

Ένζυμα Κινητική

- 1. Κινητική Michaelis-Menten (καμπύλη υπερβολής, μία πολυπεπτιδική αλυσίδα)**
- 2. Κινητική Συνεργατικότητας (σιγμοειδής καμπύλη, δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες)**

Μάκης Ζωιδάκης
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
izoidakis@biol.uoa.gr

Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Η ενεργότητα ενός ενζύμου εκφράζεται συνήθως με την ταχύτητα της αντίδρασης και ορίζεται ως τα moles του μετατρεπόμενου υποστρώματος ανά μονάδα χρόνου

Οι πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού της δραστηριότητας των ενζύμων:

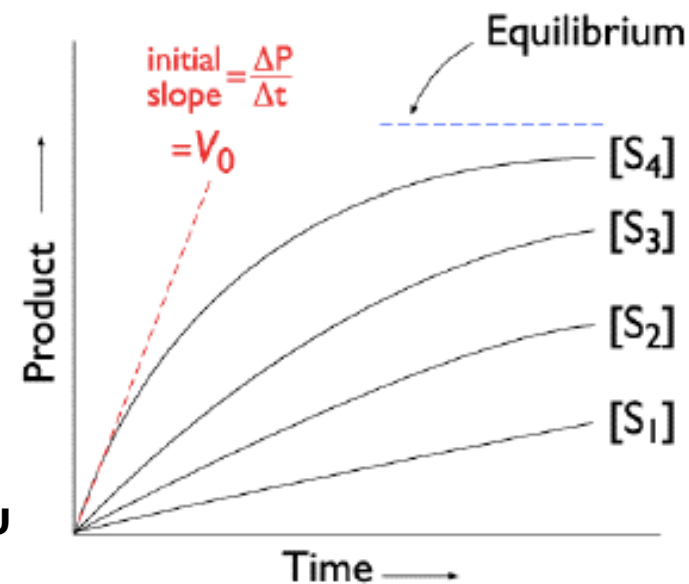
- βασίζονται στη μέτρηση, είτε της κατανάλωσης του υποστρώματος (S), είτε της εμφάνισης του προϊόντος της αντίδρασης (P)
- οι μέθοδοι μέτρησης μπορεί να είναι συνεχείς ή ασυνεχείς
- είναι κυρίως φασματοφωτομετρικές. Εναλλακτικά είναι πεχαμετρικές, χρωματογραφικές, με χρήση ραδιενέργειας, NMR, φασματομετρίας μάζας κ.λ.π.

$$V = -\Delta S / \Delta t = \Delta P / \Delta t$$

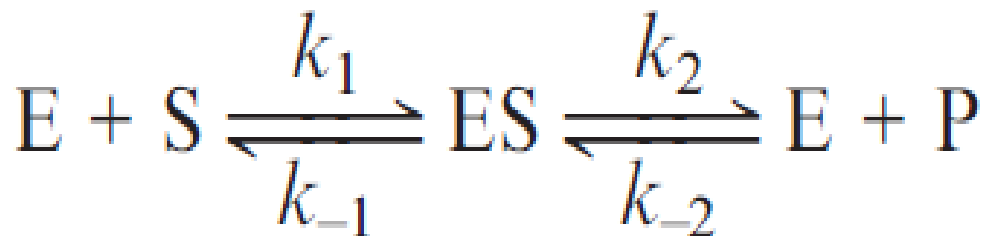
Η μέτρηση της ενεργότητας γίνεται συνήθως μέσω του καθορισμού της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης (V_0)



Σχεδιάστε το αντίστοιχο διάγραμμα που δείχνει τη μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S)

