.15). Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που εί-



**ΕΙΚΟΝΑ 8.15** Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. (Επάνω) σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος· (μέσον) ένας συναγωνιστικός αναστολέας προσδέεται στο ενεργό κέντρο και έτσι εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος· (κάτω) ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δεν εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.16 Αναστολείς ενζύμων.**

Το υπόστρωμα διυδροφυλλικό και το δομικό του ανάλογο μεθοτρεξάτη. Περιοχές με δομικές διαφορές δείχνονται με κόκκινο.

ναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ένα πιο περίπλοκο σχήμα, που ονομάζεται *μεικτή αναστολή*, παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

### 8.5.1 Η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή είναι κινητικά διάκριτες

Πώς μπορούμε να προσδιορίσουμε εάν ένας αναστολέας δρα με συναγωνιστική ή μη συναγωνιστική αναστολή; Ας πάρουμε μόνο τα ένζυμα που επιδεικνύουν την κινητική Michaelis-Menten. Οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα έχουν σκοπό τη διάκριση μεταξύ συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής αναστολής. Στη *συναγωνιστική αναστολή*, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση

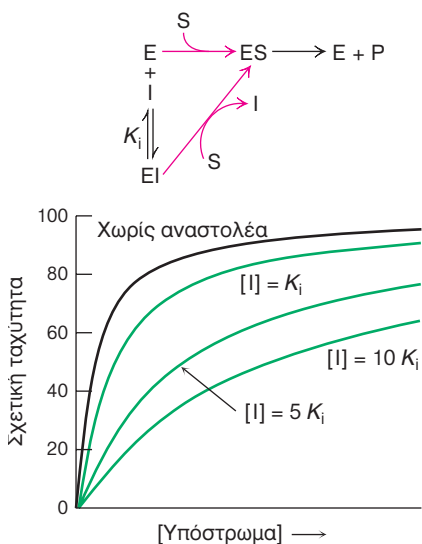
$$K_i = [E][I]/[EI]$$

Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φθάσει τη μέγιστη τιμή της ( $V_{\max}$ ) (Εικόνα 8.17), διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η *σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής* είναι ότι μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της  $K_M$  μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της  $K_M$ , που καλείται  $K_M^{\text{app}}$ , είναι αριθμητικά ίση με

$$K_M^{\text{app}} = K_M(1 + [I]/K_i)$$

όπου  $[I]$  είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_i$  είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή  $[I]$ , αυξάνεται και η τιμή  $K_M^{\text{app}}$  (Εικόνα 8.17). Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια  $V_{\max}$  όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.

Στη *μη συναγωνιστική αναστολή* (Εικόνα 8.18), το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο εν-

**ΕΙΚΟΝΑ 8.17 Κινητική ενός συναγωνιστικού**

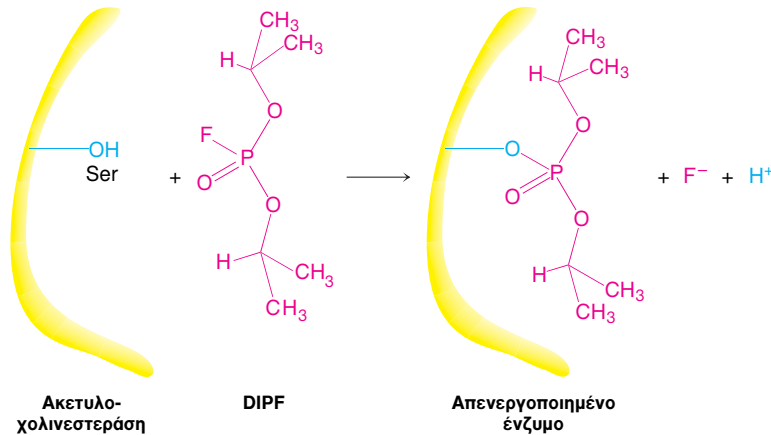
**αναστολέα.** Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.



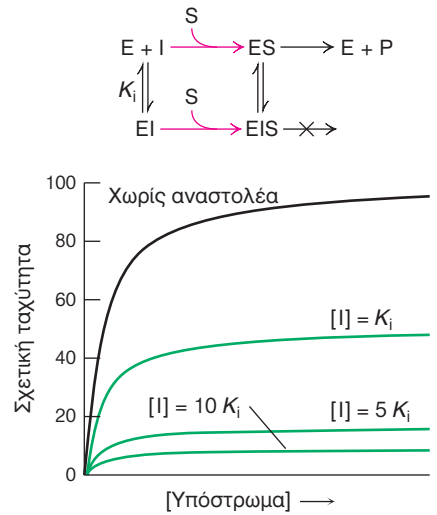
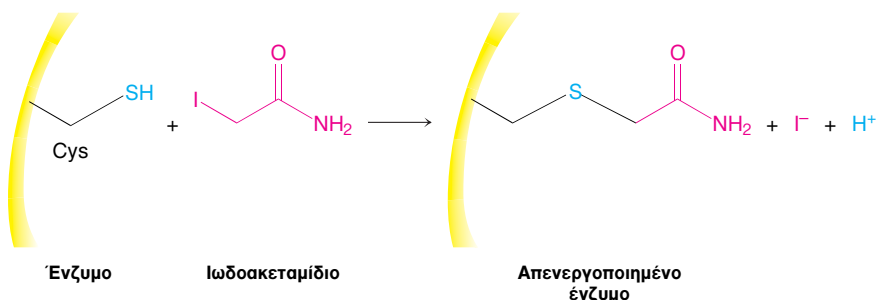
ζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της  $V_{max}$  ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται  $V_{max}^{app}$  ενώ δεν αλλάζει η τιμή της  $K_M$ . Γιατί ελαττώνεται η  $V_{max}$  ενώ η  $K_M$  παραμένει αμετάβλητη; Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου· η  $V_{max}$  είναι μικρότερη αλλά η  $K_M$  είναι η ίδια. Η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

### 8.5.2 Μη αντιστρεπτοί αναστολείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου

Στο Κεφάλαιο 9 θα εξετάσουμε τις χημικές λεπτομέρειες για το πώς λειτουργούν τα ένζυμα. Το πρώτο βήμα για να αποκτήσουμε τον χημικό μηχανισμό ενός ενζύμου είναι να προσδιορίσουμε ποιες λειτουργικές ομάδες απαιτούνται για τη δραστηριότητά του. Πώς μπορούμε να προσδιορίσουμε αυτές τις λειτουργικές ομάδες; Μια προσέγγιση δίνει η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X (Εδάφιο 4.5.2) του ενζύμου που είναι προσδεμένο στο υπόστρωμά του. Έναν εναλλακτικό και συχνά συμπληρωματικό τρόπο για τη διεκρίνιση των λειτουργικών ομάδων δίνουν οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς οι οποίοι προσδένονται ομοιοπολικά στο ένζυμο και οι οποίοι μπορούν να αναγνωριστούν. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: αντιδραστήρια με εξειδίκευση ομάδας, ανάλογα υποστρωμάτων και αναστολείς αυτοκτονίας.



Τα αντιδραστήρια με εξειδίκευση ομάδας αντιδρούν με ειδικές ομάδες R των αμινοξέων. Δύο παραδείγματα αντιδραστηρίων με εξειδίκευση ομάδας είναι το διισοπροπυλοφωσφοφθορίδιο (DIPF, Εικόνα 8.19) και το ιωδοακεταμίδιο (Εικόνα 8.20). Το DIPF τροποποιεί ένα από τα 28 κατάλοιπα σερίνης του πρωτεολυτικού ενζύμου χυμοθρυψίνη, υποδηλώνοντας ότι ειδικά αυτό το κατάλοιπο της σερίνης είναι ενεργό. Όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 9, είναι πραγ-



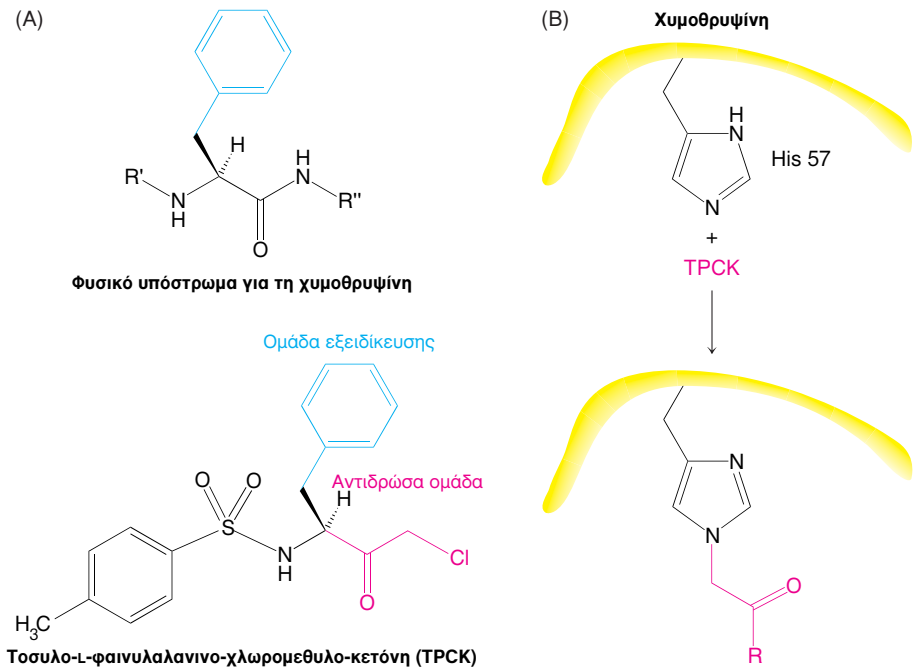
**ΕΙΚΟΝΑ 8.18** Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς, η ταχύτητα δεν μπορεί να φθάσει τη μέγιστη τιμή  $V_{max}$  ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.19** Ενζυμική αναστολή από διισοπροπυλοφωσφοφθορίδιο (DIPF), ένα αντιδραστήριο με εξειδίκευση ομάδας. Το DIPF μπορεί να αναστείλει ένα ένζυμο με ομοιοπολική τροποποίηση ενός σημαντικού καταλοίπου σερίνης (Εδάφιο 9.1.1).

**ΕΙΚΟΝΑ 8.20** Ενζυμική αναστολή από ιωδοακεταμίδιο, ένα αντιδραστήριο με εξειδίκευση ομάδας. Το ιωδοακεταμίδιο μπορεί να απενεργοποιήσει ένα ένζυμο αντιδρώντας με ένα απαραίτητο κατάλοιπο κυστεΐνης.

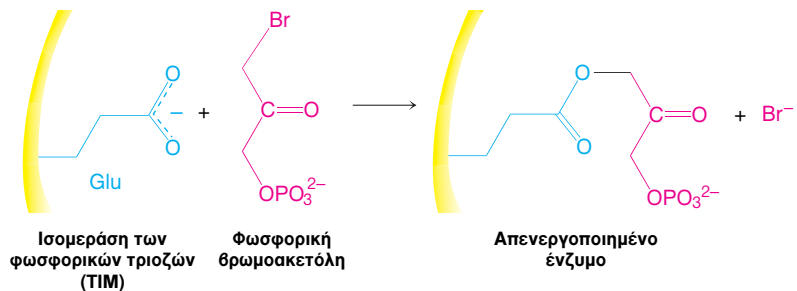
ματικά η περίπτωση που αυτό το κατάλοιπο της σερίνης βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Επίσης, το DIPF αποκάλυψε ένα ενεργό κατάλοιπο σερίνης στην ακετυλοχολινεστεράση, ένα σημαντικό ένζυμο στη διαβίβαση των νευρικών ώσεων (Εικόνα 8.19). Έτσι, το DIPF και παρόμοιες ενώσεις που προσδένονται στην ακετυλοχολινεστεράση και την απενεργοποιούν είναι δυνητικά νευροτοξικά αέρια.

