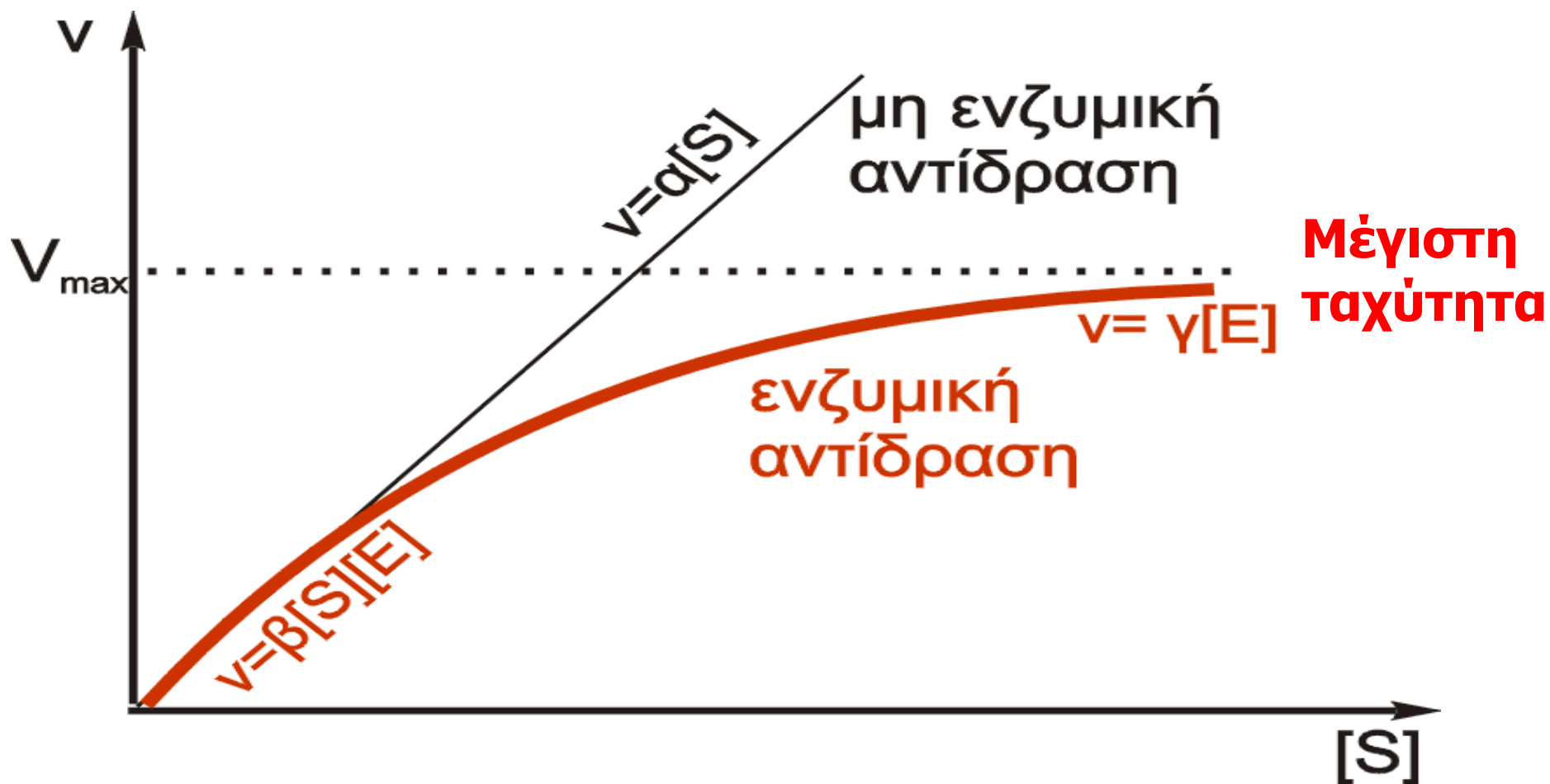


Επίδραση της [S] στην V

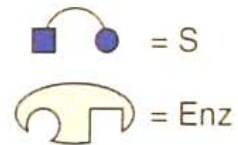
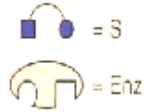
- Η πλειοψηφία των ενζυμικών αντιδράσεων περιλαμβάνει περισσότερα από ένα υποστρώματα
- Αυτό ισχύει ακόμα και για τις υδρολάσεις, οι οποίες συχνά θεωρούνται αντιδράσεις ενός υποστρώματος, αφού το H_2O , υπάρχει σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις
- Αν και η περίπτωση των ενζυμικών αντιδράσεων ενός υποστρώματος είναι σπάνια στα βιοχημικά συστήματα, παρ' όλ' αυτά αντιπροσωπεύει ένα **χρήσιμο μοντέλο για την ανάπτυξη της θεωρίας της ενζυμικής κινητικής**
Τα περισσότερα συμπεράσματα που εξάγονται βρίσκουν εφαρμογή και στα πιο πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα
- Η συγκέντρωση του υποστρώματος [S], είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα v των ενζυμικών αντιδράσεων