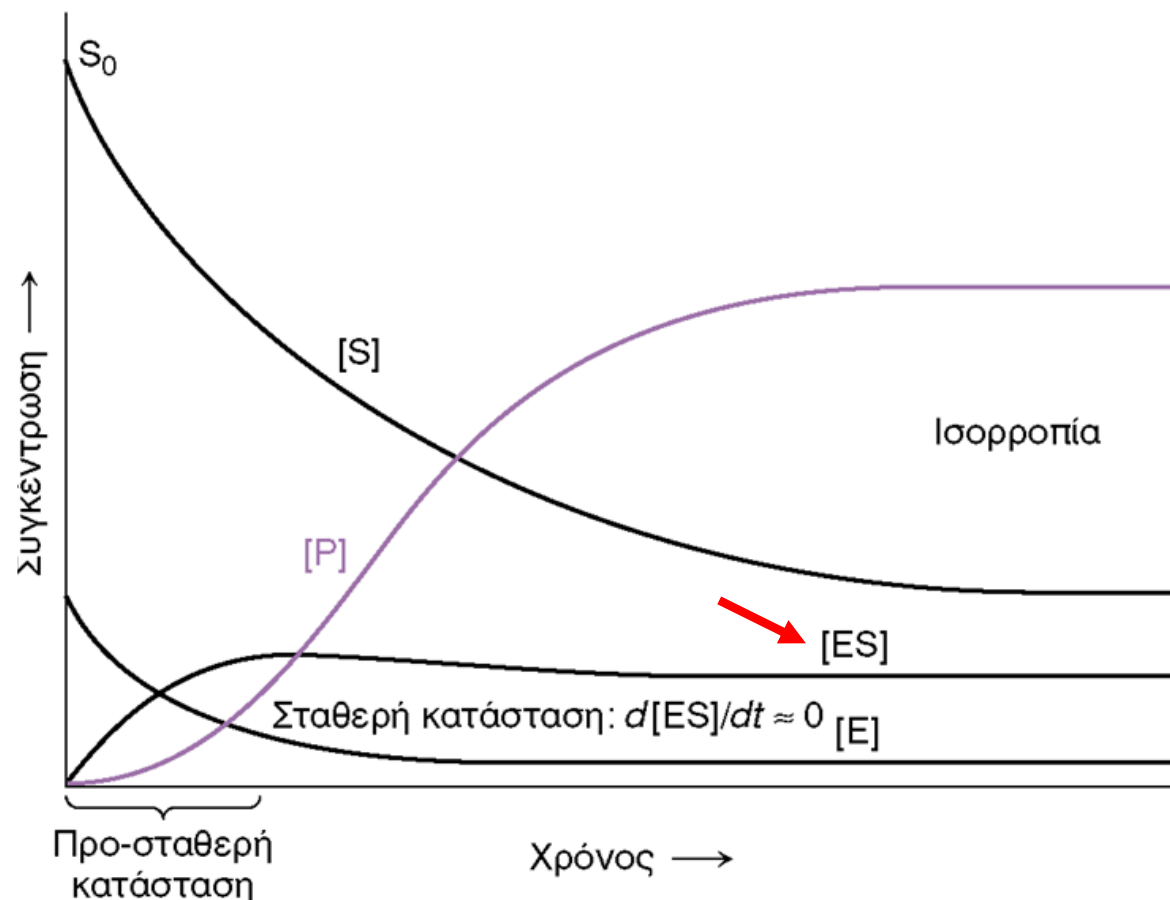
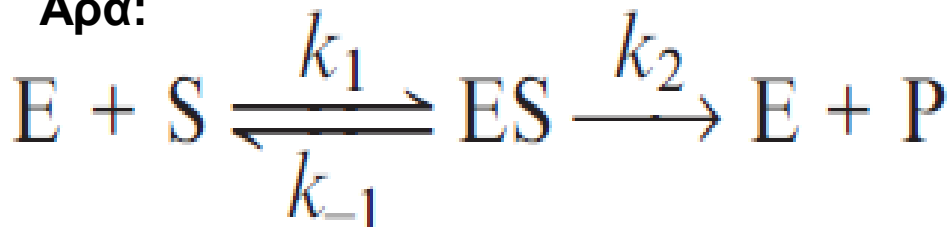


Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων κατά Michaelis Menten



Όταν μετράμε την αρχική ταχύτητα η $[P]$ είναι αμελητέα οπότε μπορούμε να αποδεχθούμε ότι $k_{-2}[P] \sim 0$.