Οι *ιχνηθέτες συγγένειας* (affinity labels) είναι μόρια δομικά παρόμοια με το υπόστρωμα του ενζύμου, τα οποία τροποποιούν ομοιοπολικά τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Έτσι, είναι περισσότερο εξειδικευμένα για το ενεργό κέντρο παρά αντιδραστήρια με εξειδίκευση ομάδας. Η τοσυλο-L-φαινυλαλανινο-χλωρομεθυλο-κετόνη (TPCK) είναι ένα ανάλογο υποστρώματος της χυμοθρυψίνης (Εικόνα 8.21). Η TPCK προσδένεται στο ενεργό κέντρο και στη συνέχεια αντιδρά μη αντιστρεπτά με ένα κατάλοιπο ιστιδίνης στην περιοχή αυτή, αναστέλλοντας το ένζυμο. Η ένωση φωσφορική 3-βρωμοακετόλη είναι ένας ιχνηθέτης συγγένειας για το ένζυμο ισομεράση των φωσφορικών τριοζών (TIM). Μιμείται το φυσιολογικό υπόστρωμα φωσφορική διυδροξυακετόνη με το να προσδένεται στο ενεργό κέντρο, και στη συνέχεια τροποποιεί ομοιοπολικά το ένζυμο με τέτοιο τρόπο που το ένζυμο αναστέλλεται μη αντιστρεπτά (Εικόνα 8.22).

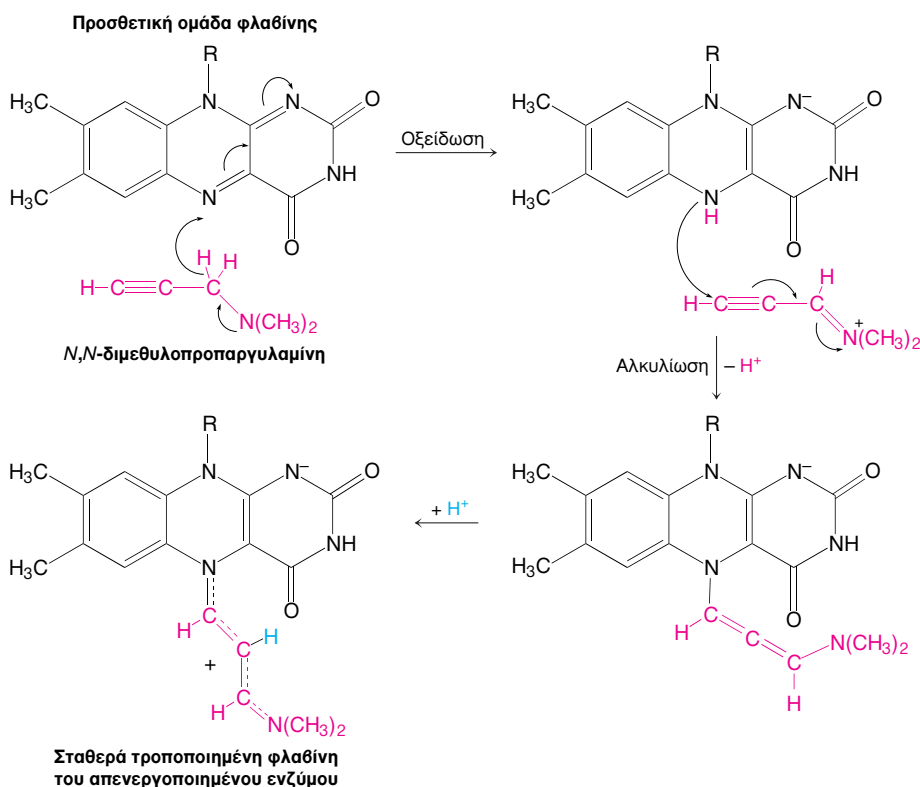


**ΕΙΚΟΝΑ 8.21** Σήμανση συγγένειας. (Α) Η τοσυλο-L-φαινυλαλανινο-χλωρομεθυλο-κετόνη (TPCK) είναι ένα ενεργό ανάλογο του κανονικού υποστρώματος της χυμοθρυψίνης. (Β) Η TPCK προσδένεται στο ενεργό κέντρο της χυμοθρυψίνης και τροποποιεί ένα απαραίτητο κατάλοιπο ιστιδίνης.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.22** Φωσφορική βρωμοακετόλη, ένας ιχνηθέτης συγγένειας για την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών (TIM). Η φωσφορική βρωμοακετόλη, ένα ανάλογο της φωσφορικής διυδροξυακετόνης, προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και τροποποιεί ομοιοπολικά ένα κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος που απαιτείται για την ενζυμική δραστηριότητα.

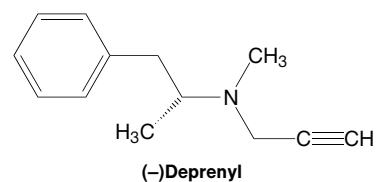


Οι *αναστολείς αυτοκτονίας* (suicide inhibitors) ή *αναστολείς μηχανισμού* είναι τροποποιημένα υποστρώματα που παρέχουν τους πλέον ειδικούς τρόπους για να τροποποιηθεί το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου. Ο αναστολέας προσδένεται στο ένζυμο, όπως ένα υπόστρωμα, και αρχικά υφίσταται επεξεργασία από τον



**ΕΙΚΟΝΑ 8.23 Αναστολή μηχανισμού (αυτοκτονίας).** Η οξειδάση των μονοαμινών, ένα ένζυμο σημαντικό για τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών, χρειάζεται τον συμπράγοντα FAD (φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο). Η  $N,N$ -διμεθυλοπροπαργουλαμίνη τροποποιώντας ομοιοπολικά την προσθετική ομάδα φλαβίνης μόνο μετά την οξειδωση του αναστολέα. Το προϊόν προσθήκης N-5 της φλαβίνης σταθεροποιείται από την προσθήκη ενός πρωτονίου.

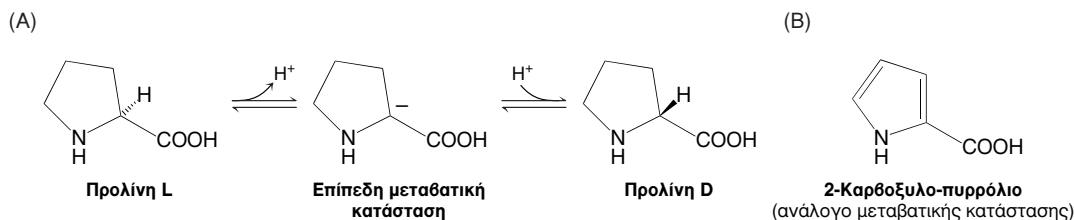
φυσιολογικό καταλυτικό μηχανισμό. Στη συνέχεια ο μηχανισμός κατάλυσης παράγει ένα χημικά ενεργό ενδιάμεσο το οποίο απενεργοποιεί το ένζυμο μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης. Το γεγονός ότι το ένζυμο συμμετέχει στη δική του μη αντιστρεπτή αναστολή υποδηλώνει ότι η ομοιοπολικά τροποποιημένη ομάδα είναι καταλυτικά ζωτική. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου αναστολέα είναι η  $N,N$ -διμεθυλοπροπαργουλαμίνη. Μια προσθετική ομάδα φλαβίνης της οξειδάσης των μονοαμινών (MAO) οξειδώνει την  $N,N$ -διμεθυλοπροπαργουλαμίνη, η οποία με τη σειρά της απενεργοποιεί το ένζυμο, τροποποιώντας ομοιοπολικά την προσθετική ομάδα της φλαβίνης με αλκυλίωση του N-5 (Εικόνα 8.23). Η οξειδάση των μονοαμινών απαμινώνει νευροδιαβιβαστές, όπως η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη, ελαττώνοντας τα επίπεδά τους στον εγκέφαλο. Η νόσος Parkinson συνδέεται με χαμηλά επίπεδα σεροτονίνης. Το φάρμακο (-)deprenyl, το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία της νόσου Parkinson και της κατάθλιψης, είναι ένας αναστολέας αυτοκτονίας της οξειδάσης των μονοαμινών.



### 8.5.3 Τα ανάλογα της μεταβατικής κατάστασης είναι ισχυροί αναστολείς των ενζύμων

Στρεφόμεστε τώρα στις ενώσεις που παρέχουν τις πιο οικείες απόψεις για αυτή καθεαυτή την καταλυτική πορεία. Το 1948 ο Linus Pauling διατύπωσε την άποψη ότι ενώσεις που μοιάζουν με τη μεταβατική κατάσταση μιας καταλυόμενης αντίδρασης θα πρέπει να είναι πολύ αποτελεσματικοί αναστολείς των ενζύμων. Αυτοί οι μιμητές καλούνται *ανάλογα μεταβατικής κατάστασης*. Η αναστολή της ρακεμάσης της προλίνης είναι ένα διδακτικό παράδειγμα. Η ρακεμοποίηση της προλίνης προχωρά μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης στην οποία το τετραεδρικό άτομο άνθρακα έχει γίνει τριγωνικό με την απώλεια ενός πρωτονίου (Εικόνα 8.24). Στην τριγωνική μορφή, και οι τρεις δεσμοί βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο· ο  $C_\alpha$  επίσης μεταφέρει ένα καθαρό αρνητικό φορτίο. Αυτό το συμμετρικό καρβανιόν μπορεί να πρωτονιωθεί στη μια πλευρά για να δώσει το L-ισομερές ή στην άλλη πλευρά για να δώσει το D-ισομερές. Αυτή η εικόνα

υποστηρίζεται από το εύρημα ότι ο αναστολέας 2-καρβοξυλο-πυρρόλιο προσδένεται στη ρακεμάση 160 φορές πιο ισχυρά από ό,τι η προλίνη. Το άτομο του  $\alpha$ -άνθρακα αυτού του αναστολέα, όπως εκείνο της μεταβατικής κατάστασης, είναι τριγωνικό. Ένα ανάλογο το οποίο επίσης φέρει ένα αρνητικό φορτίο στον  $C_{\alpha}$  θα αναμενόταν να προσδένεται ακόμη πιο ισχυρά. Γενικά, συντιθέμενες ενώσεις που μοιάζουν περισσότερο στη μεταβατική κατάσταση από ό,τι αυτό καθαυτό το υπόστρωμα μπορούν να παράγουν πολύ ισχυρούς και ειδικούς αναστολείς των ενζύμων. Η ανασταλτική ισχύς των αναλόγων της μεταβατικής κατάστασης υπογραμμίζει την ουσία της κατάλυσης: *επιλεκτική πρόσδεση της μεταβατικής κατάστασης*.



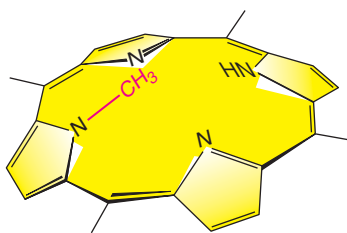
**ΕΙΚΟΝΑ 8.24 Αναστολή με ανάλογα μεταβατικής κατάστασης.** (A) Η ισομερείωση της L-προλίνης σε D-προλίνη από τη ρακεμάση της προλίνης, ένα βακτηριακό ένζυμο, προχωρά μέσω μιας επίπεδης μεταβατικής κατάστασης στην οποία ο  $\alpha$ -άνθρακας είναι τριγωνικός παρά τετραεδρικός. (B) Το 2-καρβοξυλο-πυρρόλιο, ένα ανάλογο μεταβατικής κατάστασης λόγω της τριγωνικής γεωμετρίας του, είναι ένας ισχυρός αναστολέας της ρακεμάσης της προλίνης.

