

# Δομή των πρωτεϊνών

# 2

## I. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

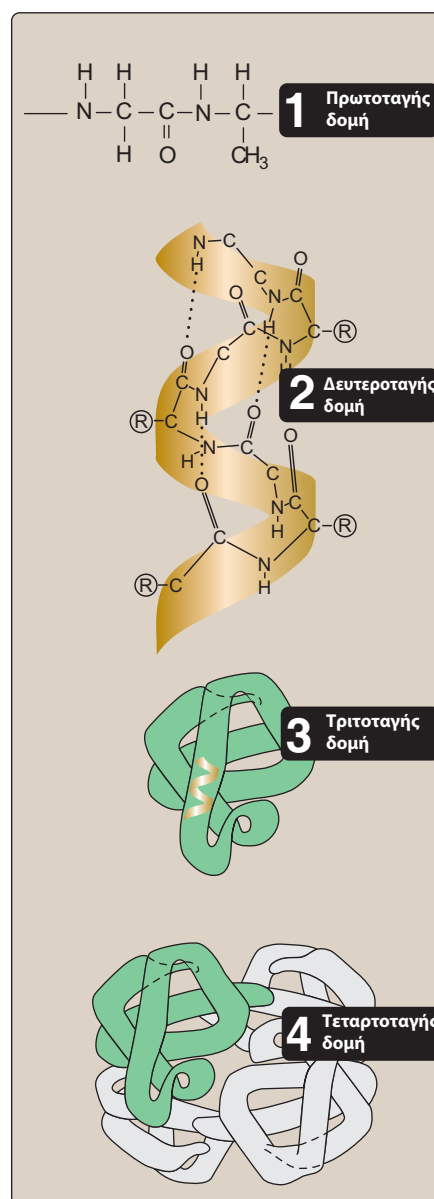
Στις πρωτεΐνες απαντώνται 20 αμινοξέα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Η γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης και την αναδίπλωσή της σε μία μοναδική τρισδιάστατη διαμόρφωση. Η πολυπλοκότητα της πρωτεϊνικής δομής αναλύεται καλύτερα αν θεωρήσουμε τέσσερα επίπεδα οργάνωσης: την πρωτοταγή, τη δευτεροταγή, την τριτοταγή και την τεταρτοταγή δομή (Εικόνα 2.1). Η επισκόπηση αυτών των επιπέδων προοδευτικά αυξανόμενης πολυπλοκότητας αποκαλύπτει ότι ορισμένα δομικά στοιχεία επαναλαμβάνονται σε μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν κάποιοι γενικοί «κανόνες» στον τρόπο με τον οποίο αναδιπλώνονται οι πρωτεΐνες στη φυσική, λειτουργική τους διαμόρφωση. Αυτά τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία ποικίλλουν από απλούς συνδυασμούς α-ελίκων και β-φύλλων που σχηματίζουν μικρά δομικά μοτίβα, μέχρι την πολύπλοκη αναδίπλωση δομικά αυτόνομων περιοχών σε πρωτεΐνες με πολλαπλές λειτουργίες (βλέπε σελ. 21).

## II. ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η αλληλουχία των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη ονομάζεται πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης. Η κατανόηση της πρωτοταγούς δομής είναι σημαντική καθώς σε πολλές γενετικές ασθένειες μια πρωτεΐνη έχει αμινοξική αλληλουχία που διαφέρει από τη φυσιολογική. Αυτό οδηγεί σε λανθασμένη αναδίπλωση και σε δυσλειτουργική ή και πλήρως μη λειτουργική πρωτεΐνη. Η γνώση των πρωτοταγών δομών της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης μορφής μιας πρωτεΐνης μπορεί να αξιοποιηθεί στη διάγνωση ή τη μελέτη της ασθένειας που προκύπτει από μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη αυτή.

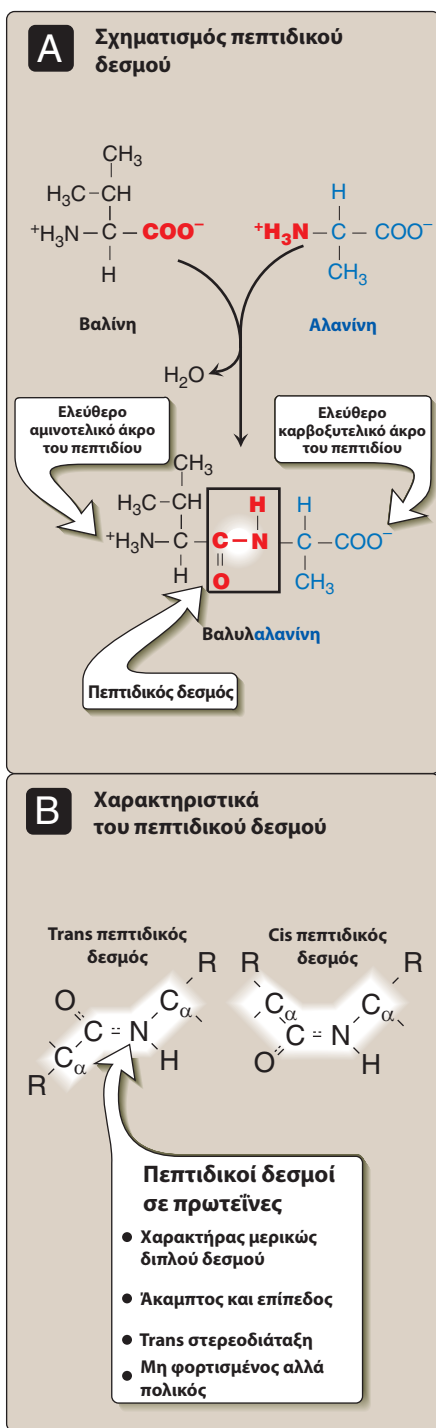
### A. Πεπτιδικός δεσμός

Στις πρωτεΐνες, τα αμινοξέα συνδέονται ομοιοπολικά με πεπτιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί είναι αμιδικοί δεσμοί μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και της α-αμινομάδας του επόμενου αμινοξέος. Για παράδειγμα, η βαλίνη και η αλανίνη μπορούν να σχηματίσουν το διπεπτιδιο βαλυλαλανίνη μέσω της δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού (Εικόνα 2.2). Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι ανθεκτικοί στις συνθήκες που αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, όπως η θέρμανση και οι υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας (βλέπε σελ. 22). Για τη μη ενζυμική διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών απαιτείται παρατεταμένη έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία ισχυρού οξέος ή βάσης.



Εικόνα 2.1

Ιεραρχική οργάνωση της πρωτεϊνικής δομής σε τέσσερα επίπεδα.



Εικόνα 2.2

A. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού, όπου φαίνεται η δομή του διπεπτιδίου βαλυλαλανίνη.

B. Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού.

**1. Ονομασία πεπτιδίου:** Κατά συνθήκη, το ελεύθερο αμινοτελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας (N-τελικό) γράφεται στα αριστερά και το ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο (C-τελικό) στα δεξιά. Επομένως, όλες οι αμινοξικές αλληλουχίες διαβάζονται από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου. Για παράδειγμα, στην Εικόνα 2.2A, η σειρά των αμινοξών είναι «βαλίνη, αλανίνη». Η σύνδεση πολλών αμινοξών μέσω πεπτιδικών δεσμών οδηγεί στη δημιουργία μιας μη διακλαδισμένης αλυσίδας που αποκαλείται πολυπεπτιδίο. Κάθε ένα αμινοξύ που είναι συστατικό ενός πολυπεπτιδίου ονομάζεται «κατάλοιπο», επειδή είναι αυτό που απομένει μετά την απομάκρυνση ενός μορίου νερού κατά τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Για την ονομασία του πολυπεπτιδίου, οι καταλήξεις όλων των αμινοξών μετατρέπονται σε -υλ εκτός από το C-τελικό αμινοξύ. Για παράδειγμα, ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από μια N-τελική βαλίνη, μια γλυκίνη και μια C-τελική λευκίνη ονομάζεται βαλυλογλυκυλολευκίνη.