Επίδραση της $[S]$ στην V

$V = f([S])$ υπερβολή

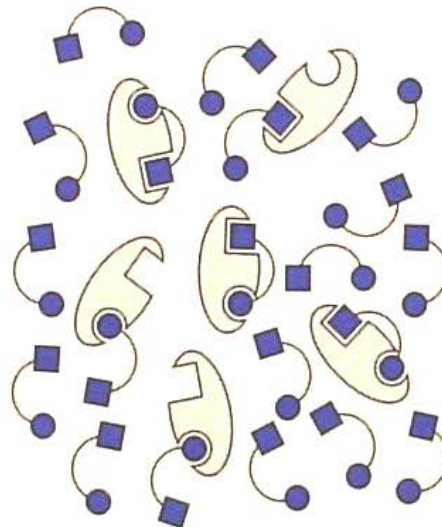


Κινητική κορεσμού



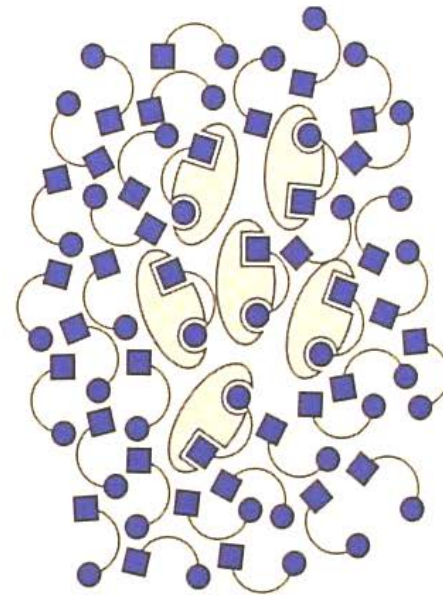
A

A. Μικρή [S]



B

**B. 50 % [S]
ή K_m**



C

C. κορεσμός

Μαθηματική Έκφραση



$$V = f([S])$$

$$V = d[P] / dt = k_2 [ES]$$

Michaelis-Menten

Παραδοχές

$$K_{-1} \gg K_2$$

$$[S_t] = [S]$$

Briggs-Haldane

Παραδοχές

$$V_{\text{σχ. ES}} = V_{\text{διασ. ES}}$$

$$K_M = K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{\kappa_{-1}}{\kappa_1}$$

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

$$K_M = \frac{\kappa_{-1} + \kappa_2}{\kappa_1} = K_S + \frac{\kappa_2}{\kappa_{+1}}$$

Αντιπροσωπεύει την καμπύλη της υπερβολής

Φυσική σημασία K_m

- Χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ένζυμο για συγκεκριμένο S