#### 8.5.4 Τα καταλυτικά αντισώματα αποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της επιλεκτικής πρόσδεσης της μεταβατικής κατάστασης στην ενζυμική δραστηριότητα

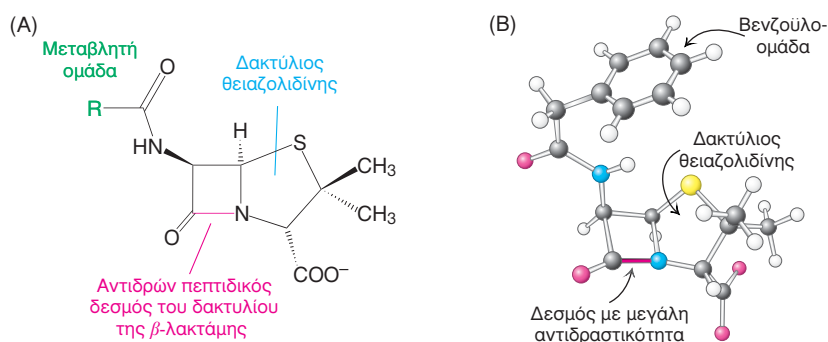
Εάν η αντίληψή μας για τη σπουδαιότητα της μεταβατικής κατάστασης στην κατάλυση είναι σωστή, αντισώματα που αναγνωρίζουν μεταβατικές καταστάσεις θα μπορούσαν να δράσουν ως καταλύτες. Η προετοιμασία ενός αντισώματος το οποίο καταλύει την εισαγωγή ενός ιόντος μετάλλου στον δακτύλιο της πορφυρίνης καταδεικνύει ωραία την αξία της προσέγγισης αυτής. Η σιδηροχηλάση, το τελικό ένζυμο της βιοσυνθετικής πορείας της παραγωγής της αίμης, καταλύει την εισαγωγή του  $Fe^{2+}$  στην πρωτοπορφυρίνη IX. Η σχεδόν επίπεδη πορφυρίνη πρέπει να καμφθεί για να εισέλθει ο σίδηρος. Η κρυσταλλική δομή της σιδηροχηλάσης που είναι προσδεμένη σε ένα ανάλογο υποστρώματος προσδιορίστηκε πρόσφατα και επιβεβαιώνει ότι πράγματι το ένζυμο για να εισαγάγει τον σίδηρο κάμπτεi έναν από τους πυρρολικούς δακτύλιους, στρέφοντάς τον κατά  $36^\circ$ .

Το πρόβλημα ήταν να βρεθεί ένα ανάλογο μεταβατικής κατάστασης αυτής της αντίδρασης εισαγωγής μετάλλου το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο (ανοσογόνο) για να παραγάγει ένα αντίσωμα. Η λύση ήλθε από τα αποτελέσματα μελετών που έδειξαν ότι μια αλκυλιωμένη πορφυρίνη, η *N*-μεθυλοπρωτοπορφυρίνη, είναι ένας ισχυρός αναστολέας της σιδηροχηλάσης. Η ένωση αυτή μοιάζει με τη μεταβατική κατάσταση διότι η *αλκυλίωση του N αναγκάζει την πορφυρίνη να καμφθεί*. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι *N*-αλκυλοπορφυρίνες χηλώνουν ιόντα μετάλλων  $10^4$  φορές πιο γρήγορα από ό,τι τα μη αλκυλιωμένα ισοδύναμά τους. Η κάμψη αυξάνει την έκθεση των μονήρων ζευγών ηλεκτρονίων του πυρρολικού αζώτου στον διαλύτη, η οποία διευκολύνει το μέταλλο στην πρόσδεση.

Η παραγωγή ενός καταλυτικού αντισώματος έγινε με τη χρησιμοποίηση της *N*-αλκυλοπορφυρίνης ως ανοσογόνου. Το αντίσωμα που παράγεται προφανώς διαστρέφει μια επίπεδη πορφυρίνη (Εικόνα 8.25) για να διευκολύνει την είσοδο ενός μετάλλου. Κατά μέσον όρο, ένα μόριο αντισώματος εισάγει μέ-



**ΕΙΚΟΝΑ 8.25 Η χρήση αναλόγων της μεταβατικής κατάστασης για την παραγωγή καταλυτικών αντισωμάτων.** Η εισαγωγή ενός ιόντος μετάλλου σε μια πορφυρίνη από τη σιδηροχηλάση προχωρά μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης στην οποία κάμπτεται η πορφυρίνη. Η *N*-μεθυλομεσοπορφυρίνη, μια κεκλιμένη πορφυρίνη που μοιάζει με τη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης που καταλύεται από τη σιδηροχηλάση, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός αντισώματος το οποίο επίσης καταλύει την εισαγωγή ενός ιόντος μετάλλου στον πορφυρινικό δακτύλιο.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.26** Δομή της πενικιλίνης. Η ενεργός περιοχή της πενικιλίνης είναι ο πεπτιδικός δεσμός του δακτυλίου της β-λακτάμης. (Α) Χημικός τύπος της πενικιλίνης και (Β) δομικό μοντέλο της βενζυλο-πενικιλίνης.

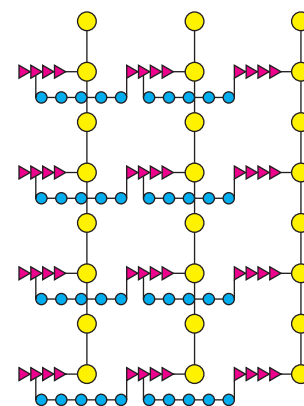
ταλλα σε 80 μόρια πορφυρίνης κάθε ώρα, μια ταχύτητα μόνο 10 φορές πιο αργή από εκείνη της σιδηροχηλάσης και 2.500 φορές πιο γρήγορη από τη μη καταλυόμενη αντίδραση. Τα καταλυτικά αντισώματα (abzymes) μπορούν πράγματι να παραχθούν με τη χρησιμοποίηση αναλόγων της μεταβατικής κατάστασης ως αντιγόνων. Αντισώματα που καταλύουν πολλά άλλα είδη χημικών αντιδράσεων — με παραδείγματα από την υδρόλυση εστέρων και αμιδίων, τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, την τρανσεστεροποίηση, τη φωτοεπαγόμενη διάσπαση, τον φωτοεπαγόμενο διμερισμό, την αποκαρβοξυλίωση και την οξείδωση— έχουν παραχθεί με παρόμοιες στρατηγικές. Τα αποτελέσματα μελετών με ανάλογα μεταβατικής κατάστασης παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ένζυμα μπορούν να λειτουργούν συμπληρωματικά σε δομή με τη μεταβατική κατάσταση. Η ισχύς των αναλόγων της μεταβατικής κατάστασης είναι τώρα εμφανής: (1) είναι πηγές της βαθιάς γνώσης των καταλυτικών μηχανισμών, (2) μπορούν να λειτουργήσουν ως ισχυροί και ειδικοί αναστολείς των ενζύμων και (3) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσογόνα για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος νέων καταλυτών.

### 8.5.5 Η πενικιλίνη αναστέλλει μη αντιστρεπτά ένα καθοριστικό ένζυμο στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος

Η πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε, αποτελείται από έναν δακτύλιο θειαζολιδίνης που έχει συντηχθεί με έναν δακτύλιο β-λακτάμης στον οποίο είναι προσκολλημένη με έναν πεπτιδικό δεσμό μια μεταβλητή ομάδα R (Εικόνα 8.26Α). Παραδείγματος χάριν, στη βενζυλο-πενικιλίνη η R είναι μια βενζυλο-ομάδα (Εικόνα 8.26Β). Αυτή η δομή μπορεί να υποστεί μια ποικιλία ανακατατάξεων και, συγκεκριμένα, ο δακτύλιος της β-λακτάμης είναι πολύ ασταθής. Πράγματι, όπως θα γίνει καταφανές παρακάτω, αυτή η αστάθεια είναι στενά συνδεδεμένη με την αντιβιοτική δράση της πενικιλίνης.

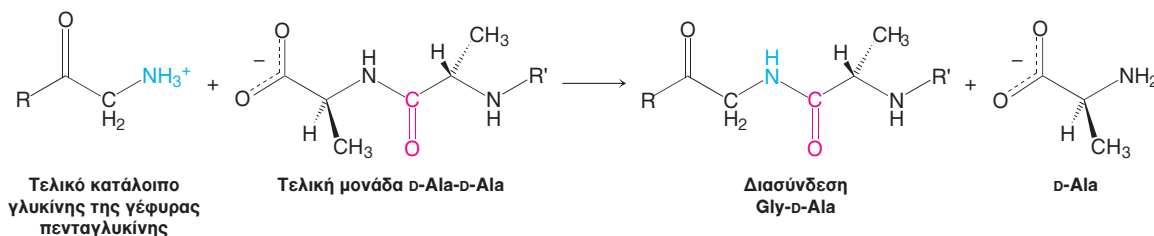
Πώς η πενικιλίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων; Το 1957, ο Joshua Lederberg έδειξε ότι βακτήρια που είναι αρχικά ευαίσθητα στην πενικιλίνη μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία της, αν χρησιμοποιηθεί ένα υπέρτονο διάλυμα. Οι οργανισμοί που προέκυψαν με τον τρόπο αυτό και ονομάζονται πρωτοπλάστες, στερούνται κυτταρικού τοιχώματος και λόγω αυτού υφίστανται λύση όταν μεταφέρονται σε κανονικό διάλυμα. Συνεπώς, η πενικιλίνη παρεμβάλλεται στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Το μακρομόριο του κυτταρικού τοιχώματος, που ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη, απαρτίζεται από ευθύγραμμες πολυσακχαριτικές αλυσίδες που είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω μικρών πεπτιδίων (Εικόνα 8.27). Η τεράστια πεπτιδογλυκάνη σε σχήμα σακούλας προσδίδει μηχανική στήριξη στα βακτήρια και εμποδίζει τη λύση τους από την υψηλή ενδοκυτταρική ωσμωτική πίεση.

Το 1965, ο James Park και ο Jack Strominger, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, συμπέραναν ότι η πενικιλίνη εμποδίζει το τελευταίο βήμα της σύνθε-



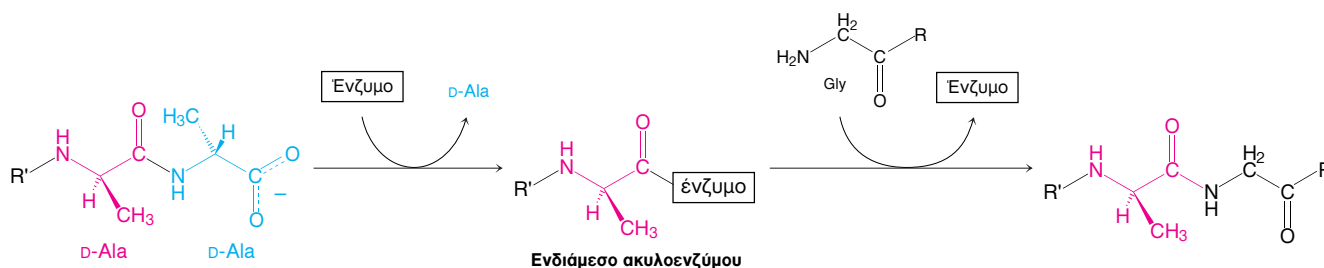
**ΕΙΚΟΝΑ 8.27** Σχηματική αναπαράσταση της πεπτιδογλυκάνης του *Staphylococcus aureus*. Τα σάκκαρα είναι κίτρινα, τα τετραπεπτιδία κόκκινα και οι γέφυρες πενταγλυκίνης μπλε. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα μοναδικό τεράστιο μακρομόριο σε σχήμα σακούλας, λόγω των εκτεταμένων διασυνδέσεων.