**2. Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού:** Ο πεπτιδικός δεσμός έχει χαρακτήρα μερικής διπλού δεσμού, δηλαδή έχει μικρότερο μήκος από τον απλό δεσμό και είναι άκαμπτος και επίπεδος (Εικόνα 2.2B). Αυτό αποκλείει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό ανάμεσα στον άνθρακα του καρβονυλίου και στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού. Υπάρχει όμως ελευθερία περιστροφής ανάμεσα στον  $\alpha$ -άνθρακα και στο  $\alpha$ -άζωτο ή στην  $\alpha$ -καρβοξυλομάδα (που περιορίζεται ωστόσο από το μέγεθος και το χαρακτήρα των ομάδων R). Αυτό επιτρέπει στην πολυπεπτιδική αλυσίδα να υιοθετεί μια ποικιλία πιθανών στερεοχημικών δομών. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι trans (και όχι cis, βλ. Εικόνα 2.2B), κυρίως λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ των ομάδων R, που είναι πολύ πιθανότερη στην περίπτωση του cis γεωμετρικού ισομερούς.

**3. Πολικότητα του πεπτιδικού δεσμού:** Όπως σε όλα τα αμιδιά, οι ομάδες  $-C=O$  και  $-NH_2$  του πεπτιδικού δεσμού δεν είναι φορτισμένες ούτε δότες ή δέκτες πρωτονίων σε εύρος pH από 2 έως 12. Σε ένα πολυπεπτιδίο, λοιπόν, οι φορτισμένες ομάδες είναι αποκλειστικά η N-τελική ομάδα ( $\alpha$ -αμινομάδα), η C-τελική ομάδα ( $\alpha$ -καρβοξυλομάδα) και κάθε άλλη ιονισμένη ομάδα που βρίσκεται σε πλευρική αλυσίδα κάπου συστατικού αμινοξός. Οι ομάδες  $-C=O$  και  $-NH_2$  του πεπτιδικού δεσμού έχουν ωστόσο πολικό χαρακτήρα και συχνά συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου (για παράδειγμα, στις δομές της  $\alpha$ -έλικας και του  $\beta$ -πτυχωτού φύλλου), όπως περιγράφεται στις σελ. 18–19.

## B. Προσδιορισμός της αμινοξικής σύστασης ενός πολυπεπτιδίου

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής ενός πολυπεπτιδίου είναι η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των συστατικών του αμινοξών. Αρχικά γίνεται υδρόλυση καθαρού δείγματος του προς ανάλυση πολυπεπτιδίου παρουσία ισχυρού οξέος στους  $110^\circ\text{C}$  για 24 ώρες. Αυτή η επεξεργασία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς και απελευθερώνει μεμονωμένα αμινοξέα, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία κατιοντο-ανταλλαγής. Στην τεχνική αυτή, ένα μείγμα αμινοξέων περνάει από μία ρητίνη στην οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένες αρνητικά φορτισμένες ομάδες. [Σημείωση: Εάν οι συνδεδεμένες στη ρητίνη ομάδες είναι θετικά φορτισμένες, τότε πρόκειται για στήλη ανιοντο-ανταλλαγής.] Τα αμινοξέα προσδένονται στη στήλη με διαφορετική συγγένεια, ανάλογα με το φορτίο, την υδροφοβικότητα και άλλα χαρακτηριστικά τους. Στη συνέχεια, απελευθερώνονται διαδοχικά από τη στήλη χρωματογραφίας με διαλύματα έκλυσης αυξανόμενης ιονικής ισχύος και pH (Εικόνα 2.3). Για την ποσοτικοποίηση των διαχωρισμένων αμινοξέων που εκλύονται από τη στήλη, ακολουθεί θέρμανσή τους παρουσία νινυδρίνης (ενός αντιδραστηρίου που σχηματίζει ιώδεις ενώσεις με τα περισσότερα αμινοξέα, τις αμίνες και την αμμωνία). Η ποσότητα του κάθε αμινοξός προσδιορίζεται

με φασματοφωτομετρία, μετρώντας την ποσότητα του φωτός που απορροφάται από τα παράγωγα της νινυδρίνης. Η παραπάνω ανάλυση γίνεται αυτοματοποιημένα σε έναν αναλυτή αμινοξικής αλληλουχίας, οργανολογία που απεικονίζεται στην Εικόνα 2.3.

**Γ. Προσδιορισμός αλληλουχίας ενός πεπτιδίου από το N-τελικό του άκρο**

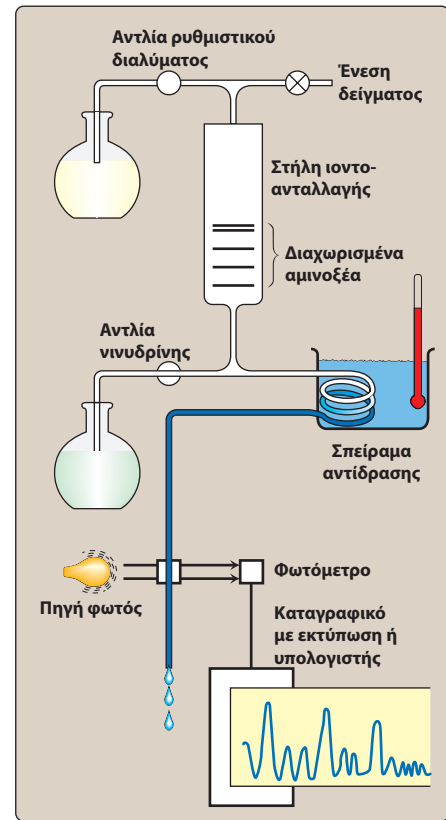
Η αλληλούχηση είναι μια σταδιακή διαδικασία κατά την οποία ταυτοποιείται ένα συγκεκριμένο αμινοξύ σε κάθε θέση της πεπτιδικής αλυσίδας, ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο. Ο ισοθειοκυανικός φαινυλεστέρας, γνωστός και ως αντιδραστήριο του Edman, αντιδρά με τη μη φορτισμένη τελική αμινομάδα σε ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες με αποτέλεσμα τη σήμανση με φαινυλοθειοϋδαντοΐνη (PTH) του αμινοτελικού καταλοίπου (Εικόνα 2.4), που οδηγεί στην αποσταθεροποίηση και την επιλεκτική υδρόλυση του N-τελικού πεπτιδικού δεσμού και την απελευθέρωση του καταλοίπου αυτού, που στη συνέχεια μπορεί να ταυτοποιηθεί με χρωματογραφία. Το αντιδραστήριο Edman μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατ'επανάληψη στο βραχύτερο πεπτίδιο που προκύπτει κάθε φορά από τον προηγούμενο κύκλο. Η διαδικασία αυτή έχει πλήρως αυτοματοποιηθεί.

**Δ. Πρωτεόλυση του πολυπεπτιδίου σε μικρότερα τμήματα**

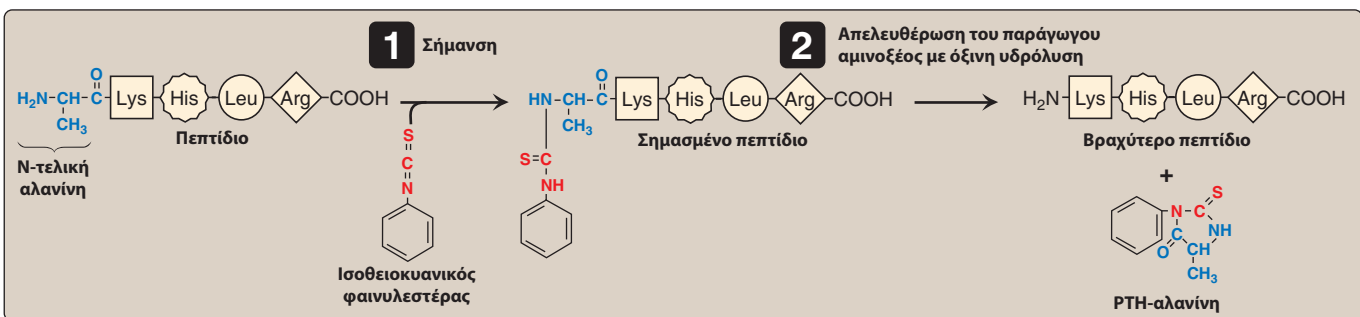
Η πρωτοταγής δομή πολλών πολυπεπτιδίων συνίσταται από περισσότερα από 100 αμινοξέα. Η αλληλούχηση των μορίων αυτών δεν μπορεί να γίνει απευθείας για ολόκληρο το μήκος τους. Στην περίπτωση αυτή γίνεται πρώτα πρωτεόλυση σε συγκεκριμένες θέσεις και στη συνέχεια γίνεται αλληλούχηση στα μικρότερα τμήματα που προκύπτουν. Χρησιμοποιώντας περισσότερους από έναν παράγοντες πρωτεόλυσης (ένζυμα ή/και χημικές ενώσεις) σε διαφορετικά δείγματα του καθαρού πολυπεπτιδίου, παράγονται αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές οι οποίες επιτρέπουν τη σωστή διάταξη των τμημάτων στα οποία έγινε η αλληλούχηση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει πλήρης αλληλούχηση ενός μεγάλου μήκους πολυπεπτιδίου (Εικόνα 2.5). Τα ένζυμα τα οποία πρωτεολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς ονομάζονται *πεπτιδάσες* (*πρωτεάσες*). [Σημείωση: Οι εξωπεπτιδάσες κόβουν στα άκρα των πρωτεϊνών και διακρίνονται σε *αμινοπεπτιδάσες* και *καρβοξυπεπτιδάσες*. Οι *καρβοξυπεπτιδάσες* χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό του C-τελικού αμινοξέος. Οι *ενδοπεπτιδάσες* πρωτεολύουν σε εσωτερικές θέσεις της πρωτεΐνης.]