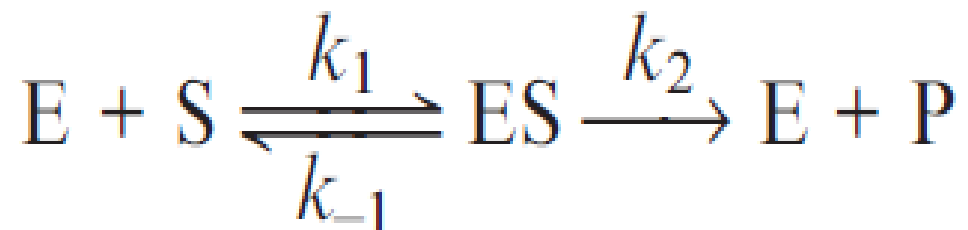
Άρα:



Στη σταθερή κατάσταση (steady state) η συγκέντρωση του ES παραμένει σταθερή, ενώ οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος S και του προϊόντος P αλλάζουν. Αυτό συμβαίνει όταν οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου ES είναι ίσες.

$$\text{Δηλαδή } k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων κατά Michaelis Menten



Η ταχύτητα της αντίδρασης $V_0 = k_2 [ES]$ ισούται με

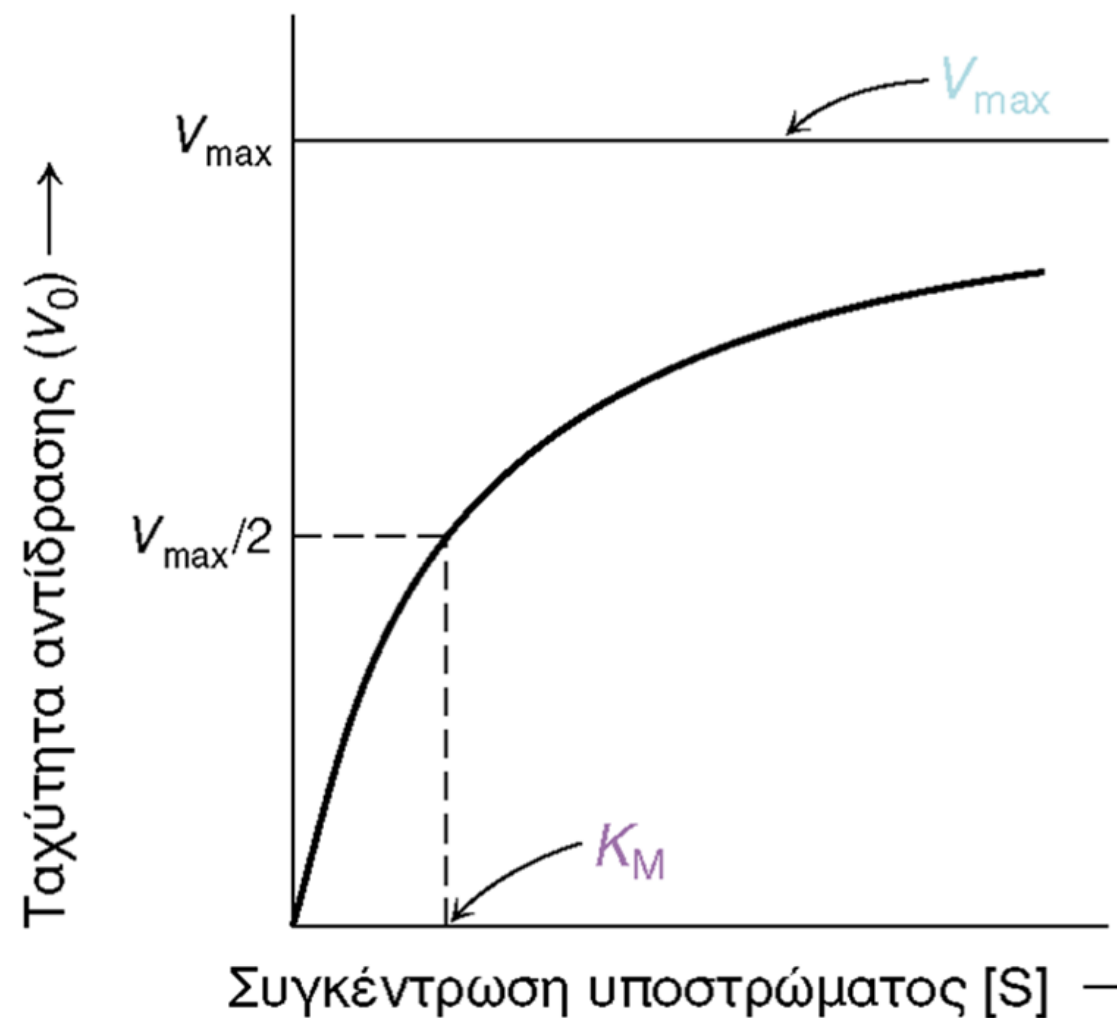
$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