σης του κυτταρικού τοιχώματος, δηλαδή τη διασύνδεση των διαφορετικών αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης. Στον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*, η αμινική ομάδα του ενός άκρου μιας αλυσίδας πενταγλυκίνης προσβάλλει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ δύο κατάλοιπων D-αλανίνης σε μια άλλη πεπτιδική μονάδα (Εικόνα 8.28). Σχηματίζεται ένας πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της γλυκίνης και ενός από τα κατάλοιπα της D-αλανίνης, ενώ το άλλο κατάλοιπο της D-αλανίνης απελευθερώνεται. Αυτή η αντίδραση της διασύνδεσης καταλύεται από την *τρανσπεπτιδάση των γλυκοπεπτιδίων*. Τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα είναι μοναδικά στο ότι περιέχουν D-αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν διασυνδέσεις με έναν μηχανισμό διαφορετικό από εκείνον που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών.



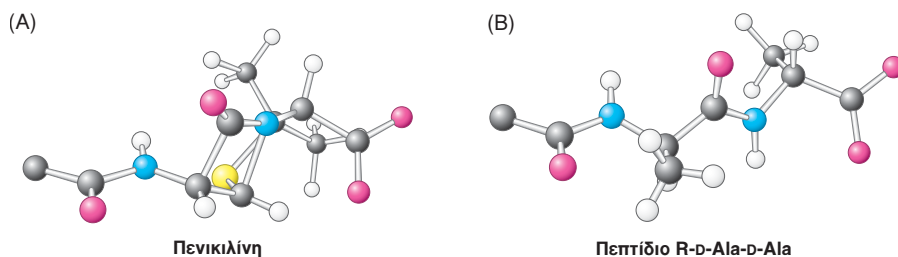
**ΕΙΚΟΝΑ 8.28** Σχηματισμός διασύνδεσης στην πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus*. Η τελική αμινική ομάδα της γέφυρας πενταγλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα προσβάλλει τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ δύο καταλοίπων D-Ala για να σχηματίσει μια διασύνδεση.

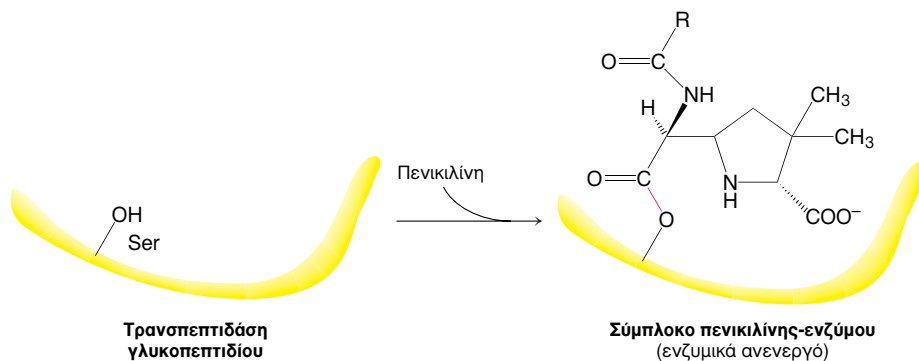
Η πενικιλίνη αναστέλλει την τρανσπεπτιδάση, που κάνει διασυνδέσεις, με το στρατήγημα του Δούρειου Ίππου. Κανονικά η τρανσπεπτιδάση σχηματίζει ένα *ακυλοενδιάμεσο* με το προτελευταίο κατάλοιπο της D-αλανίνης του πεπτιδίου D-Ala-D-Ala (Εικόνα 8.29). Αυτό το ομοιοπολικό ενδιάμεσο ακυλοενζύμου αντιδρά τότε με την αμινική ομάδα της ακραίας γλυκίνης ενός άλλου πεπτιδίου για να σχηματίσει τη διασύνδεση. Η πενικιλίνη είναι ευπρόσδεκτη μέσα στο ενεργό κέντρο της τρανσπεπτιδάσης διότι μιμείται την ομάδα D-Ala-D-Ala του κανονικού υποστρώματος (Εικόνα 8.30). Η προσδεμένη πενικιλίνη σχηματίζει τότε έναν ομοιοπολικό δεσμό με ένα κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό το σύμπλοκο πενικιλίνης-ενζύμου δεν αντιδρά περαιτέρω. Έτσι, η τρανσπεπτιδάση αναστέλλεται μη αντιστρεπτά και δεν μπορεί να λάβει χώρα η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.29** Αντίδραση της τρανσπεπτιδάσης. Στην αντίδραση της τρανσπεπτιδάσης σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ακυλοενζύμου που οδηγεί στον σχηματισμό διασύνδεσης.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.30** Στερεοδιάταξεις της πενικιλίνης και ενός κανονικού υποστρώματος. Η στερεοδιάταξη της πενικιλίνης στην περιοχή του αντιδρώντος πεπτιδικού δεσμού (Α) μοιάζει με τη στερεοδιάταξη της μεταβατικής κατάστασης του R-D-Ala-D-Ala (Β) στην αντίδραση της τρανσπεπτιδάσης [Κατά B. Lee. *J. Mol. Biol.* 61(1971):464.]





**ΕΙΚΟΝΑ 8.31** Σχηματισμός ενός συμπλόκου πενικιλίνης-ενζύμου. Η πενικιλίνη αντιδρά με την τρανσπεπτιδάση για να σχηματίσει ένα ανενεργό σύμπλοκο, το οποίο είναι σταθερό επ' αόριστον.

Γιατί η πενικιλίνη είναι ένας τόσο αποτελεσματικός αναστολέας της τρανσπεπτιδάσης; Ο πολύ στρεβλωμένος τετραμελής δακτύλιος β-λακτάμης της πενικιλίνης είναι ιδιαίτερα ενεργός. Με την πρόσδεση στην τρανσπεπτιδάση, το κατάλοιπο της σερίνης στο ενεργό κέντρο επιτίθεται στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του δακτυλίου λακτάμης για να σχηματίσει το παράγωγο πενικιλίνης-σερίνης (Εικόνα 8.31). Επειδή η πεπτιδάση συμμετέχει στη δική της απενεργοποίηση, η πενικιλίνη δρα ως αναστολέας αυτοκτονίας.

## 8.6 ΟΙ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΕΙΝΑΙ ΣΥΧΝΑ ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΝΕΝΖΥΜΩΝ



Προηγουμένως (Εδάφιο 8.1.1), λάβαμε υπ' όψιν το γεγονός ότι πολλά ένζυμα χρειάζονται συμπαραγόντες για να είναι καταλυτικώς ενεργά. Μια κατηγορία των συμπαραγόντων αυτών, που ονομάζονται *συνένζυμα*, αποτελείται από μικρά οργανικά μόρια, πολλά από τα οποία προέρχονται από *βιταμίνες*. Αυτές καθεαυτές οι βιταμίνες είναι οργανικά μόρια που χρειά-

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.9** Υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες.

Βιταμίνη	Συνένζυμο	Χαρακτηριστικός τύπος αντίδρασης	Συνέπειες της έλλειψης
B <sub>1</sub> (Θειαμίνη)	Πυροφωσφορική θειαμίνη	Μεταφορά αλδεϋδης	Μπέρι μπέρι (απώλεια βάρους, καρδιακά προβλήματα, νευρική δυσλειτουργία)
B <sub>2</sub> (Ριβοφλαβίνη)	Φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (FAD)	Οξειδωση-αναγωγή	Χηλκεραιές και γωνιώδες κολλέγχυμα (αλλοιώσεις του στόματος), δερματίτιδα
B <sub>6</sub> (Πυριδοξίνη)	Φωσφορική πυριδοξάλη	Μεταφορά ομάδας σε ή από αμινοξέα	Κατάθλιψη, σύγχυση, σπασμοί
Νικοτινικό οξύ (νιασίνη)	Νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (NAD <sup>+</sup> )	Οξειδωση-αναγωγή	Πελάγρα (δερματίτιδα, κατάθλιψη, διάρροια)
Παντοθενικό οξύ Βιοτίνη	Συνένζυμο A Σύμπλοκα βιοτίνης-λυσίνης (βιοκυτίνη)	Μεταφορά ακετυλικής ομάδας Καρβοξυλίωση που εξαρτάται από την ATP και μεταφορά καρβοξυλικής ομάδας	Υπέρταση Εξανθήματα γύρω από τα φρύδια, μυϊκός πόνος, κόπωση (σπάνια)
Φυλλικό οξύ	Τετραϋδροφυλλικό	Μεταφορά συστατικών ενός άνθρακα, σύνθεση θυμίνης	Αναιμία, ελαττώματα του νευρικού σωλήνα στην ανάπτυξη
B <sub>12</sub>	5'-Δεοξαδενοσυλο-κοβαλαμίνη	Μεταφορά μεθυλικών ομάδων, ενδομοριακές ανακατατάξεις	Αναιμία, μεγαλοβλαστική αναιμία, οξέωση μεθυλομπλονικού
C (ασκορβικό οξύ)		Αντιοξειδωτικό	Σκορβούτο (πρησμένα και αιμορραγούντα ούλα, υποδερμικές αιμορραγίες)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.10** Λιποδιαλυτές βιταμίνες.

Βιταμίνη	Λειτουργία	Έλλειψη
A	Ρόλοι στην όραση, ανάπτυξη, αναπαραγωγή	Νυκταλωπία, βλάβη του κερατοειδούς χιτώνα, βλάβη του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού σωλήνα
D	Ρύθμιση του μεταβολισμού του ασβεστίου και του φωσφόρου	Ραχίτιδα (παιδιά): σκελετικές παραμορφώσεις, βλάβη στην ανάπτυξη Οστεομαλάκυνση (ενήλικοι): μαλακά, εύκαμπτα οστά
E	Αντιοξειδωτικό	Αναστολή της παραγωγής σπέρματος, αλλοιώσεις στους μύς και στα νεύρα (σπάνια)
K	Πήξη του αίματος	Υποδερμική αιμορραγία