**Ε. Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης μέσω αλληλούχησης DNA**

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία σε μια περιοχή του DNA που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη ορίζει την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης αυτής. Επομένως, εάν προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία, τότε με βάση

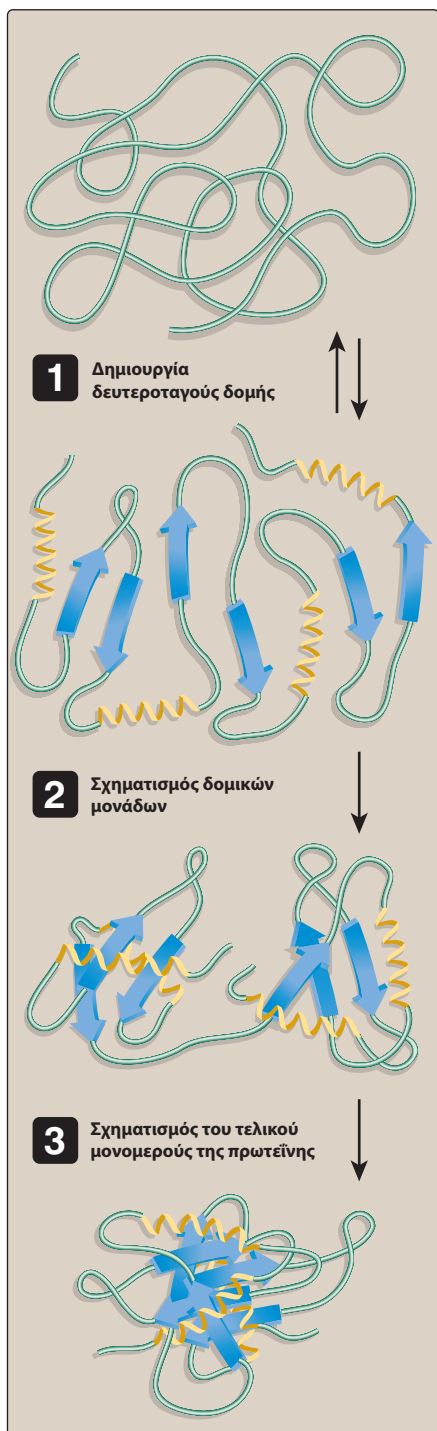


**Εικόνα 2.3**  
Προσδιορισμός της αμινοξικής αλληλουχίας ενός πολυπεπτιδίου χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο αναλυτή.



**Εικόνα 2.4**

Προσδιορισμός του N-τελικού άκρου ενός πολυπεπτιδίου μέσω πρωτεολυτικής αποικοδόμησης κατά Edman. PTH = φαινυλοθειοϋδαντοΐνη.

**Εικόνα 2.12**

Σταδιακή αναδίπλωση πρωτεϊνών (απλοποιημένη περιγραφή).

**4. Ιοντικές αλληλεπιδράσεις:** Οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες, όπως η καρβοξυλική ( $-\text{COO}^-$ ) στην πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού ή του γλουταμικού, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με θετικά φορτισμένες ομάδες όπως η αμινομάδα ( $-\text{NH}_3^+$ ) στην πλευρική ομάδα της λυσίνης (βλέπε Εικόνα 2.11).

### Γ. Αναδίπλωση πρωτεϊνών

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων καθορίζουν τη διαδικασία με την οποία μια μεγάλη πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται για να σχηματίσει την πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο κύτταρο μέσα σε δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά και προϋποθέτει μια καθόλου τυχαία, αυστηρά συντεταγμένη πορεία. Κατά την αναδίπλωση του πολυπεπτιδίου, σχηματίζονται δευτεροταγείς δομές λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (που προκύπτουν από την τάση που έχουν οι υδρόφοβες ομάδες να έρχονται σε κοντινή απόσταση με ταυτόχρονη απελευθέρωση μορίων νερού που τις περιβάλλουν). Αυτές οι μικρές (τοπικές) διαμορφώσεις συνδυάζονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερες δομές. Με τη μεσολάβηση περαιτέρω διαδικασιών σταθεροποιείται η δευτεροταγής δομή και προάγεται ο σχηματισμός της τριτοταγούς δομής. Στο τελικό στάδιο, το πεπτίδιο αναδιπλώνεται στην τελική φυσική (λειτουργική) διαμόρφωση, η οποία είναι η κατάσταση της ελάχιστης ενέργειας (Εικόνα 2.12). [Σημείωση: Κάποιες βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών δεν έχουν σταθερή τριτοταγή δομή. Αυτές αποκαλούνται πρωτεΐνες με «εγγενή αταξία».]

### Δ. Μετουσίωση πρωτεϊνών

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών οδηγεί στην αποδίπλωση και την αποδιοργάνωση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, που δεν συνοδεύεται από υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Μετουσιωτικοί παράγοντες είναι η θέρμανση, οι οργανικοί διαλύτες, τα ισχυρά οξέα ή βάσεις, τα απορρυπαντικά και τα ιόντα βαρέων μετάλλων, όπως ο μόλυβδος. Η μετουσίωση κάτω από ιδανικές συνθήκες μπορεί να αναστραφεί όταν απομακρυνθεί ο αποδιατακτικός παράγοντας. Ωστόσο, οι περισσότερες πρωτεΐνες παραμένουν μετουσιωμένες και μετά την απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα. Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες συχνά σχηματίζουν συσσωματώματα αδιάλυτα στο νερό και καθιζάνουν.

### Ε. Ο ρόλος των μοριακών συνοδών στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης εμπεριέχονται στην πρωτοταγή δομή του πολυπεπτιδίου. Ωστόσο, πολλές πρωτεΐνες, αφού αποδιαταχθούν, δεν μπορούν να ανακτήσουν τη φυσική τους διαμόρφωση ακόμα και σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο λόγος είναι ότι για πολλές πρωτεΐνες η διαδικασία της αναδίπλωσης υποβοηθείται από τη δράση μιας εξειδικευμένης ομάδας πρωτεϊνών, που αποκαλούνται «μοριακοί συνοδοί» και από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης. Οι «μοριακοί συνοδοί», γνωστοί και ως «πρωτεΐνες θερμικού σοκ» (heat-shock proteins, Hsp), αλληλεπιδρούν με ένα πολυπεπτίδιο σε διάφορα στάδια της αναδίπλωσής του. Κάποιοι συνοδοί προσδένουν υδρόφοβες περιοχές του εκτεταμένου πολυπεπτιδίου και είναι σημαντικοί για να διατηρούν την πρωτεΐνη αποδίπλωμένη μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεσή της (για παράδειγμα, ο μοριακός συνοδός Hsp70). Άλλοι σχηματίζουν μακρομοριακές δομές που μοιάζουν με κλωβούς και αποτελούνται από δύο επιστοιβαγμένους δακτυλίους. Η μερικώς αναδίπλωμένη πρωτεΐνη εισέρχεται στον κλωβό, προσδένεται στην εσωτερική κοιλότητά του μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, αναδιπλώνεται και μετά απελευθερώνεται (για παράδειγμα, ο μιτοχονδριακός συνοδός Hsp60). [Σημείωση: Οι μοριακοί συνοδοί που σχηματίζουν τέτοιους κλωβούς συχνά αποκαλούνται «σαπερονίνες»]. Εν ολίγοις,



οι μοριακοί συνοδοί βοηθούν τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών με την πρόσδεσή τους σε εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές του νεοσυντιθέμενου (και αποδιαταγμένου) πολυπεπτιδίου που είναι επιρρεπείς σε συσσωμάτωση, με αποτέλεσμα να τις σταθεροποιούν και να αποτρέπουν την πρόωμη αναδίπλωσή τους.