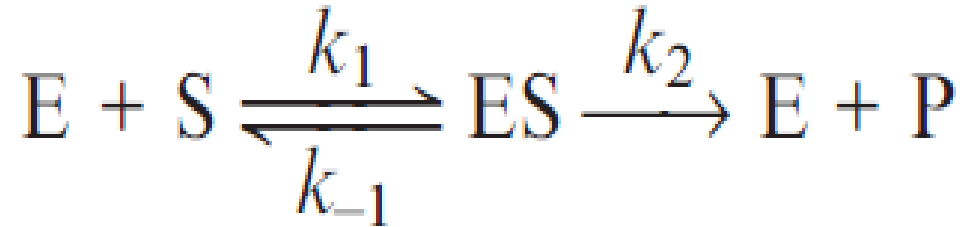
Ορίζουμε ως $k_{\text{cat}} = k_2$

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_T$$

$$[E]_T = [E] + [ES]$$



Σημασία της K_M



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

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Όταν $[S] = K_M$, τότε $V_0 = V_{\max}/2$

Η K_M είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της.

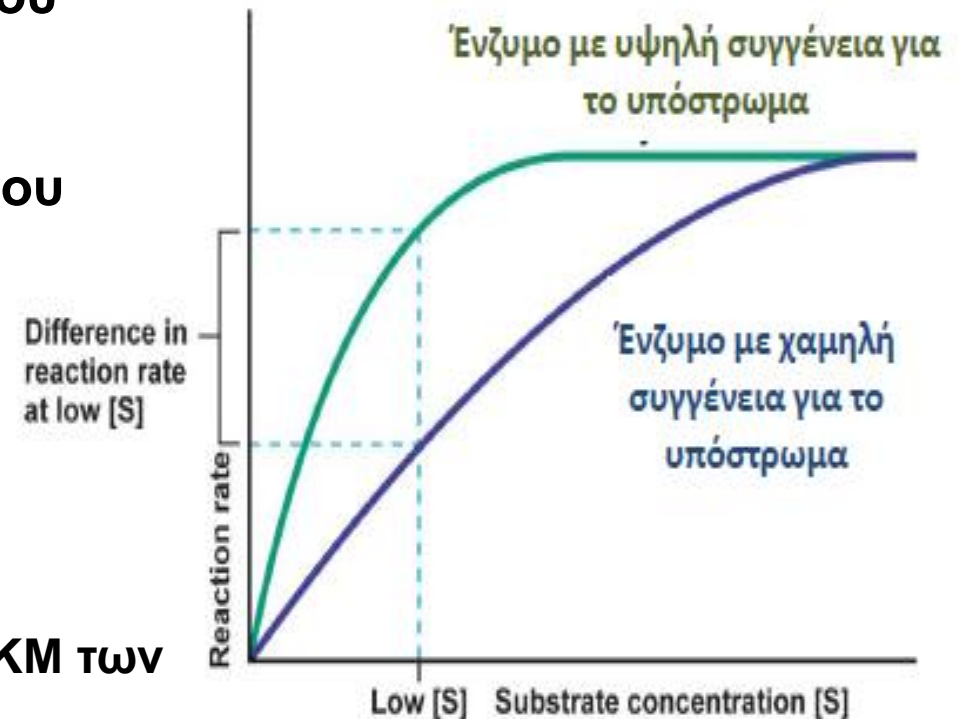
Αποτελεί ένδειξη της δυνατότητας πρόσδεσης ενός ενζύμου στο υπόστρωμα του.

Στα περισσότερα ένζυμα για τα οποία ισχύει η κινητική Michaelis-Menten έχουμε $k_{-1} \gg k_2$ άρα

$$K_M = k_{-1}/k_1$$

Ποια είναι η σημασία αυτής της μαθηματικής σχέσης;

Στο γράφημα να προστεθούν οι K_M των δύο ενζύμων



Σημασία της k_{cat}

$$V_{max} = k_{cat} [E]_T$$

Η k_{cat} είναι ο αριθμός μετατροπής (turnover number) ενός ενζύμου, και ορίζεται ως 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 ($[S] \gg K_M$).