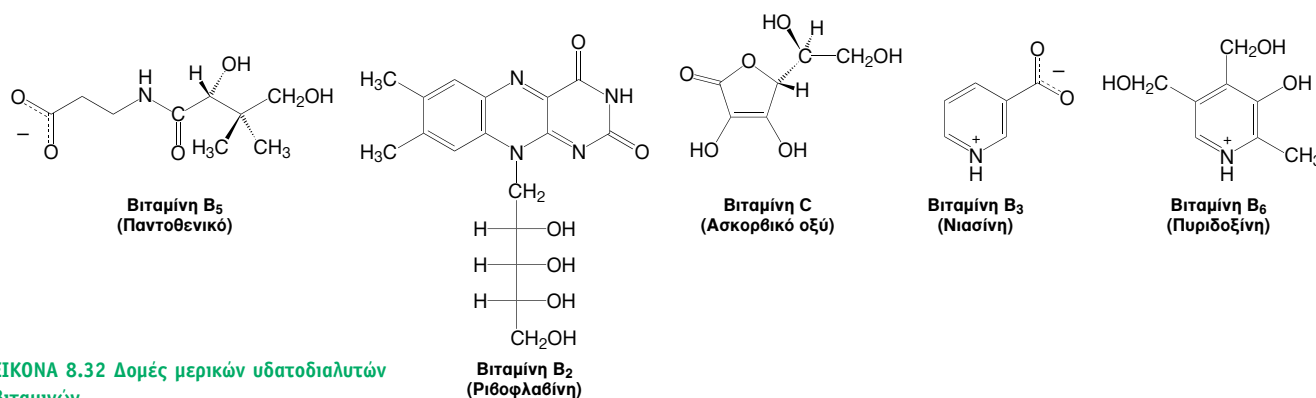
ζονται σε μικρές ποσότητες στη διατροφή μερικών ανώτερων ζώων. Αυτά τα μόρια υπηρετούν τους ίδιους ρόλους σε όλες σχεδόν τις μορφές της ζωής, αλλά τα ανώτερα ζώα έχασαν την ικανότητα να τις συνθέτουν κατά την πορεία της εξέλιξης. Παραδείγματος χάριν, ενώ η *E. coli* μπορεί να αναπτυχθεί σε γλυκόζη και οργανικά άλατα, ο άνθρωπος χρειάζεται τουλάχιστον 12 βιταμίνες στη διατροφή του. Οι βιοσυνθετικές πορείες των βιταμινών μπορεί να είναι περίπλοκες· έτσι, είναι βιολογικά περισσότερο αποτελεσματικό να απορροφήσουμε βιταμίνες παρά να συνθέσουμε τα ένζυμα που απαιτούνται για να τις κατασκευάσουν από απλά μόρια. Η αποτελεσματικότητα αυτή έχει το κόστος της εξάρτησης από άλλους οργανισμούς για χημικές ενώσεις απαραίτητες για τη ζωή. Πράγματι, η ανεπάρκεια βιταμινών μπορεί να προκαλεί ασθένειες σε όλους τους οργανισμούς που χρειάζονται τα μόρια αυτά (Πίνακες 8.9 και 8.10). Οι βιταμίνες είναι δυνατόν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με το εάν είναι διαλυτές ή όχι στο νερό ή σε μη πολικούς διαλύτες.

### 8.6.1 Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες λειτουργούν ως συνένζυμα



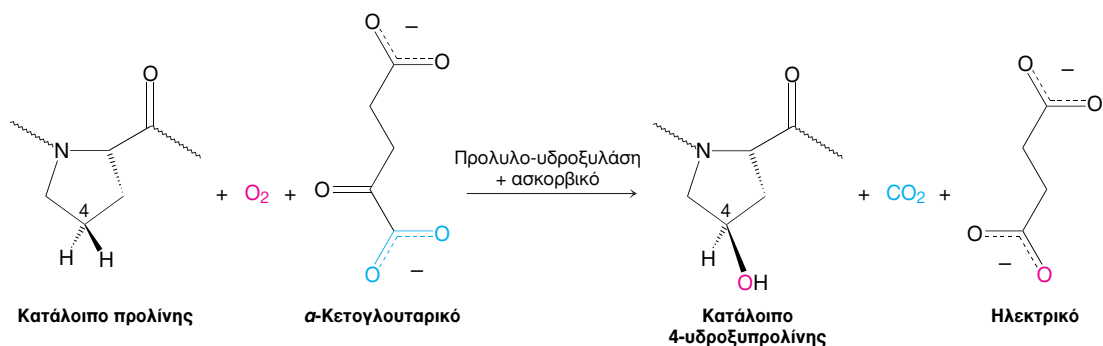
Ο Πίνακας 8.9 καταγράφει τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες — το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και μια σειρά γνωστή ως το σύμπλεγμα της βιταμίνης B (Εικόνα 8.32). Όπως θα συζητηθεί παρακάτω, το ασκορβικό, η ιοντισμένη μορφή του ασκορβικού οξέος, δρα ως αναγωγικός παράγοντας (αντιοξειδωτικό). Η σειρά της βιταμίνης B περιλαμβάνει συστατικά συνενζύμων. Επισημαίνεται ότι, σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της βιταμίνης C, η βιταμίνη πρέπει να τροποποιηθεί προτού προσφέρει τη λειτουργία της.

Η ανεπάρκεια βιταμινών είναι ικανή να προκαλέσει μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων (Πίνακας 8.9). Εντούτοις, πολλά από τα ίδια συμπτώματα



**ΕΙΚΟΝΑ 8.32** Δομές μερικών υδατοδιαλυτών βιταμινών.





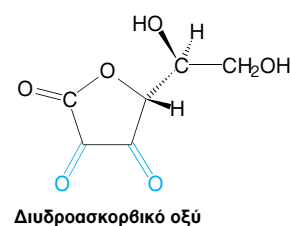
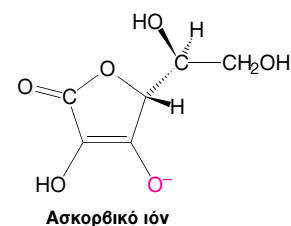
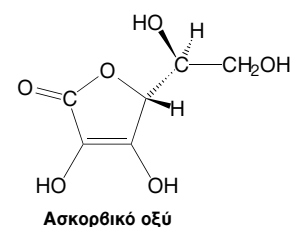
**ΕΙΚΟΝΑ 8.33 Σχηματισμός της 4-υδροξυπρολίνης.** Η προλίνη υδρολύεται στον C-4 από τη δράση της προλυλο-υδροξυλάσης, ένα ένζυμο το οποίο ενεργοποιεί μοριακό οξυγόνο.

μπορούν να προέλθουν από καταστάσεις διαφορετικές από την έλλειψη μιας βιταμίνης. Για τον λόγο αυτό και επειδή οι βιταμίνες χρειάζονται σε σχετικά μικρές ποσότητες, παθολογικές καταστάσεις που είναι αποτέλεσμα ανεπάρκειας βιταμινών είναι δύσκολο να διαγνωστούν.

Η απαίτηση για βιταμίνη C αποδείχθηκε σχετικά άμεσα. Αυτή η υδατοδιαλυτή βιταμίνη δεν χρησιμοποιείται ως συνένζυμο αλλά είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα της προλυλο-υδροξυλάσης. Το ένζυμο αυτό συνθέτει την 4-υδροξυπρολίνη, ένα αμινοξύ που χρειάζεται στο κολλαγόνο, το κύριο συστατικό του συνδετικού ιστού στα σπονδυλωτά, αλλά σπάνια βρίσκεται οπουδήποτε αλλού. Πώς σχηματίζεται αυτό το ασυνήθιστο αμινοξύ και ποιος είναι ο ρόλος του; Τα αποτελέσματα της σήμανσής της με ραδιενέργεια έδειξαν ότι στις νεοσχηματιζόμενες αλυσίδες κολλαγόνου υδροξυλιώνονται τα κατάλοιπα της προλίνης στο αμινο-τελικό άκρο των καταλοίπων της γλυκίνης. Το άτομο του οξυγόνου που προσκολλάται στον C-4 της προλίνης προέρχεται από το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>). Το άλλο άτομο οξυγόνου του O<sub>2</sub> προσλαμβάνεται από το α-κετογλουταρικό, το οποίο μετατρέπεται σε ηλεκτρικό (Εικόνα 8.33). Αυτή η περίπλοκη αντίδραση καταλύεται από την προλυλο-υδροξυλάση, μια διοξυγονάση, και υποβοηθείται από ένα ιόν Fe<sup>2+</sup>, το οποίο είναι σφιχτά προσδεδεμένο σε αυτή και χρειάζεται για να ενεργοποιήσει το O<sub>2</sub>. Επίσης, το ένζυμο μετατρέπει το α-κετογλουταρικό σε ηλεκτρικό χωρίς να υδροξυλιώνει την προλίνη. Σε αυτή τη μερική αντίδραση σχηματίζεται ένα οξειδωμένο σύμπλοκο σιδήρου το οποίο απενεργοποιεί το ένζυμο. Πώς αναγεννάται το ενεργό ένζυμο; Για τη διάσωση έρχεται το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ανάγοντας τον τρισθενή σίδηρο του απενεργοποιημένου ενζύμου. Στην πορεία της επαναφοράς, το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται σε δεϋδρασκορβικό οξύ (Εικόνα 8.34). Έτσι το ασκορβικό οξύ εδώ παίζει τον ρόλο ενός ειδικού αντιοξειδωτικού.

Τα πρωτεύοντα δεν είναι ικανά να συνθέσουν ασκορβικό οξύ και ως εκ τούτου πρέπει να το αποκτήσουν από τη διατροφή τους. Η σπουδαιότητα του ασκορβικού οξέος γίνεται εντυπωσιακά φανερή στο σκορβούτο. Το 1536 ο Jacques Cartier έδωσε μια παραστατική περιγραφή αυτής της ασθένειας της διαιτητικής ανεπάρκειας, η οποία προσέβαλε τους άντρες του καθώς εξερευνούσαν τον ποταμό του Αγίου Λαυρεντίου στον Καναδά:

Μερικοί έχασαν τη δύναμή τους και δεν μπορούσαν τα σταθούν στα πόδια τους ... Άλλοι επίσης είχαν σε όλο το δέρμα τους στίγματα αίματος πορφυρού χρώματος: στη συνέχεια ανέβηκαν στους αστραγάλους, στα γόνατα, στους μηρούς, στους ώμους, στους βραχίονες και στον λαιμό τους. Το στόμα τους έγινε δύσσομο, τα ούλα τους τόσο χαλασμένα που έπεφτε η σάρκα, ακόμη και στη ρίζα των δοντιών, τα οποία έπεσαν σχεδόν όλα.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.34 Τύποι του ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C).** Το ασκορβικό είναι η ιοντισμένη μορφή της βιταμίνης C και το διυδροασκορβικό οξύ είναι η οξειδωμένη μορφή του ασκορβικού.