Οι ισομορφές μιας πρωτεΐνης έχουν την ίδια λειτουργία, αλλά διαφορετική πρωτοταγή δομή. Μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά γονίδια ή από την ιστο-ειδική επεξεργασία του προϊόντος του ίδιου γονιδίου. Εάν η λειτουργία της πρωτεΐνης είναι ενζυμική, τότε αποκαλούνται και ισoenζυμα (βλ. σελ. 74).

### V. ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

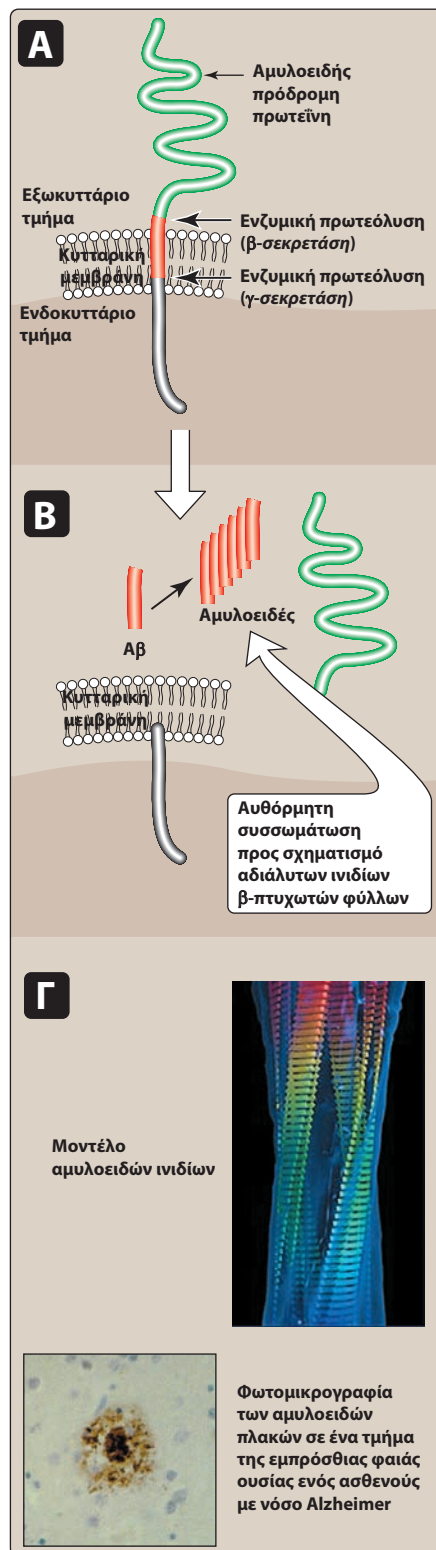
Πολλές πρωτεΐνες αποτελούνται από μία μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα και χαρακτηρίζονται ως μονομερείς. Ωστόσο, κάποιες μπορεί να αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες μπορεί να είναι δομικά πανομοιότυπες ή και να μην σχετίζονται. Η σχετική διευθέτηση αυτών των πολυπεπτιδικών υπομονάδων αποκαλείται τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης. Οι διάφορες υπομονάδες συγκρατούνται κυρίως μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (για παράδειγμα, δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων). Οι υπομονάδες μπορεί να δρουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη ή να υπάρχει μεταξύ τους συνέργεια, όπως στην αιμοσφαιρίνη, στην οποία η πρόσδεση οξυγόνου στη μία υπομονάδα του τετραμερούς αυξάνει τη συγγένεια των άλλων υπομονάδων για το οξυγόνο (βλ. σελ. 33).

### VI. ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μόρια με λανθασμένη αναδίπλωση. Αυτές οι πρωτεΐνες συνήθως σημαίνονται μέσα στο κύτταρο και οδηγούνται προς αποικοδόμηση (βλ. σελ. 507). Ωστόσο, το σύστημα διαλογής του κυττάρου δεν είναι τέλειο, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια συσσωματώματα πρωτεϊνών με λανθασμένη αναδίπλωση, φαινόμενο που εντείνεται στις μεγαλύτερες ηλικίες. Αυτές οι εναποθέσεις πρωτεϊνών με ελλατωματική αναδίπλωση σχετίζονται με έναν αριθμό ασθενειών.

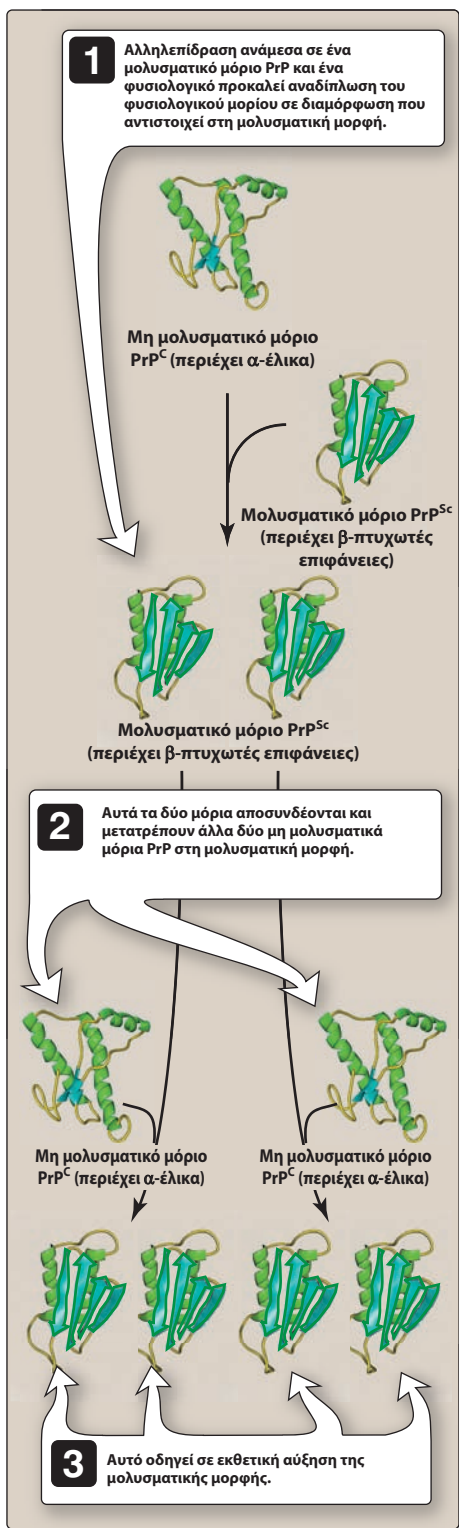
#### A. Αμυλοειδείς ασθένειες

Η ελλατωματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι αυθόρμητη διαδικασία ή να οφείλεται σε μετάλλαξη ενός γονιδίου, το οποίο παράγει τροποποιημένη πρωτεΐνη. Επίσης, κάποιες φαινομενικά φυσιολογικές πρωτεΐνες, μπορεί, λόγω μη φυσιολογικής πρωτεολυτικής σχάσης, να λάβουν μια διαμόρφωση που οδηγεί στον σχηματισμό μεγάλων ινιδίων τα οποία αποτελούνται από β-πτυχωτές επιφάνειες. Οι αδιάλυτες πρωτεΐνες που συσσωματώνονται αυθόρμητα ονομάζονται αμυλοειδείς και εμπλέκονται σε εκφυλιστικές ασθένειες όπως οι ασθένειες Parkinson και Huntington και κυρίως στη νευροεκφυλιστική ασθένεια Alzheimer. Το κύριο συστατικό της αμυλοειδούς πλάκας που συσσωρεύεται στη νόσο του Alzheimer είναι το αμυλοειδές πεπτιδίιο β (Aβ), ένα εξωκυττάριο πεπτιδίιο μήκους 40-42 αμινοξέων. Τα μη διακλαδισμένα ινίδια έχουν χαρακτηριστική διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας, όπως αποδεικνύεται με πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και φασματοσκοπίας υπερύθρου. Το πεπτιδίιο Aβ συσσωματώνεται σε διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας, είναι νευροτοξικό, αποτελεί τον κύριο παθογόνο παράγο-



**Εικόνα 2.13**

Σχηματισμός αμυλοειδών πλακών σε ασθενείς με Alzheimer (AD). [Σημείωση: Μεταλλάξεις στην *πρεσσενιλίνη*, την καταλυτική υπομονάδα της *γ-σεκρετάσης*, είναι η πιο συχνή αιτία της συγγενούς AD.]