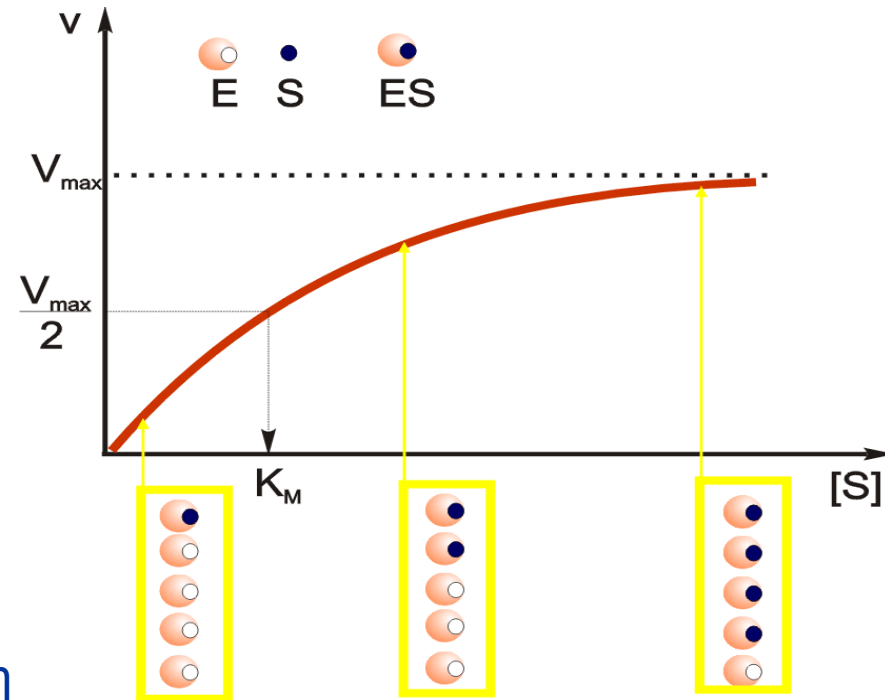
- Έχει μονάδες συγκέντρωσης

όταν $V = V_{max}/2$

$$V_{max}/2 = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

$$K_m + [S] = 2[S] \Rightarrow K_m = [S]$$

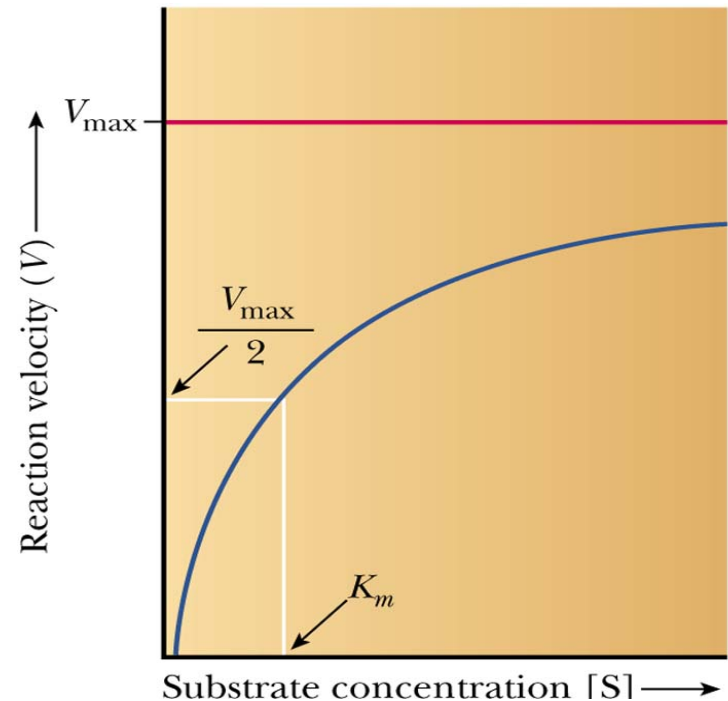
Δηλαδή η K_m ισούται με εκείνη τη $[S]$ όπου η ταχύτητα της αντίδρασης έχει την τιμή $V_{max}/2$



- Ποσοτική έκφραση της αντίδρασης σχηματισμού του ES
- Όσο $\uparrow K_m$ τόσο $\downarrow$ η τάση σύνδεσης μεταξύ E και S και αντίστροφα
- Είναι ανεξάρτητη από τη $[E]$

Φυσική σημασία V_{max}

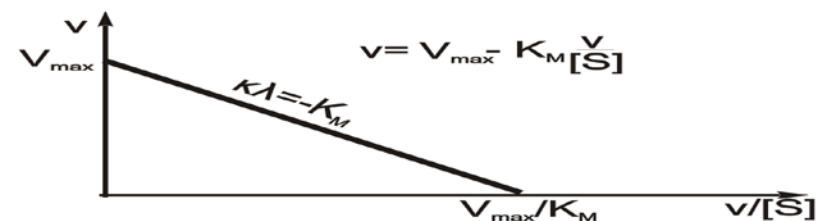
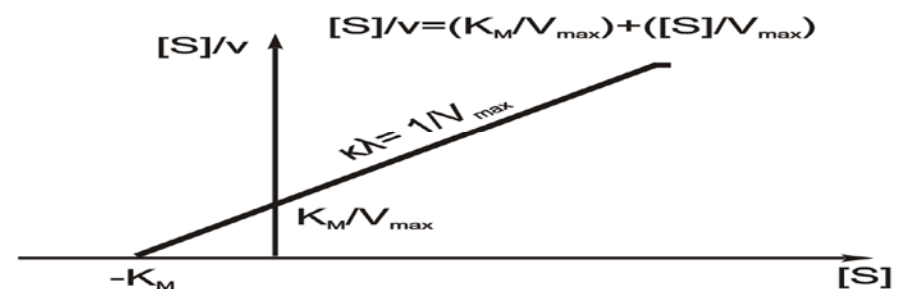
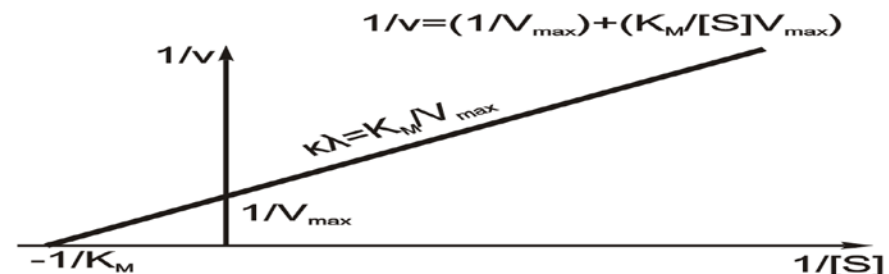
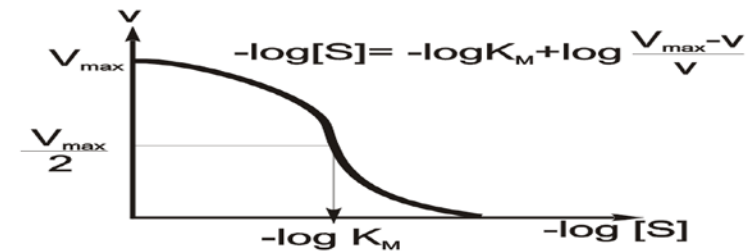
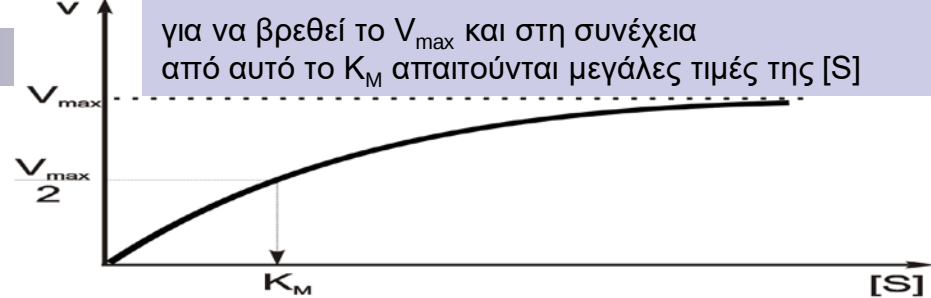
- Ποσοτική έκφραση της αντίδρασης διάσπασης του ES
- Έχει μονάδες ρυθμού : M/min
- Είναι θεωρητικά ο μέγιστος ρυθμός της αντίδρασης και δεν επιτυγχάνεται στην πραγματικότητα
- Για να αποκτηθεί η V_{max} πρέπει όλο το E να βρίσκεται δεσμευμένο με το S
- **Εξαρτάται από τη [E]**