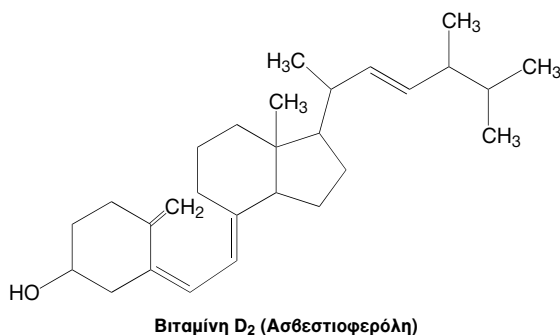
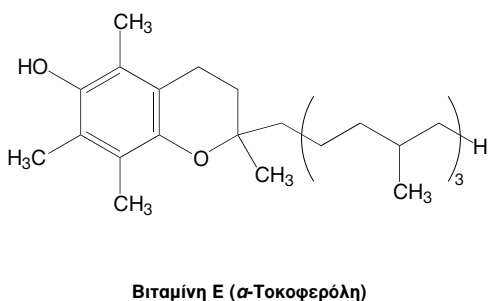
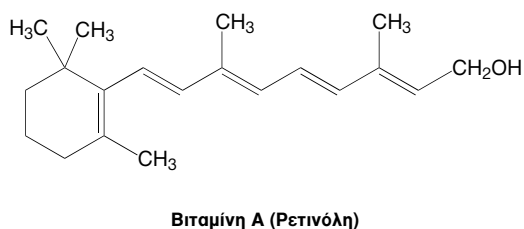
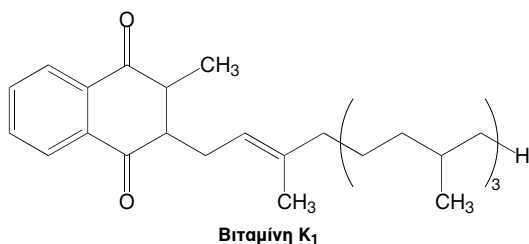
Ο James Lind, ένας Σκωτσέζος γιατρός, διασαφήνισε τους τρόπους πρόληψης του σκορβούτου σε ένα άρθρο με τίτλο «A Treatise of Scurvy» (*Μια Πραγματεία επί του Σκορβούτου*) που δημοσιεύθηκε το 1747. Ο Lind περιέγραψε μια ελεγχόμενη μελέτη που διαπίστωσε ότι το σκορβούτο μπορεί να προληφθεί εάν το διαιτολόγιο περιελάμβανε εσπεριδοειδή. Το Βασιλικό Ναυτικό τελικά άρχισε να διανέμει στους ναύτες γλυκολέμονα, από τα οποία οι Βρετανοί ναύτες απέκτησαν το παρατσούκλι “limeys” (χυμός από γλυκολέμονα). Η έρευνα του Lind εμπνεύστηκε από το κακό τέλος μιας αποστολής με επικεφαλής τον αρχιπλοίαρχο George Anson. Ο Anson άφησε την Αγγλία το 1740 με έναν στόλο από έξι πλοία και περισσότερους από 1000 άντρες και επέστρεψε με έναν τεράστιο θησαυρό, αλλά από το πλήρωμά του επέζησαν μόνο 145 για να επιστρέψουν στην πατρίδα. Οι υπόλοιποι πέθαναν από σκορβούτο.

Γιατί αυτή η υδροξυλίωση που έχει υποστεί βλάβη έχει τόσο καταστρεπτικές συνέπειες; Το κολλαγόνο που συντίθεται χωρίς την παρουσία ασκορβικού οξέος είναι λιγότερο σταθερό από ό,τι η φυσιολογική πρωτεΐνη. Μελέτες της θερμομικής σταθερότητας συνθετικών πολυπεπτιδίων είναι πολύ κατατοπιστικές. Η υδροξυπρολίνη σταθεροποιεί την τριπλή έλικα του κολλαγόνου σχηματίζοντας μέσα στις αλυσίδες δεσμούς υδρογόνου. Οι μη κανονικές ίνες που σχηματίζονται από το μη επαρκώς υδροξυλιωμένο κολλαγόνο συνεισφέρουν στις αλλοιώσεις του δέρματος και στην ευθραυστότητα των αιμοφόρων αγγείων που παρατηρούνται στο σκορβούτο.

### 8.6.2 Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες, όπως η πήξη του αίματος και η όραση



Δεν λειτουργούν ως συνένζυμα όλες οι βιταμίνες. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες προσδιορίζονται με τα γράμματα A, D, E και K (Εικόνα 8.35, Πίνακας 8.10), έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Η βιταμίνη K, η οποία χρειάζεται για τη φυσιολογική πήξη του αίματος (K από το γερμανικό koagulation), συμμετέχει στην καρβοξυλίωση των καταλοίπων του γλουταμινικού σε γ-καρβοξυγλουταμινικό το οποίο κάνει το γλουταμινικό οξύ περισσότερο ισχυρό χηλωτή του  $\text{Ca}^{2+}$  (Εδάφιο 10.5.7). Η βιταμίνη A (ρετινόλη) είναι η πρόδρομος ένωση της ρετινάλης, της φωτοευαίσθητης ομάδας της ροδοψίνης και άλλων οπτικών χρωστικών (Εδάφιο 32.3.1). Ανεπάρκεια αυτής της βιταμίνης οδηγεί σε νυκταλωπία. Επιπροσθέτως, νεαρά ζώα χρειάζονται τη βι-



**ΕΙΚΟΝΑ 8.35** Δομές μερικών λιποδιαλυτών βιταμινών.

ταμίνη Α για την ανάπτυξή τους. Το ρετινοϊκό οξύ, το οποίο περιέχει ένα τελικό καρβοξύλιο στη θέση της υδροξυλικής ομάδας της ρετινόλης, λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων που μεσολαβούν στην αύξηση και στην ανάπτυξη (Υποκεφάλαιο 31.3). Ένας μεταβολίτης της βιταμίνης D είναι μια ορμόνη η οποία ρυθμίζει τον μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου. Σε αναπτυσσόμενα ζώα, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D διαταράσσει τον σχηματισμό των οστών. Η στειρότητα στους αρουραίους είναι συνέπεια έλλειψης της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλη). Η βιταμίνη αυτή αντιδρά με δραστικές ενώσεις οξυγόνου, όπως οι ρίζες υδροξυλίου, και τις αδρανοποιεί προτού οξειδώσουν τα ακόρεστα λιπίδια της μεμβράνης και καταστρέψουν τη δομή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

- **Τα ένζυμα είναι ισχυροί και σε μεγάλο βαθμό εξειδικευμένοι καταλύτες**

Οι καταλύτες στα βιολογικά συστήματα είναι ένζυμα και σχεδόν όλα τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. Τα ένζυμα είναι πολύ εξειδικευμένα και έχουν μεγάλη καταλυτική ισχύ. Μπορούν να αυξήσουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων με παράγοντες της τάξης του  $10^6$  ή και περισσότερο. Πολλά ένζυμα χρειάζονται συμπράγοντες για τη δραστικότητα. Τέτοιοι συμπράγοντες μπορεί να είναι ιόντα μετάλλων ή μικρά οργανικά μόρια που προέρχονται από τις βιταμίνες και ονομάζονται συνένζυμα.

- **Η ελεύθερη ενέργεια είναι μια χρήσιμη θερμοδυναμική συνάρτηση για την κατανόηση των ενζύμων**

Η ελεύθερη ενέργεια ( $G$ ) είναι η πιο χρήσιμη θερμοδυναμική συνάρτηση για τον προσδιορισμό του εάν μια αντίδραση μπορεί να γίνει, καθώς και για την κατανόηση της ενεργειακής θεώρησης της κατάλυσης. Μια αντίδραση μπορεί να γίνει αυθόρμητα μόνο όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) είναι αρνητική. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μιας αντίδρασης που γίνεται όταν τα αντιδρώντα και τα προϊόντα έχουν δραστικότητα ίση με τη μονάδα ονομάζεται μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G^\circ$ ). Οι βιοχημικοί χρησιμοποιούν συνήθως τη  $\Delta G^\circ$ , που είναι η μεταβολή της πρότυπης ελεύθερης ενέργειας σε pH 7. Τα ένζυμα δεν μεταβάλλουν τις ισορροπίες των αντιδράσεων, αντιθέτως αυξάνουν τις ταχύτητές τους.

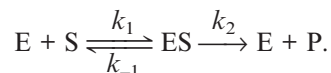
- **Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις, διευκολύνοντας τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης**

Τα ένζυμα δρουν ως καταλύτες ελαττώνοντας την ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης μιας χημικής αντίδρασης. Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις με το να προσφέρουν μια πορεία αντίδρασης, στην οποία η μεταβατική κατάσταση (το υψηλότερο ενεργειακό είδος) έχει τη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια, και έτσι σχηματίζεται πιο γρήγορα από ό,τι στη μη καταλυόμενη αντίδραση.

Το πρώτο βήμα στην κατάλυση είναι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Τα υποστρώματα προσδένονται στα ένζυμα σε εσοχές των ενεργών κέντρων από τα οποία αποκλείεται το νερό όταν το υποστρώμα είναι προσδεμένο. Η εξειδίκευση των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος προέρχεται κυρίως από τους δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι έχουν δεδομένο προσανατολισμό, και από το σχήμα του ενεργού κέντρου, το οποίο αποβάλλει μόρια που δεν έχουν ένα ικανοποιητικό συμπληρωματικό σχήμα. Η αναγνώριση των υποστρωμάτων από τα ένζυμα συνοδεύεται από μεταβολές στερεοδιάταξης στο ενεργό κέντρο, και τέτοιες μεταβολές διευκολύνουν τον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης.

### • Το μοντέλο Michaelis-Menten εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων

Το μοντέλο Michaelis-Menten δίνει πληροφορίες για τις κινητικές ιδιότητες μερικών ενζύμων. Στο μοντέλο αυτό, ένα ένζυμο (E) συνδυάζεται με ένα υπόστρωμα (S) για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), το οποίο μπορεί να σχηματίσει ένα προϊόν (P) ή να διασπαστεί σε E και S.



Η ταχύτητα  $V_0$  σχηματισμού προϊόντος δίνεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M},$$

στην οποία  $V_{\max}$  είναι η ταχύτητα όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα και  $K_M$ , η σταθερά Michaelis, είναι η συγκέντρωση κατά την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας. Η μέγιστη ταχύτητα  $V_{\max}$  είναι ίση με το γινόμενο της  $k_2$  ή  $k_{\text{cat}}$  και της ολικής συγκέντρωσης του ενζύμου. Η κινητική σταθερά  $k_{\text{cat}}$ , που ονομάζεται αριθμός μετατροπής, είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε μία μόνο καταλυτική περιοχή, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Ο αριθμός μετατροπής για τα περισσότερα ένζυμα είναι μεταξύ 1 και  $10^4$  ανά δευτερόλεπτο. Ο λόγος  $k_{\text{cat}}/K_M$  παρέχει έναν διεισδυτικό ανιχνευτή αποδοτικότητας του ενζύμου.

Τα αλλοστερικά ένζυμα απαρτίζουν μια σπουδαία τάξη ενζύμων των οποίων μπορεί να ρυθμιστεί η καταλυτική δραστηριότητα. Τα ένζυμα αυτά, τα οποία δεν ακολουθούν την κινητική Michaelis-Menten, έχουν πολλαπλά ενεργά κέντρα. Αυτά τα ενεργά κέντρα εμφανίζουν συνεργιακότητα, όπως αποδεικνύεται από τη σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

### • Τα ένζυμα είναι δυνατόν να ανασταλούν από ειδικά μόρια

Ειδικά μικρά μόρια ή ιόντα αναστέλλουν ακόμη και μη αλλοστερικά ένζυμα. Στη μη αντιστρεπτή αναστολή, ο αναστολέας ενώνεται ομοιοπολικά με το ένζυμο ή συνδέεται τόσο ισχυρά ώστε ο διαχωρισμός του από το ένζυμο να είναι πολύ αργός. Ομοιοπολικοί αναστολείς παρέχουν έναν τρόπο χαρτογράφησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Αντιθέτως, η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από μια ταχεία ισορροπία μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας εμποδίζει το υπόστρωμα από την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο. Ελαττώνει την ταχύτητα της αντίδρασης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας ελαττώνει τον αριθμό μετατροπής. Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να διακριθεί από τη μη συναγωνιστική αναστολή, με το να προσδιοριστεί εάν η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Η ουσία της κατάλυσης είναι η επιλεκτική σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης. Επομένως, ένα ένζυμο προσδένει τη μεταβατική κατάσταση περισσότερο στέρεα από ό,τι το υπόστρωμα. Τα ανάλογα της μεταβατικής κατάστασης είναι σταθερές ενώσεις οι οποίες μιμούνται βασικά χαρακτηριστικά του υψηλότερου ενεργειακού είδους. Είναι ισχυροί και ειδικοί αναστολείς των ενζύμων. Η απόδειξη ότι η σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης είναι μια σημαντική εκδοχή της ενζυμικής δραστη-

κότητας προέρχεται από την παραγωγή των καταλυτικών αντισωμάτων. Στην παραγωγή καταλυτικών αντισωμάτων χρησιμοποιούνται ως αντιγόνα, ή ανοσογόνα, ανάλογα της μεταβατικής κατάστασης.