Εικόνα 2.14

Πρωτεϊνόμενος μηχανισμός πολλαπλασιασμού των μολυσματικών παραγόντων prion. PrP = πρωτεΐνη prion, PrP<sup>C</sup> = πρωτεΐνη prion κυτταρική, PrP<sup>Sc</sup> = πρωτεΐνη prion scrapie.

να που οδηγεί στη χαρακτηριστική για τη νόσο αυτή γνωστική δυσλειτουργία και προέρχεται από την ενζυμική πρωτεόλυση (από σεκρετάσες) ενός μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου. Το πρόδρομο μόριο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων στον εγκέφαλο και σε άλλους ιστούς (Εικόνα 2.13). Τα πεπτιδία Αβ συσσωματώνονται σχηματίζοντας αμυλοειδή που εντοπίζονται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία. Τα περισσότερα περιστατικά της νόσου δεν έχουν κάποια γενετική σύνδεση, αν και περίπου 5% από αυτά είναι οικογενή. Ένας δεύτερος βιολογικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ανάπτυξη της νόσου είναι η μη κανονική συσσώρευση νευροϊνιδίων και η δημιουργία μεταξύ τους κόμβων μέσα στους νευρώνες. Κύριο συστατικό των κόμβων αυτών είναι μια μη φυσιολογική μορφή (υπερ-φωσφορυλιωμένη και αδιάλυτη) της πρωτεΐνης tau (τ), η οποία υπό κανονικές συνθήκες συμμετέχει στη συγκρότηση της δομής των μικροσωληνίσκων. Η ελαττωματική πρωτεΐνη τ φαίνεται να μπλοκάρει τη δράση της φυσιολογικής.

## B. Ασθένειες prion

Η πρωτεΐνη prion (PrP) έχει ενοχοποιηθεί ευρύτατα ως ο αιτιολογικός παράγοντας για τις μεταδιδόμενες σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (TSE), συμπεριλαμβανομένων της ασθένειας Creutzfeldt-Jakob στους ανθρώπους, της ασθένειας scrapie στα πρόβατα και της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας στα βοοειδή (γνωστής ως ασθένεια των «τρελών αγελάδων»). Μετά από εκτενείς προσπάθειες απομόνωσης της πρωτεΐνης, οι επιστήμονες ανακάλυψαν με έκπληξη πως ο μολυσματικός παράγοντας που προκαλεί την ασθένεια scrapie στα πρόβατα σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο είδος πρωτεϊνών που δεν αλληλεπιδρούν με κάποιο ανιχνεύσιμο νουκλεϊκό οξύ. Η μολυσματική πρωτεΐνη ονομάζεται PrP<sup>Sc</sup> (Sc = scrapie). Είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση και τείνει να δημιουργεί αδιάλυτα συσσωματώματα ινιδίων, παρόμοια με τα αμυλοειδή που συναντώνται σε άλλες εγκεφαλικές νόσους. Μια μη μολυσματική μορφή της PrP<sup>C</sup> (C = κυτταρικός, cellular) κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο με τη μολυσματική μορφή και εντοπίζεται στην επιφάνεια των νευρώνων και των νευρογλοιακών κυττάρων στον εγκέφαλο υγιών θηλαστικών. Επομένως, η PrP<sup>C</sup> δρα σαν πρωτεΐνη-ξενιστής. Δεν έχουν βρεθεί διαφορές στην αλληλουχία ή στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ανάμεσα στη φυσιολογική και τη μολυσματική μορφή της πρωτεΐνης. Το κλειδί της μολυσματικότητας φαίνεται να είναι η αλλαγή στην τριτοταγή δομή της PrP<sup>C</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι ένας αριθμός α-ελίκων της φυσιολογικής μορφής αντικαθίστανται από β-πτυχωτές επιφάνειες στη μολυσματική μορφή (Εικόνα 2.14). Πιθανόν η αλλαγή αυτή προσδίδει στη μολυσματική πρωτεΐνη σχετικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση και επιτρέπει τη διαφοροποίησή της στους μολυσμένους ιστούς από τη φυσιολογική PrP<sup>C</sup>. Ο μολυσματικός παράγοντας είναι λοιπόν μια τροποποιημένη εκδοχή της φυσιολογικής πρωτεΐνης, ο οποίος δρα ως εκμαγείο για τη μετατροπή της φυσιολογικής πρωτεΐνης στην παθολόγο διαμόρφωση. Οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες TSE είναι πάντοτε θανατηφόρες, καθώς δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής αποτελεσματική θεραπεία.

## VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην κατανόηση της δομής των πρωτεϊνών κεντρική είναι η ιδέα της **φυσικής διαμόρφωσης** (Εικόνα 2.15), δηλαδή της λειτουργικής, πλήρως αναδιπλωμένης πρωτεϊνικής δομής (για παράδειγμα, ένα ενεργό ένζυμο ή μια δομική πρωτεΐνη). Η μοναδική τρισδιάστατη δομή της φυσικής διαμόρφωσης καθορίζεται από την **πρωτοταγή της δομή**, δηλαδή την αμινοξική της αλληλουχία. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων

# Ένζυμα

# 5

## I. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

Σχεδόν όλες οι βιολογικές λειτουργίες υποστηρίζονται από χημικές αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα, δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες δρώντας ως καταλύτες, επιταχύνουν την αντίδραση, χωρίς να μεταβάλλονται κατά τη διάρκειά της. Τα ένζυμα διοχετεύουν επιλεκτικά τα αντιδρώντα συστατικά (υποστρώματα) στην αποδοτικότερη για τις ανάγκες του οργανισμού αντίδραση, ανάμεσα σε πολλές που είναι ενεργειακά εφικτές. Με τον τρόπο αυτό κατευθύνουν τις μεταβολικές οδούς και συνδέονται άμεσα με την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού. Το κεφάλαιο αυτό εξετάζει τη φύση των καταλυτικών αυτών μορίων και τον μηχανισμό δράσης τους.

## II. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Σε κάθε ένζυμο αποδίδονται δύο ονομασίες. Η πρώτη είναι και η συνιστώμενη, καθότι είναι σύντομη και εύχρηστη. Η δεύτερη είναι η πλήρης συστηματική ονοματολογία, η οποία χρησιμεύει στην ταυτοποίηση του ενζύμου χωρίς αμφισημίες.

### A. Προτεινόμενη ονομασία

Η συνθέστερη ονομασία των ενζύμων προέρχεται είτε από το υπόστρωμα της αντίδρασης και την κατάληξη «-άση» (για παράδειγμα, *γλυκοσιδάση* ή *ουρεάση*) ή από την αντίδραση που λαμβάνει χώρα (για παράδειγμα *αφυδρογονάση του γαλακτικού* και *κυκλάση του αδενυλικού*). [Σημείωση: Για ορισμένα ένζυμα έχει καθιερωθεί η αρχική ονομασία, η οποία δεν παρέχει καμία ένδειξη για τη συγκεκριμένη αντίδραση, για παράδειγμα η *θρυψίνη* και η *πεψίνη*.]