Γραφικές παραστάσεις της εξίσωσης M-M

Η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να αποδοθεί σε πολλά διαγράμματα διαφορετικών τύπων
Το μόνο που απαιτείται είναι ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Από τις γραφικές αυτές παραστάσεις μπορούν να υπολογιστούν τα K_M και V_{max}

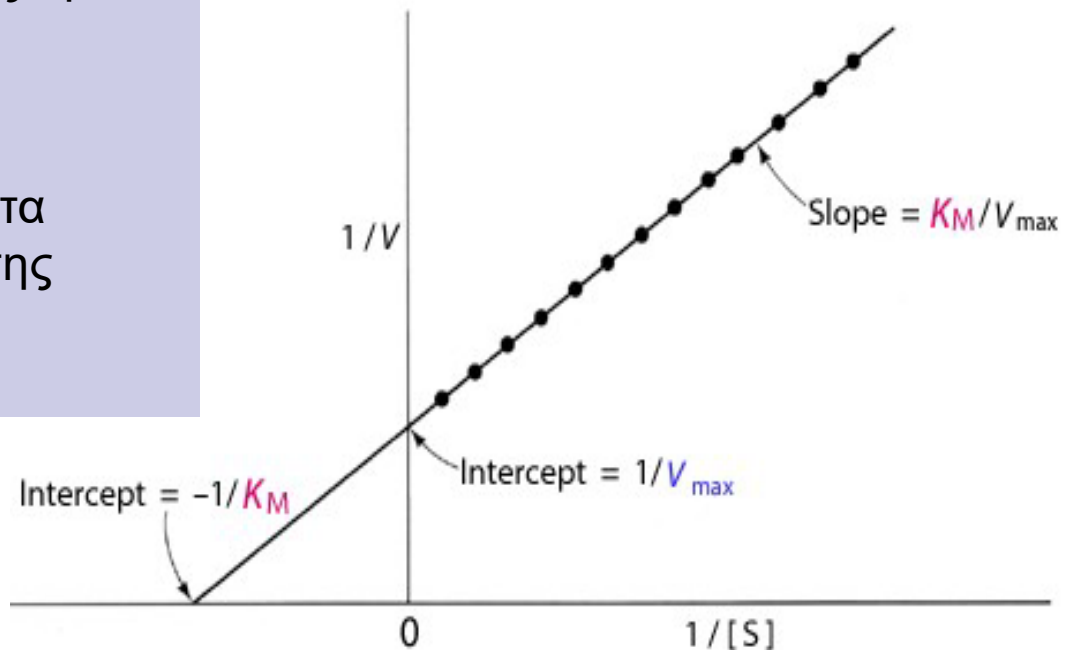


Διάγραμμα -Lineweaver-Burk

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{v_{\max} [S]} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Το μειονέκτημα αυτής της περίπτωσης είναι ότι η χρήση μικρών $[S]$ οδηγεί σε μεγάλες τιμές $1/[S]$ και επομένως, η κλίση της ευθείας καθορίζεται κυρίως από μεγάλες τιμές $1/[S]$

οπότε το σφάλμα που προκύπτει στα σημεία τομής από την προέκταση της ευθείας είναι πολλαπλάσιο του σφάλματος της κλίσης της ευθείας



Αναστολεις

Αναστολή :

η μείωση ης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασής λόγω επίδρασης της αντίδρασης $E + I \rightleftharpoons EI$ στην κινητική του ενζυμικού συστήματος.