• **Οι βιταμίνες είναι συχνά πρόδρομες ενώσεις των συνενζύμων**

Οι βιταμίνες είναι μικρά βιομόρια που χρειάζονται σε μικρές ποσότητες στη διατροφή των ανώτερων ζώων. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό, ένα αντιοξειδωτικό) και το σύμπλεγμα της βιταμίνης B (συστατικά των συνενζύμων). Το ασκορβικό χρειάζεται για την υδροξυλίωση των καταλοίπων της προλίνης στο κολλαγόνο, μια καθοριστική πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες είναι η A (πρόδρομη ένωση της ρετινάλης), η D (ρυθμιστής του μεταβολισμού του ασβεστίου και του φωσφόρου), η E (αντιοξειδωτικό στις μεμβράνες) και η K (συμμετέχει στην καρβοξυλίωση του γλουταμινικού).

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:  $V_{\max}$  ΚΑΙ  $K_M$  ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟΥΝ ΑΠΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΔΙΠΛΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ**

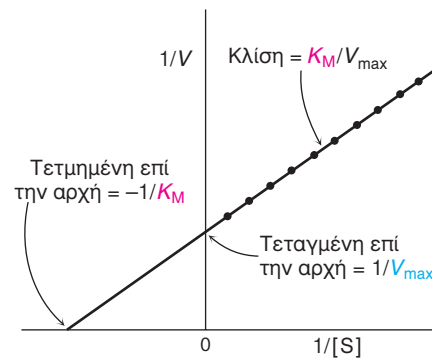
Πριν από την εμφάνιση των υπολογιστών, ο προσδιορισμός των τιμών  $K_M$  και  $V_{\max}$  απαιτούσε αλγεβρικούς χειρισμούς της βασικής εξίσωσης των Michaelis-Menten. Επειδή η  $V_{\max}$  προσεγγίζεται ασυμπτωματικά (Εικόνα 8.11), είναι αδύνατο να αποκτηθεί μια οριστική τιμή από το διάγραμμα Michaelis-Menten. Επειδή η  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος σε  $V_{\max}/2$ , φαίνεται αδύνατο να προσδιοριστεί με ακρίβεια η τιμή της  $K_M$ . Εντούτοις, η  $V_{\max}$  μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια εάν η εξίσωση Michaelis-Menten μετασχηματιστεί ώστε να δίνει διάγραμμα ευθείας γραμμής. Λαμβάνοντας το αντίστροφο και των δύο πλευρών η εξίσωση 23 δίνει

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (31)$$

Ένα διάγραμμα του  $1/V_0$  έναντι του  $1/[S]$ , που καλείται *διάγραμμα Lineweaver-Burk* ή *δίπλου αντιστρόφου*, παράγει μια ευθεία γραμμή με τεταγμένη επί την αρχή  $1/V_{\max}$  και κλίση  $K_M/V_{\max}$  (Εικόνα 8.36). Η τετμημένη επί την αρχή είναι  $-1/K_M$ .

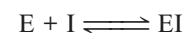
Τα διαγράμματα δίπλου αντιστρόφου είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη διάκριση μεταξύ συναγωνιστικών και μη συναγωνιστικών αναστολέων. Στη συναγωνιστική αναστολή η τεταγμένη επί την αρχή της γραφικής παράστασης της  $1/V_0$  σε συνάρτηση με την  $1/[S]$  είναι ίδια παρουσία ή απουσία του αναστολέα, αν και η κλίση αυξάνεται (Εικόνα 8.37). Το ότι η τεταγμένη επί την αρχή δεν αλλάζει, οφείλεται στο γεγονός ότι ένας συναγωνιστικός αναστολέας δεν μεταβάλλει τη  $V_{\max}$ . Σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος σχεδόν όλα τα ενεργά κέντρα καταλαμβάνονται από το υπόστρωμα και έτσι το ένζυμο είναι πλήρως λειτουργικό. Η αύξηση της κλίσης της γραφικής παράστασης της  $1/V_0$  σε συνάρτηση με την  $1/[S]$  δείχνει την ισχύ της πρόσδεσης του συναγωνιστικού αναστολέα. Παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα, η εξίσωση 31 αντικαθίσταται από

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right)$$



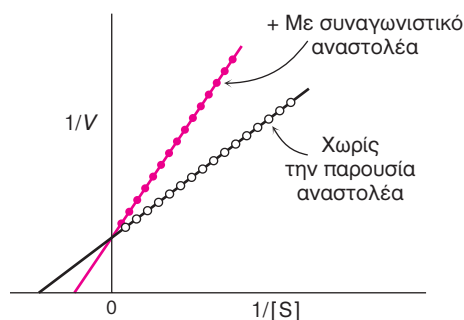
**ΕΙΚΟΝΑ 8.36** Διάγραμμα δίπλου αντιστρόφου ή διάγραμμα Lineweaver-Burk. Το διάγραμμα δίπλου αντιστρόφου της ενζυμικής κινητικής παράγεται αν παραστήσουμε γραφικά το  $1/V_0$  ως συνάρτηση του  $1/[S]$ . Η κλίση είναι  $K_M/V_{\max}$ , η τεταγμένη επί την αρχή είναι  $1/V_{\max}$  και η τετμημένη επί την αρχή είναι  $-1/K_M$ .

στην οποία  $[I]$  είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_i$  η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα:



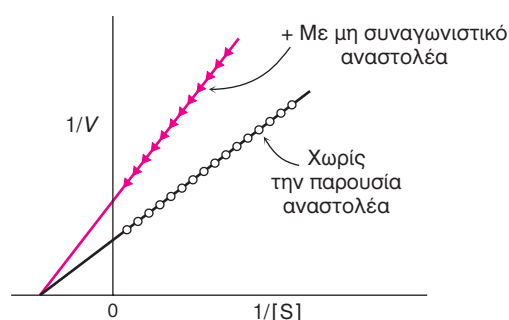
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Με άλλα λόγια, η κλίση της γραφικής παράστασης αυξάνεται κατά έναν παράγοντα  $(1+[I]/K_i)$  παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Ας πάρουμε ένα ένζυμο με μια  $K_M$  ίση με  $10^{-4}$  M. Απουσία αναστολέα, η ταχύτητα  $V_0 = V_{\max}/2$  όταν το  $[S] = 10^{-4}$  M. Παρουσία  $2 \times 10^{-3}$  M συναγωνιστικού αναστολέα που είναι προσδεμένος στο ένζυμο με μια  $K_i$  ίση με  $10^{-3}$  M, η φαινομενική  $K_M$  ( $K_M^{app}$ ) θα είναι ίση με  $K_M \times (1 + [I]/K_i)$  ή  $3 \times 10^{-4}$  M. Η αντικατάσταση των τιμών αυτών στην εξίσωση 23 δίνει  $V_0 = V_{\max}/4$  όταν το  $[S] = 10^{-4}$  M. Έτσι, στη συγκέντρωση αυτή του υποστρώματος η παρουσία ενός συναγωνιστικού αναστολέα μειώνει την ταχύτητα της αντίδρασης στο μισό.



**ΕΙΚΟΝΑ 8.37** Συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε ένα διάγραμμα διπλού αντιστρόφου. Το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου μιας ενζυμικής κινητικής παρουσία (+) ή απουσία (-) ενός συναγωνιστικού αναστολέα δείχνει ότι ο αναστολέας δεν έχει επίδραση στη  $V_{\max}$  αλλά αυξάνει την  $K_M$ .

Στη μη συναγωνιστική αναστολή (Εικόνα 8.38), ο αναστολέας μπορεί να ενωθεί είτε με το ένζυμο είτε με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Στην καθαρή μη συναγωνιστική αναστολή, οι τιμές των σταθερών διαστάσεων του αναστολέα με το ένζυμο και του αναστολέα με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος είναι ίσες (Εδάφιο 8.5.1). Η τιμή της  $V_{\max}$  ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που ονομάζεται  $V_{\max}^{\text{app}}$  και έτσι η τεταγμένη επί την αρχή αυξάνεται. Η



**ΕΙΚΟΝΑ 8.38** Μη συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε ένα διάγραμμα διπλού αντιστρόφου. Το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου μιας ενζυμικής κινητικής παρουσία (+) ή απουσία (-) ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα δείχνει ότι η  $K_M$  δεν μεταβάλλεται και η  $V_{\max}$  ελαττώνεται.

καινούργια κλίση, η οποία είναι ίση με  $K_M/V_{\max}^{\text{app}}$ , αυξάνεται κατά τον ίδιο παράγοντα. Σε αντίθεση με τη  $V_{\max}$ , η  $K_M$  δεν επηρεάζεται από τη καθαρή μη συναγωνιστική αναστολή. Η μέγιστη ταχύτητα παρουσία ενός καθαρού μη συναγωνιστικού αναστολέα,  $V_{\max}^{\text{app}}$ , δίνεται από

$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{1 + [I]/K_i}$$

## ΟΡΟΙ-ΚΛΕΙΔΙΑ

ένζυμο, 209	επαγόμενη προσαρμογή, 221	συναγωνιστική αναστολή, 231
υπόστρωμα, 210	$K_M$ (η σταθερά Michaelis), 223	μη συναγωνιστική αναστολή, 231
συμπαράγοντας, 211	$V_{\max}$ , 224	αντιδραστήριο με εξειδίκευση ομάδας, 233
αποένζυμο, 211	εξίσωση Michaelis-Menten, 224	ιχνηθέτης συγγένειας, 233
ολοένζυμο, 211	αριθμός μετατροπής, 226	αναστολή μηχανισμού (αυτοκτονίας), 234
συνένζυμο, 212	$k_{\text{cat}}/K_M$ , 227	ανάλογο μεταβατικής κατάστασης, 235
προσθετική ομάδα, 212	αντίδραση διαδοχικής αντικατάστασης, 229	καταλυτικό αντίσωμα, 236
ελεύθερη ενέργεια, 213	αντίδραση διπλής αντικατάστασης (πινγκ-πονγκ), 230	βιταμίνη, 239
μεταβατική κατάσταση, 217	αλλοστερικό ένζυμο, 230	
ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης, 217		
ενεργό κέντρο, 218		

## ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Από πού να αρχίσετε

- Koshland, D. E., Jr., 1987. Evolution of catalytic function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:1-7.
- Jencks, W. P., 1987. Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:65-73.
- Lerner, R. A., and Tramontano, A., 1988. Catalytic antibodies. *Sci. Am.* 258(3):58-70.

### Βιβλία

- Fersht, A., 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company.
- Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Company.
- Page, M. I., and Williams, A. (Eds.), 1987. *Enzyme Mechanisms*. Royal Society of Chemistry.

- Bender, M.L., Bergeron, R. J., and Komiyama, M., 1984. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*. Wiley-Interscience.
- Abelson, J. N., and Simon, M. I. (Eds.), 1992. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Boyer, P. D. (Ed.), 1970. *The Enzymes* (3d ed.). Academic Press.
- Friedmann, H. (ed.), 1981. *Benchmark Papers in Biochemistry*. Vol. 1, *Enzymes*. Hutchinson Ross.

### Σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης, και άλλοι ενζυμικοί αναστολείς

- Schramm, V. L., 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67:693-720.
- Pauling, L., 1948. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 161:707-709.
- Leinhard, G. E., 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180:149-154.