### B. Συστηματική ονομασία

Στη συστηματική ονοματολογία, τα ένζυμα κατατάσσονται σε έξι κύριες κατηγορίες (Εικόνα 5.1), η κάθε μία από τις οποίες περιέχει αρκετές υποομάδες. Η ονομασία ενός ενζύμου προκύπτει από την προσθήκη της κατάληξης -άση στην πλήρη περιγραφή της χημικής αντίδρασης που αυτό καταλύει, συμπεριλαμβανομένων και όλων των υποστρωμάτων του, για παράδειγμα, *γαλακτική:NAD<sup>+</sup>οξειδοαναγωγή*. [Σημείωση: Σε κάθε ένζυμο αντιστοιχεί και ένας αριθμός ταξινόμησης. Για παράδειγμα η *γαλακτική:NAD<sup>+</sup>οξειδοαναγωγή* έχει τον αριθμό 1.1.1.27.] Η συστηματική ονομασία του ενζύμου είναι σαφής και πληροφοριακή, αλλά συνήθως δύσχρηστη.

**1. Οξειδοαναγωγάσες** Καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, όπως:

$$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος  
Γαλακτικό οξύ Πυροσταφυλικό οξύ

**2. Τρανσφεράσες** Καταλύουν τη μεταφορά ομάδων που περιέχουν άτομα C-, N- ή P-, όπως:

$$\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{THF} \xrightleftharpoons{\text{H}_2\text{O}} \text{CH}_2-\text{COO}^- + \text{THF}-\text{CH}_2$$

Υδροξυμεθυλο-τρανσφεράση της σερίνης  
Σερίνη Γλυκίνη

**3. Υδrolάσες** Καταλύουν τη σχάση δεσμών με την προσθήκη νερού, όπως:

$$\text{NH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ουρεάση}} \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$$

Ουρία

**4. Λυάσες** Καταλύουν τη σχάση δεσμών C-C, C-S και μερικών δεσμών C-N, όπως:

$$\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{COO}^- \xrightarrow{\text{Αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος}} \text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{H} + \text{CO}_2$$

Πυροσταφυλικό οξύ Ακεταλδεΰδη

**5. Ισομεράσες** Καταλύουν τη ρακεμοποίηση των οπτικών ή γεωμετρικών ισομερών, όπως:

$$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CoA} \rightleftharpoons \text{CH}_3-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CoA}$$

Μουτάση του μεθυλο-μαλονυλο-CoA  
Μεθυλο-μαλονυλο-CoA Ηλεκτρολο-CoA

**6. Λιγάσες** Καταλύουν τη δημιουργία δεσμών μεταξύ του ατόμου άνθρακα και των ατόμων O, S και N με ταυτόχρονη υδρόλυση πλούσιων σε ενέργεια φωσφορικών ομάδων, όπως:

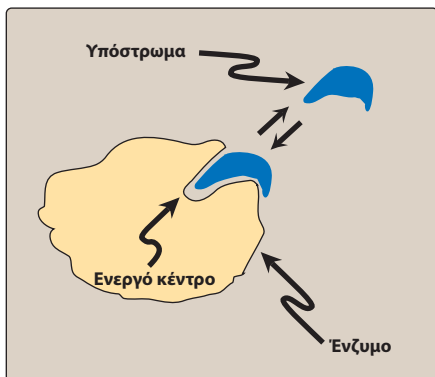
$$\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i} \text{CH}_3-\text{C}(\text{O})-\text{COO}^-$$

Καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος  
Πυροσταφυλικό οξύ Οξαλοξικό οξύ

Εικόνα 5.1

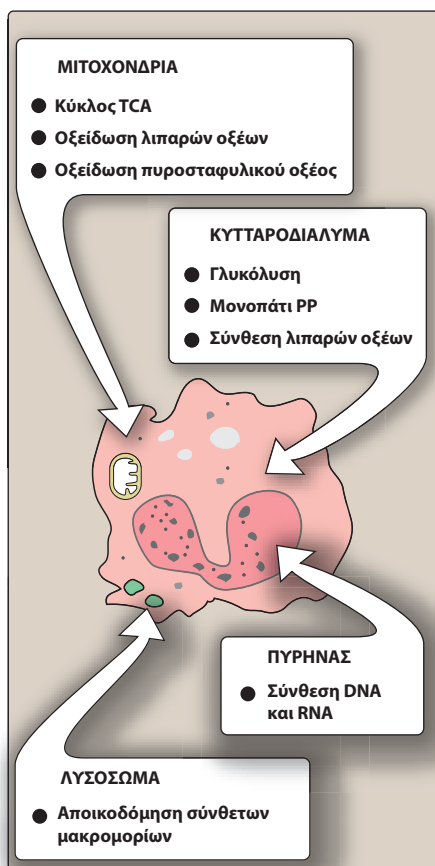
Οι 6 κύριες ομάδες ενζύμων με αντίστοιχα παραδείγματα. NAD(H) = νικωτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοσιδίο, THF = τετραϋδροφυλλικό οξύ, CoA = συνένζυμο A.





Εικόνα 5.2

Σχηματική αναπαράσταση ενός ενζύμου με ένα ενεργό κέντρο που δεσμεύει ένα μόριο υποστρώματος.



Εικόνα 5.3

Ενδοκυττάρια εντόπιση ορισμένων σημαντικών βιοχημικών μονοπατιών. TCA = τρικαρβοξυλικό οξύ, PP = φωσφορική πεντόζη.

Ονομασίες ενζύμων που μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση: *συνθετάση* (απαιτεί ATP), *συνθάση* (δεν απαιτεί ATP), *φωσφατάση* (η αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας γίνεται παρουσία νερού), *φωσφορυλάση* (χρησιμοποιείται P<sub>i</sub> για να σπάσει ο δεσμός και να παραχθεί φωσφορυλιωμένο προϊόν), *αφυδρογονάση* (ο δέκτης ηλεκτρονίων στην οξειδοαναγωγική αντίδραση είναι τα NAD<sup>+</sup>/FAD<sup>+</sup>), *οξειδάση* (ο δέκτης είναι το O<sub>2</sub> και τα άτομα οξυγόνου δεν ενσωματώνονται στο υπόστρωμα), *οξυγονάση* (ένα ή και τα δύο άτομα οξυγόνου ενσωματώνονται).

### III. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικοί καταλύτες που αυξάνουν την ταχύτητα μιας χημικής αντίδρασης και δεν καταναλώνονται κατά τη διάρκειά της. [Σημείωση: Παρόλο που η συντριπτική πλειονότητα των ενζύμων είναι πρωτεΐνες, μερικά μόρια RNA μπορούν επίσης να δράσουν ως ένζυμα, καταλύοντας τη διάσπαση και τη σύνθεση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Αυτά τα μόρια RNA, που έχουν καταλυτική ενεργότητα ονομάζονται ριβοένζυμα (βλ. σελ. 501)]

#### A. Ενεργό κέντρο

Κοινό χαρακτηριστικό των ενζύμων είναι μια κοιλότητα ή εσοχή, που δημιουργείται λόγω της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης και καλείται ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται από τις πλευρικές ομάδες αμινοξέων που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος και στην κατάλυση (Εικόνα 5.2). Η δέσμευση του υποστρώματος από το ένζυμο οδηγεί στον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES) και θεωρείται ότι συνοδεύεται από αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου (μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής, induced fit), η οποία επιτρέπει την κατάλυση. Το σύμπλοκο ES μετατρέπεται στο σύμπλοκο ενζύμου-προϊόντος (EP), το οποίο στη συνέχεια διάσπεται στο ένζυμο και στο προϊόν της αντίδρασης.

#### B. Αποδοτικότητα της κατάλυσης

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα είναι ιδιαίτερα αποδοτικές, με ταχύτητα από 10<sup>3</sup> έως 10<sup>8</sup> φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίδραση απουσία καταλύτη. Ο αριθμός μετατροπής (turnover number),  $k_{cat}$ , περιγράφει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στη μονάδα του χρόνου (δευτερόλεπτο) από ένα μόριο ενζύμου και όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα, συνήθως κυμαίνεται από 10<sup>2</sup> έως 10<sup>4</sup> sec<sup>-1</sup>.

#### Γ. Εξειδίκευση

Τα ένζυμα έχουν μεγάλη εξειδίκευση και αλληλεπιδρούν μόνο με ένα ή λίγα υποστρώματα, καταλύοντας μόνο έναν τύπο χημικής αντίδρασης. Το σύνολο των ενζύμων που συντίθενται σε ένα κύτταρο καθορίζει και τις αντιδράσεις που θα λάβουν χώρα σε αυτό.