- **Αντιστρεπτή αναστολή:**

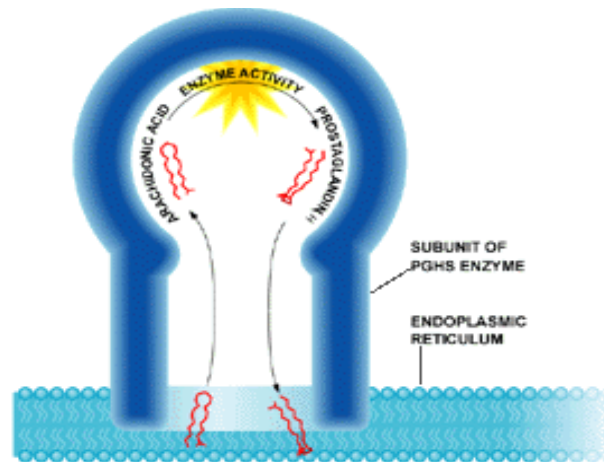
Οι δεσμοί σύνδεσης E και I είναι ασθενείς $E + I \rightleftharpoons EI$ υπάρχει σταθερά αστάθειας K_i που αποτελεί και το μέτρο της συγγένειας του E προς το I.

- **Μη αντιστρεπτή αναστολή :**

Οι δεσμοί E και I είναι σταθεροί $E + I \rightarrow EI$ υπάρχει σταθερά ταχύτητας (κ), που δηλώνει το κλάσμα του E που αναστέλλεται σε ορισμένη χρονική περίοδο και από ορισμένη συγκέντρωση I.

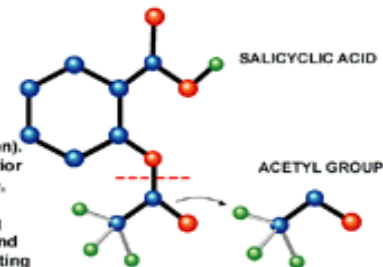
Παραδείγματα μη αντιστρεπτής αναστολής

Η ασπιρίνη
ακετυλιώνει το ένζυμο
κυκλοξυγονάση (COX)
=> μείωση της
σύνθεσης
προσταγλαδινών
(φλεγμονωδών
μεσολαβητών)

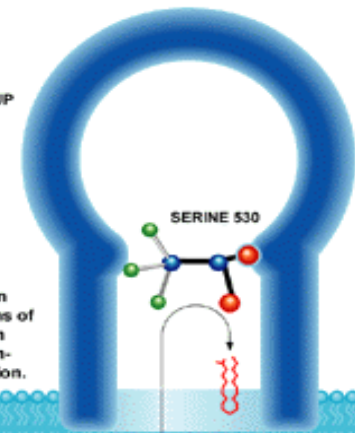


PGHS ENZYME produces the prostaglandins that cause fever and inflammation. Arachidonic acid from the endoplasmic reticulum, and internal cell membrane, moves through a channel to the core of the enzyme, where it is converted to prostaglandin H₂.

ASPIRIN MOLECULE contains an acetyl group linked to salicylic acid, including atoms of carbon (blue), oxygen (red) and hydrogen (green). When aspirin enters the interior channel of the PGHS enzyme, the molecule splits in two, with the acetyl group binding to a site inside the channel and the salicylic acid usually floating away.



NEW CONFIGURATION of the PGHS enzyme—with the acetyl group bound to a site called serine 530—blocks arachidonic acid from the core of the enzyme, thus preventing its conversion to prostaglandin H₂. Unfortunately, aspirin shuts down all forms of the PGHS enzyme, including the form that protects the stomach lining. Drug companies are now developing a new class of painkillers that target only the form of PGHS that causes inflammation.



Αναστολείς

Κάθε όμως κατηγορία περιλαμβάνει διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με το αν ο αναστολέας συνδέεται

- με το ένζυμο στο ενεργό κέντρο,
- κοντά στο ενεργό κέντρο ή
- μακριά απ' αυτό ή
- αν κάθε μόριο ενζύμου συνδέεται με περισσότερα από ένα μόρια αναστολέα.

Η μελέτη των αναστολέων των ενζυμικών αντιδράσεων:

- βοηθάει στη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των ενζύμων
- βοηθάει στη διαλεύκανση της δομής των ενζύμων
- βοηθάει στη διαλεύκανση της βιοχημικής πορείας
- έχει εφαρμογές στη φαρμακολογία και στην τοξικολογία

Αντιστρεπτές αναστολές

1. Ανταγωνιστική (*Competitive*)

↑ K_m , V_{max} σταθερή

2. Μη ανταγωνιστική (*Non-competitive*)

σταθερή K_m , ↓ V_{max}

3. Συναγωνιστική (*Uncompetitive*)

↓ V_{max} , ↓ K_m κατά το ίδιο ποσό

4. Μικτή (*Mixed*)

↓ V_{max} , ↑ K_m

Ανταγωνιστική αναστολή

Δίνει πληροφορίες για το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Ο αναστολέας (I) ανταγωνίζεται το υπόστρωμα.