Αποτελεί μέτρηση της μέγιστης καταλυτικής δραστηριότητας ενός ενζύμου.

Όμως στην πράξη η συγκέντρωση υποστρώματος των περισσότερων ενζύμων δεν είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_M .

Οι μονάδες της k_{cat} είναι συνήθως sec^{-1} ή min^{-1}

Σημασία του λόγου k_{cat}/K_M (καταλυτική αποτελεσματικότητα)

Αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέτρηση της δραστηρότητας ενός ενζύμου σε φυσιολογικές συνθήκες

- Επιτρέπει τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας διαφορετικών ενζύμων που καταλύουν την μετατροπή του ίδιου υποστρώματος**
- Επιτρέπει την σύγκριση της αποτελεσματικότητας ενός ενζύμου για την μετατροπή διαφορετικών υποστρωμάτων**

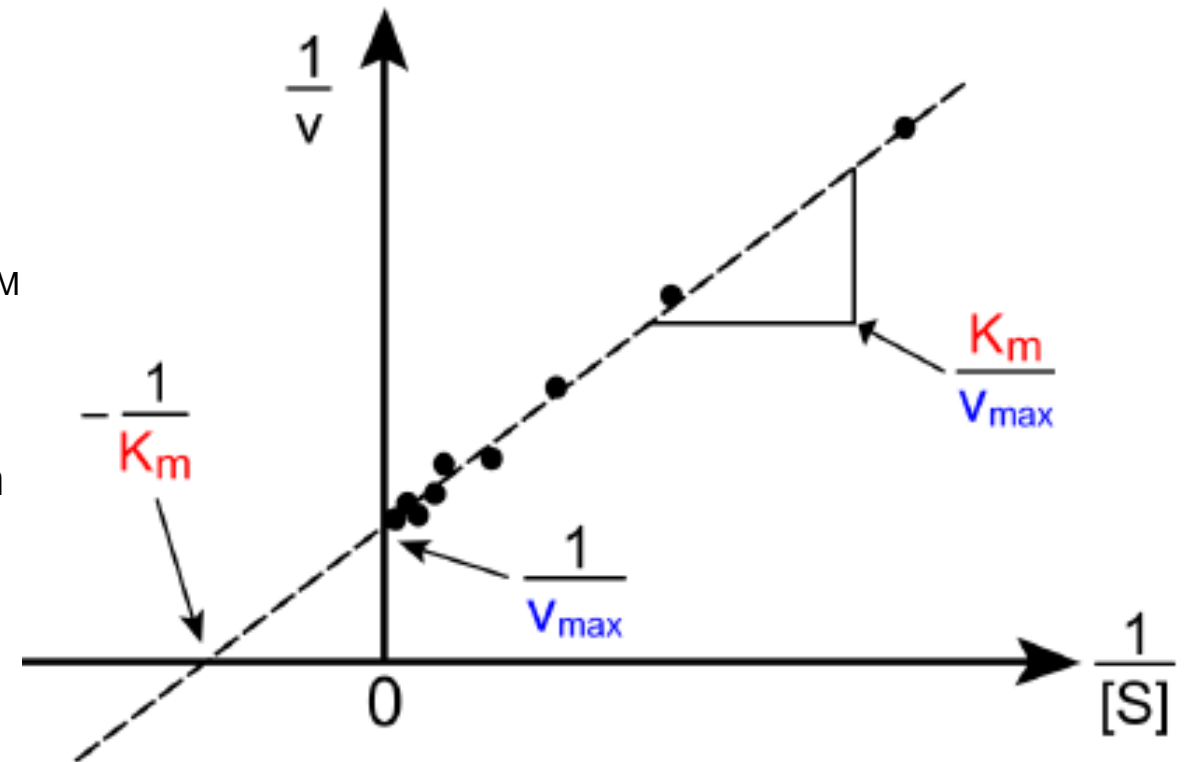
Προσδιορισμός της K_M και της V_{max}

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

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

Το διάγραμμα Lineweaver Burk ($1/V_0$ έναντι του $1/[S]$) παράγει μια ευθεία γραμμή με τεταγμένη επί την αρχή $1/V_{max}$, κλίση K_M/V_{max} και τετμημένη επί την αρχή $1/K_M$