#### Δ. Ολοένζυμο, αποένζυμο, συμπαραγόντες και συνένζυμα

Ορισμένα ένζυμα χρειάζονται επιπρόσθετα, μη πρωτεϊνικά μόρια για τη δράση τους. Με τον όρο ολοένζυμο περιγράφεται το ενεργό ένζυμο μαζί με το μη πρωτεϊνικό συστατικό του, ενώ το ένζυμο χωρίς τη μη πρωτεϊνική ομάδα αποκαλείται αποένζυμο και είναι ανενεργό. Η μη πρωτεϊνική ομάδα μπορεί να είναι ένα μεταλλικό ιόν, όπως Zn<sup>+2</sup> ή Fe<sup>+2</sup>, που στην περίπτωση αυτή αποκαλείται συμπαραγόντας. Εναλλακτικά μπο-



ρεί να είναι ένα μικρό οργανικό μόριο, οπότε αποκαλείται συνένζυμο. Τα συνένζυμα που συνδέονται μόνο παροδικά με το αντίστοιχο ένζυμο ονομάζονται συνυποστρώματα. Όταν αποδεσμευτούν από το ένζυμο τα συνυποστρώματα βρίσκονται σε διαφορετική μορφή από αυτήν που είχαν κατά τη δέσμευσή τους (για παράδειγμα, το  $\text{NAD}^+$ , βλ. σελ. 116). Το συνένζυμο που είναι μόνιμα δεσμευμένο στο ένζυμο και επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση μετά την κατάλυση, ονομάζεται προσθετική ομάδα (για παράδειγμα, το FAD, βλ. σελ. 128). Τα συνένζυμα συχνά προέρχονται από βιταμίνες. Για παράδειγμα, το  $\text{NAD}^+$  περιέχει νιασίνη και το FAD περιέχει ριβοφλαβίνη (βλέπε Κεφάλαιο 28).

### E. Ρύθμιση

Η ενεργότητα των ενζύμων υπόκειται σε ρύθμιση, δηλαδή μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί, ώστε ο ρυθμός παραγωγής του προϊόντος να ανταποκρίνεται στις ανάγκες του κυττάρου.

### Z. Κυτταρική εντόπιση

Πολλά ένζυμα εντοπίζονται σε συγκεκριμένα οργανίδια μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 5.3). Η διαμερισματοποίηση αυτή διασφαλίζει την απομόνωση του υποστρώματος ή του προϊόντος της αντίδρασης, ώστε αυτά να μην μπορούν να λάβουν μέρος σε άλλες ανταγωνιστικές αντιδράσεις. Επίσης, προσφέρει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τη διεξαγωγή της αντίδρασης και έναν αποτελεσματικό τρόπο οργάνωσης των χιλιάδων ενζύμων του κυττάρου, ανάλογα με τη λειτουργία τους.

## IV. ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

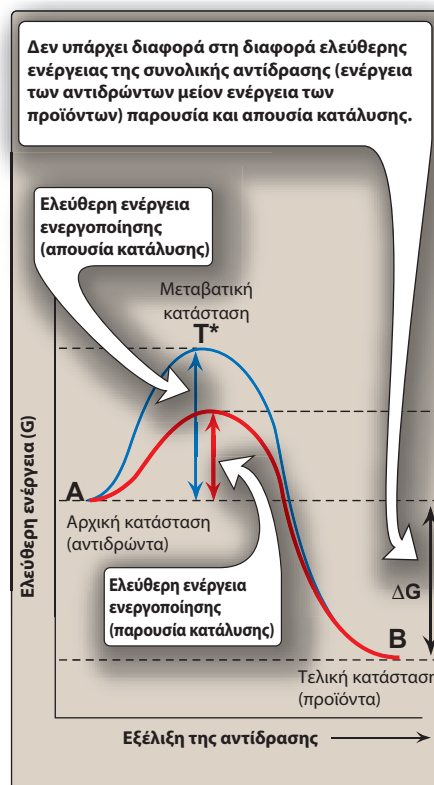
Ο μηχανισμός δράσης ενός ενζύμου μπορεί να εξεταστεί από δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες. Από τη μία πλευρά, η κατάλυση μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο ενεργειακών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Με άλλα λόγια, τα ένζυμα παρέχουν εναλλακτική και ενεργειακά προσηφορότερη πορεία της αντίδρασης, διαφορετική από αυτή στην οποία δεν συμβαίνει κατάλυση. Από την άλλη πλευρά, η περιγραφή μπορεί να εστιαστεί στον τρόπο με τον οποίο το ενεργό κέντρο συνεισφέρει στη χημεία της κατάλυσης.

### A. Ενεργειακές μεταβολές κατά την αντίδραση

Στην πραγματικότητα, όλες οι χημικές αντιδράσεις έχουν έναν ενεργειακό φραγμό που χωρίζει τα αντιδρώντα από τα προϊόντα, αποκαλείται ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης και ορίζεται ως η διαφορά ανάμεσα στην ενέργεια των αντιδρώντων και των ενδιαμέσων υψηλής ενέργειας που προκύπτουν στην πορεία δημιουργίας του προϊόντος. Για παράδειγμα, στην Εικόνα 5.4 φαίνονται οι μεταβολές στην ενέργεια κατά τη μετατροπή ενός μορίου από αντιδρών A σε προϊόν B καθώς διέρχεται από τη μεταβατική κατάσταση (ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας),  $T^*$ :



- 1. Ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης:** Το μέγιστο της ενέργειας στην Εικόνα 5.4 είναι η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια ανάμεσα στο αντιδρών και στο ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας,  $T^*$ , που σχηματίζεται κατά τη μετατροπή του αντιδρώντος σε προϊόν. Οι χημικές αντιδράσεις απουσία καταλύτη είναι συχνά αργές εξαιτίας της υψηλής ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης.
- 2. Ρυθμός αντίδρασης:** Τα μόρια προκειμένου να αντιδράσουν, θα πρέπει να έχουν αρκετή ενέργεια ώστε να ξεπεράσουν τον ενεργειακό φραγμό της μεταβατικής κατάστασης. Απουσία ενζύμου, μόνο ένα



**Εικόνα 5.4**

Επίδραση ενός ενζύμου στην ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης.

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΤΥΠΙΚΟΣ ΤΕΛΕΣΤΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ
Διαθεσιμότητα υποστρώματος	Υπόστρωμα	Μεταβολή στην ταχύτητα ( $v_0$ )	Άμεσα
Αναστολή προϊόντος	Προϊόν αντίδρασης	Μεταβολή στη $V_{max}$ ή/και στην $K_m$	Άμεσα
Αλλοστερικός έλεγχος	Τελικό προϊόν μονοπατιού	Μεταβολή στη $V_{max}$ ή/και στην $K_{0,5}$	Άμεσα
Ομοιοπολική τροποποίηση	Άλλο ένζυμο	Μεταβολή στη $V_{max}$ ή/και στην $K_m$	Άμεσα έως λεπτά
Ενζυμική σύνθεση ή αποικοδόμηση	Ορμόνη ή μεταβολίτης	Μεταβολή στην ποσότητα του ενζύμου	Ώρες έως ημέρες

Εικόνα 5.19

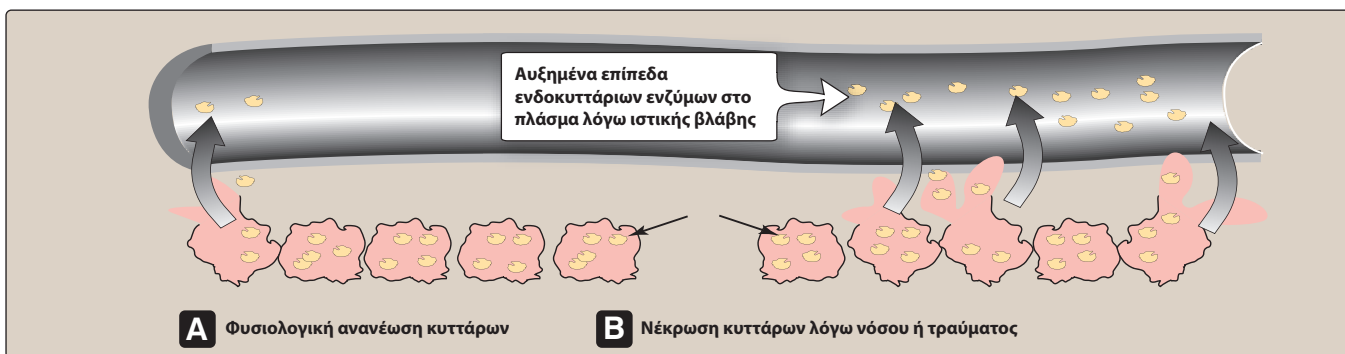
Μηχανισμοί ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας. [Σημείωση: Η αναστολή από το τελικό προϊόν ενός μονοπατιού αναφέρεται και ως αναδραστική αναστολή.]