Η δέσμευση γίνεται, είτε

A) στην ενεργή περιοχή του ενζύμου, όπως και το υπόστρωμα, **κλασική ανταγωνιστική αναστολή** είτε

B) σε γειτονική περιοχή (διαφορετική δηλαδή από εκείνη που δεσμεύεται το υπόστρωμα) έτσι ώστε να προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου, εμποδίζοντας τη δέσμευση του υποστρώματος (**αλλοστερική ανταγωνιστική αναστολή**).

Σαν αναστολέας μπορεί να δράσει και κάποιο άλλο υπόστρωμα (Si), που συνήθως αντιδρά πιο αργά από το S ή μια ένωση που ομοιάζει δομικά με το υπόστρωμα ή τα προϊόντα της αντίδρασης.

Η ανταγωνιστική αναστολή μπορεί να είναι είτε

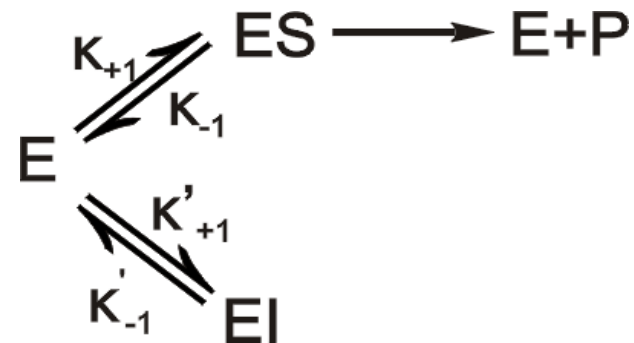
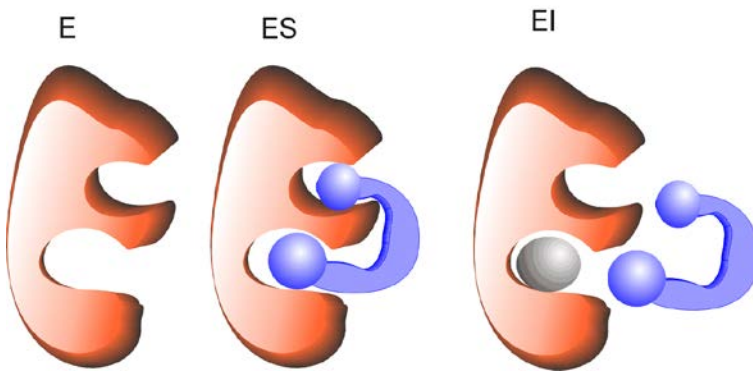
- **πλήρως** ανταγωνιστική αναστολή, είτε
- **μερικώς** ανταγωνιστική αναστολή.

Ανταγωνιστική αναστολή

Ο **I** δεσμεύεται μόνο στο E και ανταγωνίζεται το S. Αφού ενωθεί με το E δεν αντιδρά ή αντιδρά πολύ λίγο

Ο **I** ενώνεται στο ενεργό κέντρο

Πλήρως ανταγωνιστική



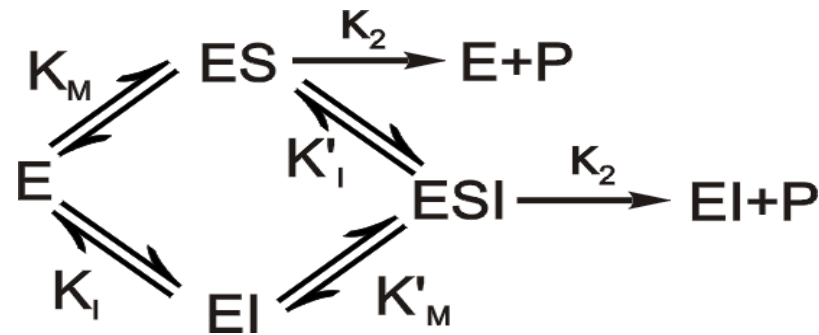
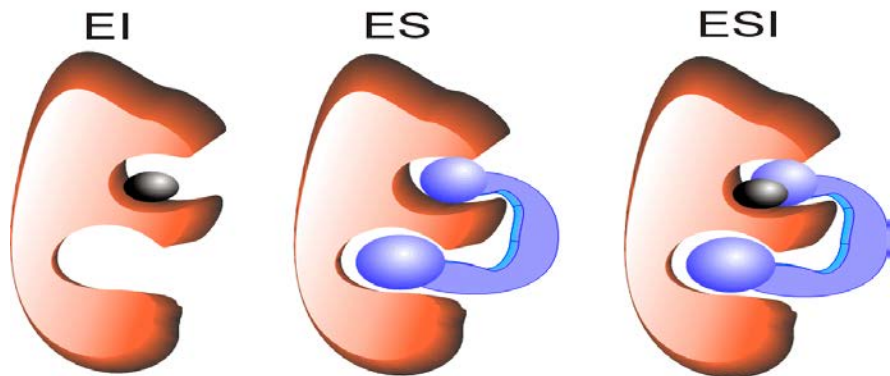
$\uparrow [S] \Rightarrow$ εξάλειψη της **I**