Οι K_M και V_{max} μπορούν να καθοριστούν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού ικανού να χρησιμοποιήσει τα πειραματικά δεδομένα και την εξίσωση Michaelis Menten



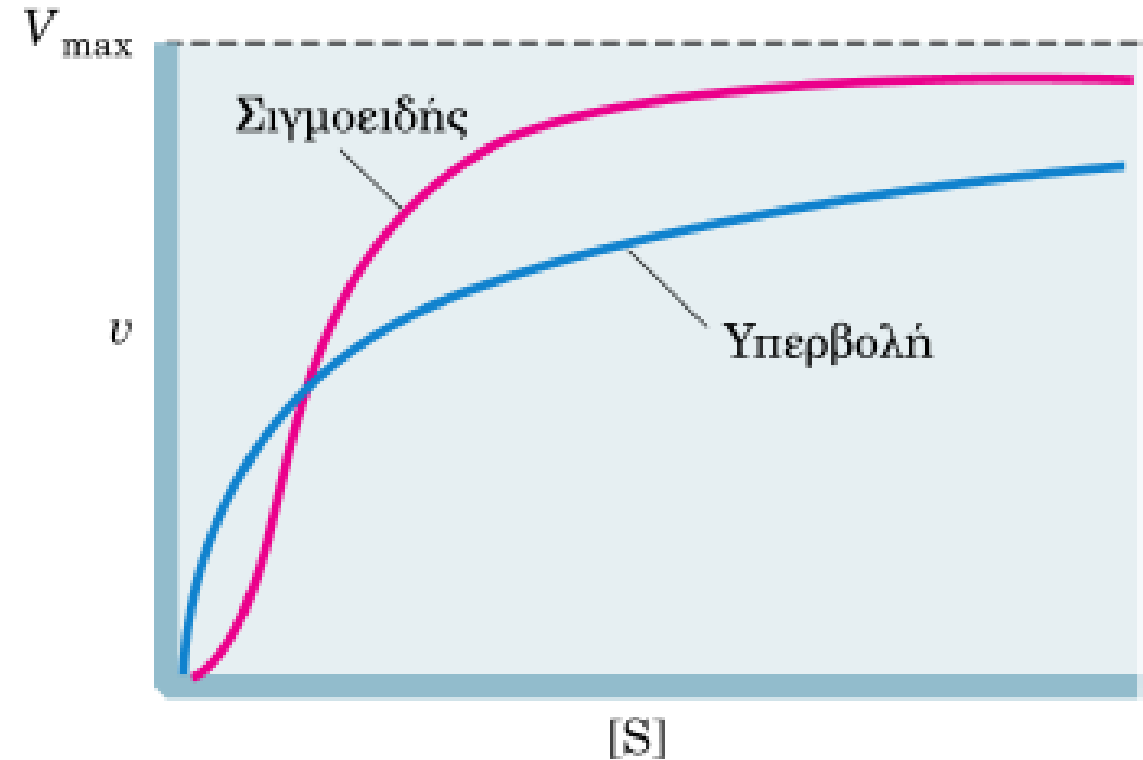
Κινητική Συνεργατικότητας Αλλοστερικά Ένζυμα

Αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα (υπομονάδα) και κάθε υπομονάδα έχει μια θέση πρόσδεσης για το υπόστρωμα, καθώς και μια ξεχωριστή θέση δέσμευσης για αλλοστερικούς ρυθμιστές (ενεργοποιητές ή αναστολείς).

Η αλληλεπίδραση ενός αλλοστερικού ενζύμου με ρυθμιστές μεταβάλλει την διαμόρφωση των υπομονάδων του και κατά συνέπεια την κινητική του συμπεριφορά