Kraut, J., 1988. How do enzymes work? *Science* 242:533-540.  
 Waxman, D. J., and Strominger, J. L., 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52:825-869.  
 Abraham, E. P., 1981. The  $\beta$ -lactam antibiotics. *Sci. Am.* 244:76-86.  
 Walsh, C. T., 1984. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: Recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* 53:493-535.

**Καταλυτικά αντισώματα**

Hilvert, D., 2000. Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 69:751-794.  
 Wade, H., and Scanlan, T. S., 1997. The structural and functional basis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 461-493.  
 Lerner, R. A., Benkovic, S. J., and Schultz, P. G., 1991. At the crossroads of chemistry and immunology: Catalytic antibodies. *Science* 252:659-667.  
 Cochran, A. G., and Schultz, P. G., 1990. Antibody-catalyzed porphyrin metallation. *Science* 249:781-783.

**Ενζυμική κινητική και μηχανισμοί**

Xie, X. S., and Lu, H. P., 1999. Single-molecule enzymology. *J. Biol. Chem.* 274:15967-15970.

Miles, E. W., Rhee, S., and Davies, D. R., 1999. The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* 274:12193-12196.  
 Warshel, A., 1998. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J. Biol. Chem.* 273: 27035-27038.  
 Cannon, W. R., and Benkovic, S. J., 1999. Solvation, reorganization energy, and biological catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:26257-26260.  
 Cleland, W. W., Frey, P. A., and Gerlt, J. A., 1998. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:25529- 25532.  
 Romesberg, F. E., Santarsiero, B. D., Spiller, B., Yin, J., Barnes, D., Schultz, P. G., and Stevens, R. C., 1998. Structural and kinetic evidence for strain in biological catalysis. *Biochemistry* 37:14404-14409.  
 Lu, H. P., Xun, L., and Xie, X. S., 1998. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* 282:1877-1882.  
 Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J., and Wells, T. N. C., 1986. Binding energy and catalysis: A lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 11:321-325.  
 Jencks, W. P., 1975. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: The Circe effect. *Adv. Enzymol.* 43:219-410.  
 Knowles, J. R., and Albery, W. J., 1976. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631-5640.

**ΑΣΚΗΣΕΙΣ**

1. *Υδρολυτική κινητήρια δύναμη.* Η υδρόλυση του πυροφωσφορικού σε ορθοφωσφορικό είναι σημαντική στο να οδηγεί προς τα δεξιά βιοσυνθετικές αντιδράσεις όπως τη σύνθεση του DNA. Αυτή η αντίδραση υδρόλυσης καταλύεται στο βακτήριο *E. coli* από μια πυροφωσφατάση που έχει μοριακό βάρος 120 kd και αποτελείται από έξι ίδιες υπομονάδες. Για το ένζυμο αυτό, μια μονάδα δραστηριότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 10  $\mu$ mol πυροφωσφορικού σε 15 λεπτά στους 37°C κάτω από πρότυπες συνθήκες αντίδρασης. Το καθαρισμένο ένζυμο έχει μια  $V_{max}$  ίση με 2.800 μονάδες ανά mg ενζύμου.

- (α) Πόσα mol υποστρώματος υδρολύονται ανά δευτερόλεπτο ανά mg ενζύμου όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ ;
- (β) Πόσα mol ενεργών κέντρων υπάρχουν σε 1 mg ενζύμου; Υποτίθεται ότι κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό κέντρο.
- (γ) Ποιος είναι ο αριθμός μετατροπής του ενζύμου; Να συγκρίνετε την τιμή αυτή με άλλες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο αυτό.

2. *Αποσταθεροποιώντας τον Δούρειο Ίππο.* Η πενικιλίνη υδρολύεται από την πενικιλινάση (επίσης γνωστή ως λακταμάση  $\beta$ ), ένα ένζυμο που υπάρχει σε μερικά ανθεκτικά βακτήρια, και ως εκ τούτου καθίσταται ανενεργός. Το μοριακό βάρος αυτού του ενζύμου στον *Staphylococcus aureus* ισούται με 29,6 kd. Η ποσότητα της πενικιλίνης που υδρολύεται σε 1 λεπτό σε 10 ml διαλύματος που περιέχει  $10^{-9}$  g καθαρής πενικιλινάσης μετρήθηκε ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της πενικιλίνης. Ας υποθέ-

σουμε ότι η συγκέντρωση της πενικιλίνης δεν αλλάζει σημαντικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

**[Πενικιλίνη] Ποσότητα που υδρολύεται (μM) (nanomol)**

[Πενικιλίνη] (μM)	Ποσότητα που υδρολύεται (nanomol)
1	0,11
3	0,25
5	0,34
10	0,45
30	0,58
50	0,61

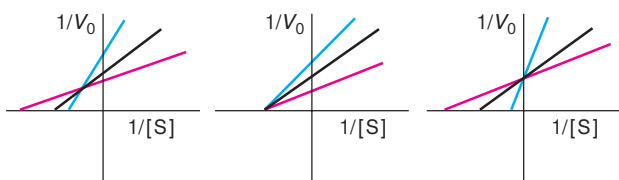
- (α) Να σχεδιάσετε το διάγραμμα  $V_0$  σε συνάρτηση με την  $[S]$  και το διάγραμμα  $1/V_0$  σε συνάρτηση με την  $1/[S]$  για τα δεδομένα αυτά. Η πενικιλινάση ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten; Εάν είναι έτσι, ποια είναι η τιμή της  $K_M$ ;
- (β) Ποια είναι η τιμή της  $V_{max}$ ;
- (γ) Ποιος είναι ο αριθμός μετατροπής της πενικιλινάσης κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες; Υποθέτουμε ότι υπάρχει ένα ενεργό κέντρο για κάθε μόριο ενζύμου.

- 3. *Αντίστιξη.* Η πενικιλινάση ( $\beta$ -λακταμάση) υδρολύει πενικιλίνη. Να συγκρίνετε την πενικιλίνη με την τρανσπεπτιδάση των γλυκοπεπτιδίων.
- 4. *Τρόπος αναστολής.* Η κινητική ενός ενζύμου μετράται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος παρουσία και απουσία 2 mM αναστολέα (I).

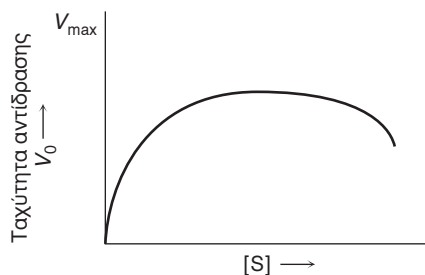




μάτων που ακολουθούν θα περιμένατε να προκύψει; Να εξηγήσετε.

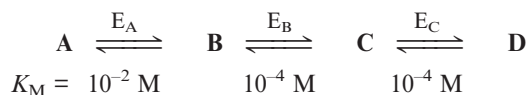


13. *Περισσότερο από κάτι καλό.* Ένα απλό ένζυμο Michaelis-Menten, απουσία αναστολέα επέδειξε την παρακάτω κινητική συμπεριφορά. Η αναμενόμενη τιμή της  $V_{max}$  δείχνεται στο άξονα των  $y$ .



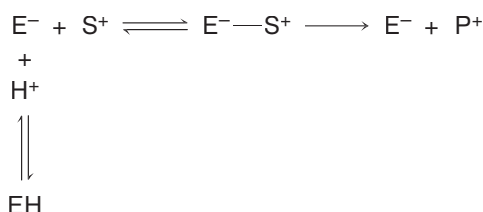
(α) Να σχεδιάσετε το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου που ανταποκρίνεται στην ταχύτητα ως προς την καμπύλη του υποστρώματος.  
 (β) Να δώσετε μια εξήγηση των αποτελεσμάτων της κινητικής.

14. *Καθοριστικό βήμα ταχύτητας.* Κατά τη μετατροπή του A σε D στην ακόλουθη βιοχημική πορεία, τα ένζυμα  $E_A$ ,  $E_B$ , και  $E_D$ , έχουν τιμές  $K_M$  που αναγράφονται κάτω από κάθε ένζυμο. Εάν όλα τα υποστρώματα και τα προϊόντα είναι παρόντα σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M, ποιο βήμα θα είναι το καθοριστικό της ταχύτητας και γιατί;



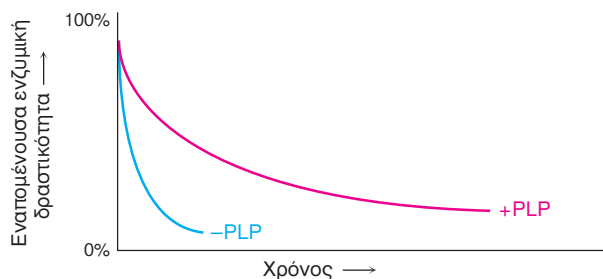
**Ασκήσεις συνδυασμού ύλης από διάφορα κεφάλαια**

15. *Πειράματα τιτλοδότησης.* Εξετάστηκε η επίδραση του pH στη δραστηριότητα ενός ενζύμου. Το ένζυμο, στο ενεργό κέντρο του, έχει μια ιοντιζόμενη ομάδα η οποία πρέπει να είναι αρνητικά φορτισμένη για να προσδεθεί το υπόστρωμα και να λάβει χώρα η κατάλυση. Η τιμή  $pK_a$  της ιοντιζόμενης ομάδας είναι 6,0. Το υπόστρωμα είναι θετικά φορτισμένο σε όλη την περιοχή pH του πειράματος.



(α) Να σχεδιάσετε τη  $V_0$  ως προς την καμπύλη του pH όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$  του ενζύμου.  
 (β) Να σχεδιάσετε τη  $V_0$  ως προς την καμπύλη του pH όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μικρότερη από την  $K_M$  του ενζύμου.  
 (γ) Σε ποια τιμή pH η ταχύτητα θα είναι ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας κάτω από τις συνθήκες αυτές;

16. *Ζήτημα σταθερότητας.* Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι ένα συνένζυμο της αμινομεταφοράς της ορνιθίνης. Το ένζυμο απομονώθηκε από κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά μέσα με έλλειψη PLP καθώς επίσης σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν PLP. Μετρήθηκε η σταθερότητα του ενζύμου με επώαση στους  $37^\circ\text{C}$  και προσδιορισμό της εναπομένουσας ενζυμικής δραστηριότητας. Αποκτήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



(α) Γιατί κατά τη διάρκεια της επώασης ελαττώνεται η ποσότητα του ενεργού ενζύμου;  
 (β) Γιατί ελαττώνεται πιο γρήγορα η ποσότητα του ενζύμου που προέρχεται από κύτταρα με έλλειψη PLP;

**Άσκηση πολυμέσων**

17. *Δεν δημιουργούνται ίσα όλα τα σημεία των δεδομένων.* Ο συνηγάτης σας στο εργαστήριο, ο οποίος είναι και συστηματικός και οικονομός, αποφασίζει να κάνει μια σειρά από ενζυμικούς προσδιορισμούς σε συγκεντρώσεις υποστρώματος των 1, 2, 4, και 8  $\mu\text{M}$ . Διαφωνείτε και ζητάτε να κάνει τα πειράματα σε  $[S] = 1, 4, 16,$  και  $100 \mu\text{M}$ . Να δοκιμάσετε και τις δύο σειρές των πειραμάτων χρησιμοποιώντας το εργαστήριο προσομοίωσης της ενζυμικής κινητικής στο **Conceptual Insights / Steady-State Enzyme Kinetics**. Ποιος είχε την καλύτερη ιδέα και γιατί;