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

Γι' αυτό άλλωστε, παρατηρείται αύξηση του K_M , αφού απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις S για να φθάσει η αντίδραση στη $V_{\max}$ (άρα και στη $V_{\max}/2$)

Ανταγωνιστική αναστολή

Μερικώς ανταγωνιστική



➤ Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μπορεί να δεχθεί ταυτόχρονα το E και τον I (σύμπλοκο ESI).

➤ Η ανταγωνιστική αναστολή, μειώνει την τάση σύνδεσης E και S, αλλά δεν την παρεμποδίζει πλήρως

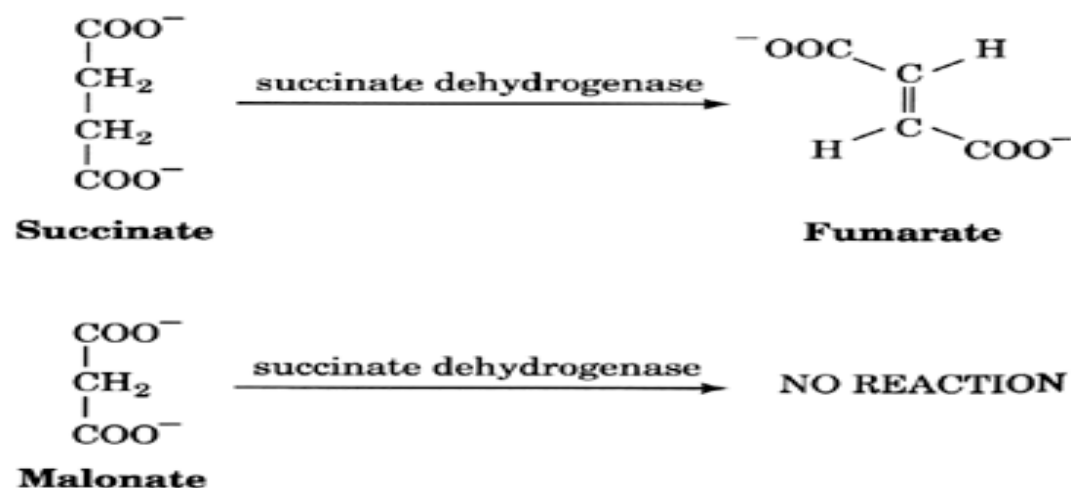
➤ Τόσο το σύμπλοκο ES όσο και το σύμπλοκο ESI, διασπώνται προς προϊόντα με την ίδια ταχύτητα.

➤ Η ολική ταχύτητα της αντίδρασης ισούται με το άθροισμά τους.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]}$$

Παράδειγμα Ανταγωνιστικής αναστολής

π.χ. => άλλος ενδογενής μεταβολίτης



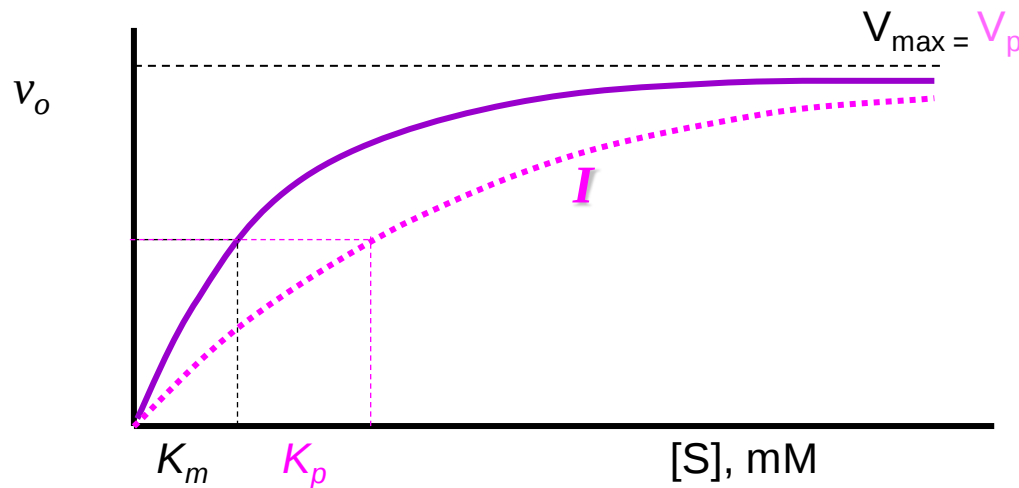
π.χ. => θεραπεία από τις δράσεις τις μεθανόλης