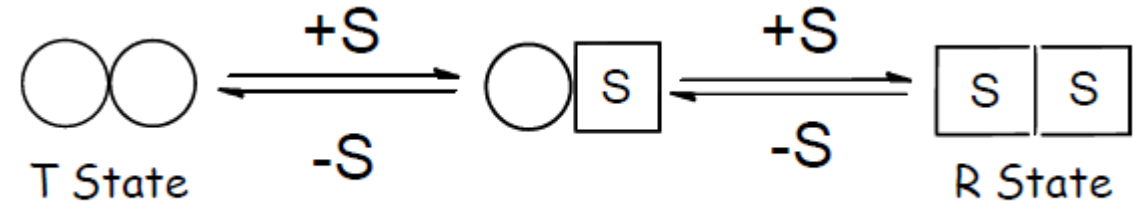
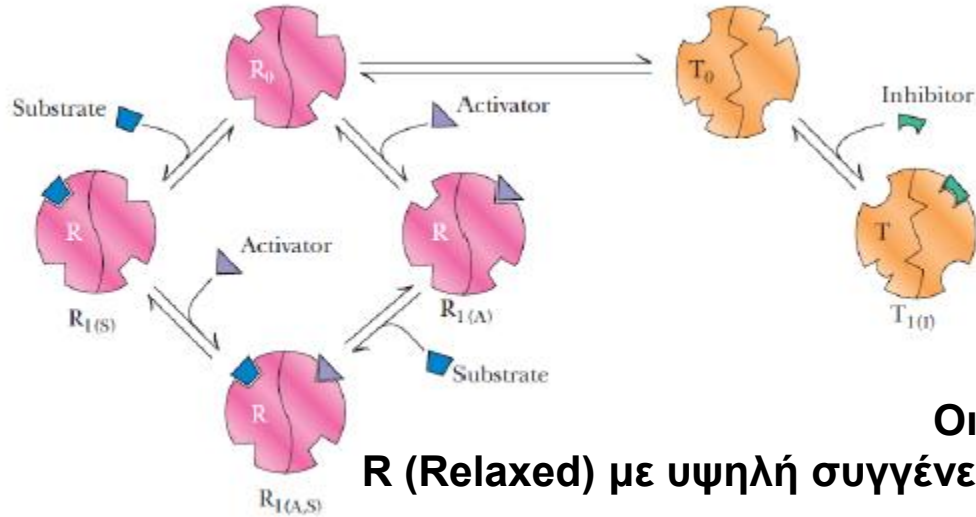
Τα αλλοστερικά ένζυμα συνήθως καταλύουν κομβικές αντιδράσεις του μεταβολισμού οι οποίες πρέπει να ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια

Ορίζουμε ως $[S]_{0.5}$ την συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία $v = V_{max}/2$



Δύο θεωρίες για την αλλοστερική κινητική

Μοντέλο των Monod, Wyman, Changeux (MWC) Το μοντέλο των Koshland, Nemethy και Filmer (μοντέλο KNF)



Οι υπομονάδες του ενζύμου μπορούν να δύο δομές

R (Relaxed) με υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα και T (Tense) με χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα

Το υπόστρωμα (S) δεσμεύεται μόνο στην κατάσταση R.
Η δέσμευση του S διαταράσσει την ισορροπία $R \leftrightarrow T$ υπέρ της κατάστασης R και συνεπώς περισσότερης δέσμευσης S

Οι ενεργοποιητές δεσμεύονται μόνο στην κατάσταση R
και έτσι προκαλούν μια μετατόπιση της ισορροπίας $R \leftrightarrow T$ υπέρ της R και επομένως της ευκολότερης σύνδεσης του S.

Οι αναστολείς δεσμεύονται μόνο στην κατάσταση T και έτσι προκαλούν μια μετατόπιση της ισορροπίας $R \leftrightarrow T$ υπέρ της T και επομένως της δυσκολότερης σύνδεσης του S.

Βασίζεται στις επαγόμενες από προσδέτη (υπόστρωμα/ρυθμιστή) αλλαγές διαμόρφωσης

Η μεταβολή διαμόρφωσης που προκαλείται από αλλοστερικούς ρυθμιστές θα μπορούσε να προκαλέσει την μετάπτωση των υπομονάδων μιας ολιγομερούς πρωτεΐνης από μία κατάσταση χαμηλής συγγένειας σε μια κατάσταση υψηλής συγγένειας (θετική συνεργατικότητα) ή σε μια κατάσταση χαμηλότερης συγγένειας (αρνητική συνεργατικότητα).

Αναδραστική αναστολή (feedback inhibition)

Το τελικό προϊόν ενός μεταβολικού μονοπατιού, αναστέλλει το ένζυμο που καταλύει την πρώτη αντίδραση.