Αλκοολική αφυδρογονάση

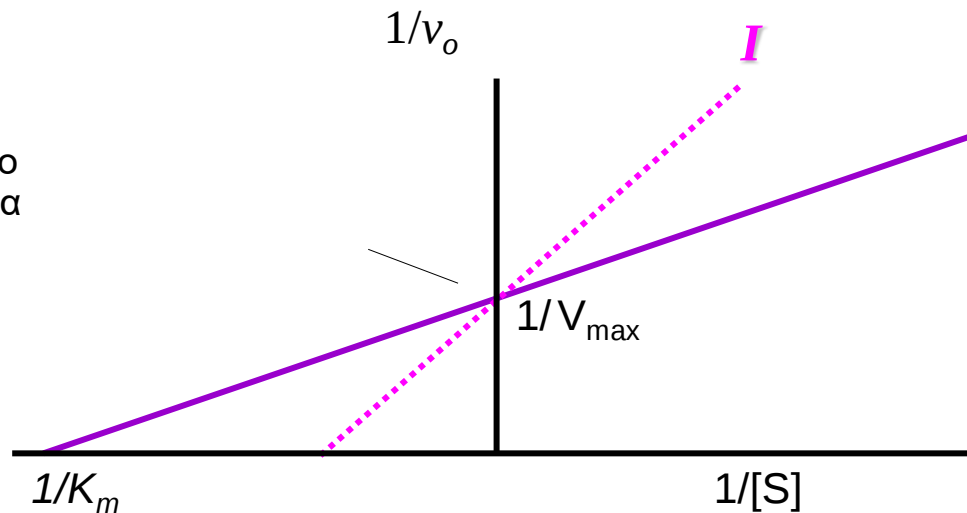


Ανταγωνιστική αναστολή

$V_{\max}$ ίδιο, K_m αυξάνει



κοινό σημείο
στον ψ άξονα

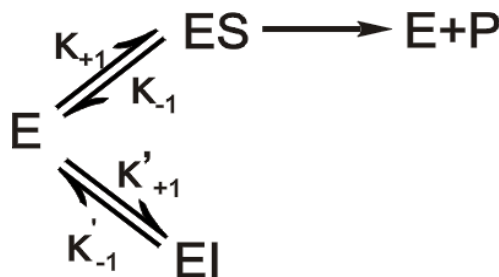


Ανταγωνιστική αναστολή

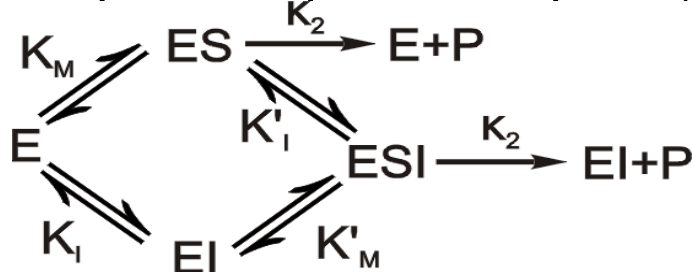
Τα δύο είδη της ανταγωνιστικής αναστολής **δεν μπορούν να διακριθούν πειραματικά με το διάγραμμα Lineweaver-Burk** αφού και στα δύο Παρατηρείται αύξηση μόνο της τιμής του K_M .

Αντίθετα, αν παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος και αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, μπορεί να γίνει διάκριση αφού

- στην πλήρως ανταγωνιστική αναστολή το K_M θα αυξάνεται συνεχώς



- στη μερικώς ανταγωνιστική αναστολή το K_M θα αυξάνεται μέχρι να φθάσει τη τιμή K'_M .



Ανταγωνιστική αναστολή

- Στην περίπτωση της **πλήρως ανταγωνιστικής αναστολής**, το K_i υπολογίζεται με τον τύπο

$$K_p = K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$
$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_p}{K_M} - 1}$$

Ανταγωνιστική αναστολή

- Μία απλή μέθοδος προσδιορισμού του K_I , με τη βοήθεια γραφικής παράστασης, στην περίπτωση της **πλήρως ανταγωνιστικής αναστολής**, είναι η μέθοδος του Dixon (1953).
- Στη μέθοδο αυτή, προσδιορίζεται η **ταχύτητα της αντίδρασης** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις I , με συγκέντρωση S σταθερή.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max} [S]} \frac{[I]}{K_I}$$

- Αν επαναληφθεί η παραπάνω πειραματική διαδικασία με **διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος**, λαμβάνεται μία δεύτερη ευθεία γραμμή.

- Η τομή των δύο γραμμών αντιστοιχεί στην τιμή $[I] = -K_I$.