δικό μη αντιστρεπτό βήμα της συγκεκριμένης σειράς αντιδράσεων. Αυτός ο αναδραστικός μηχανισμός αναστολής εξασφαλίζει την παρουσία στο κύτταρο της ποσότητας προϊόντος που χρειάζεται, ρυθμίζοντας τη ροή μορίων υποστρώματος στο μονοπάτι σύνθεσης του συγκεκριμένου προϊόντος. Οι ετερότροποι τελεστές είναι πολύ διαδεδομένοι, για παράδειγμα η *φωσφοφρουκτοκινάση-1*, ένα γλυκολυτικό ένζυμο, αναστέλλεται αλλοστερικά από το κιτρικό οξύ, το οποίο δεν είναι υπόστρωμα του ενζύμου αυτού (βλ. σελ. 114).

## B. Ρύθμιση ενζύμων μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης

Πολλά ένζυμα ρυθμίζονται με ομοιοπολική τροποποίηση, συνηθέστερα με την προσθήκη ή απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης του ενζύμου. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί έναν από τους κύριους τρόπους ρύθμισης διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών. [Σημείωση: Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποκρίνεται σε ορμονικά σήματα (βλ. σελ. 154).]

- 1. Φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση:** Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης καταλύονται από την ενζυμική οικογένεια των *πρωτεϊνικών κινασών*, που χρησιμοποιούν το ATP ως δότη της φωσφορικής ομάδας. Η απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων από φωσφορυλιωμένα ένζυμα καταλύεται από τις *φωσφοπρωτεϊνικές φωσφατάσες* (Εικόνα 5.18).
- 2. Απόκριση ενζύμων στη φωσφορυλίωση:** Η φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο ενεργή σε σχέση με την αποφωσφορυλιωμένη μορφή, ανάλογα με το εκάστοτε ένζυμο. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της *φωσφορυλάσης του*



Εικόνα 5.20

Απελευθέρωση ενζύμων από φυσιολογικά κύτταρα και κύτταρα με νόσο ή τραύμα.

γλυκογόνου (ενός ενζύμου που αποικοδομεί το γλυκογόνο) αυξάνει την ενεργότητά του, ενώ η φωσφορυλίωση της *συνθάσης του γλυκογόνου* (ενός ενζύμου που συνθέτει γλυκογόνο) μειώνει την ενεργότητά του (σελ. 154).

### Γ. Επαγωγή και καταστολή της ενζυμικής σύνθεσης

Όλοι οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που περιγράφηκαν μέχρι τώρα τροποποιούν την ενεργότητα των ήδη υπαρχόντων ενζυμικών μορίων. Ωστόσο, τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίζουν και τη διαθέσιμη ποσότητα των ενζύμων, μεταβάλλοντας τον ρυθμό αποικοδόμησής τους ή, πιο συχνά, τον ρυθμό σύνθεσής τους. Η αύξηση (επαγωγή) ή μείωση (καταστολή) της ενζυμικής σύνθεσης οδηγεί σε μεταβολή του συνολικού πληθυσμού ενεργών θέσεων. Τα ένζυμα που υπόκεινται σε ρύθμιση της σύνθεσής τους συνήθως είναι απαραίτητα μόνο σε ένα αναπτυξιακό στάδιο ή κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές συνθήκες. Για παράδειγμα, τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης λόγω υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα προκαλούν αύξηση και στη σύνθεση ενζύμων που έχουν κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό της γλυκόζης (βλ. σελ. 121). Αντιθέτως, τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται συνεχώς συνήθως δεν ρυθμίζονται με μεταβολή της ταχύτητας σύνθεσής τους. Η μεταβολή στην ποσότητα ενός ενζύμου λόγω επαγωγής ή καταστολής της ενζυμικής σύνθεσης είναι βραδεία διαδικασία (από ώρες έως ημέρες). Αντιθέτως, η μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας που ρυθμίζεται αλλοστερικά ή με ομοιοπολική τροποποίηση είναι γρήγορη διαδικασία, της τάξης των δευτερολέπτων έως λεπτών. Στην Εικόνα 5.19 συνοψίζονται οι πιο συχνοί τρόποι ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας.

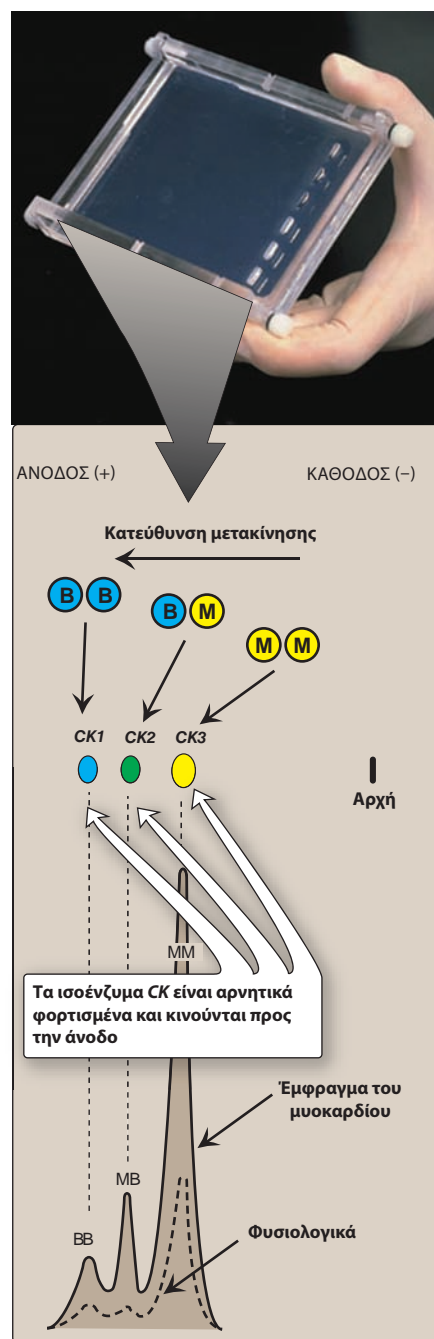
## IX. ENZYMA ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Τα ένζυμα του πλάσματος μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει ένας μικρός αριθμός ενζύμων τα οποία εκκρίνονται στο αίμα από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα, το ήπαρ εκκρίνει ζυμογόνα (ανενεργά πρόδρομα μόρια) των ενζύμων που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει ένας μεγαλύτερος αριθμός ενζύμων που απελευθερώνονται από τα κύτταρα κατά τη διαδικασία της κυτταρικής ανανέωσης. Τα ένζυμα αυτής της ομάδας έχουν σχεδόν πάντα ενδοκυττάρια λειτουργία και δεν έχουν φυσιολογική λειτουργία στο πλάσμα. Σε έναν υγιή οργανισμό, τα επίπεδα αυτών των ενζύμων είναι σχετικά σταθερά και αντικατοπτρίζουν μια σταθερή κατάσταση στην οποία ο ρυθμός απελευθέρωσής τους από τα «κατεστραμμένα» κύτταρα στο πλάσμα αντισταθμίζεται από τον ισοδύναμο ρυθμό απομάκρυνσής τους από το πλάσμα. Τα αυξημένα επίπεδα των ενζύμων αυτών στο πλάσμα συνιστούν ένδειξη ιστικής βλάβης (Εικόνα 5.20).

Το πλάσμα είναι το υγρό, μη κυτταρικό μέρος του αίματος. Οι εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης της ενζυμικής ενεργότητας συχνά χρησιμοποιούν ορό, ο οποίος προκύπτει από φυγοκέντρηση ολικού αίματος στο οποίο έχει ξεκινήσει η διαδικασία της πήξης. Δηλαδή το πλάσμα είναι φυσιολογικό υγρό, ενώ ο ορός παρασκευάζεται εργαστηριακά.

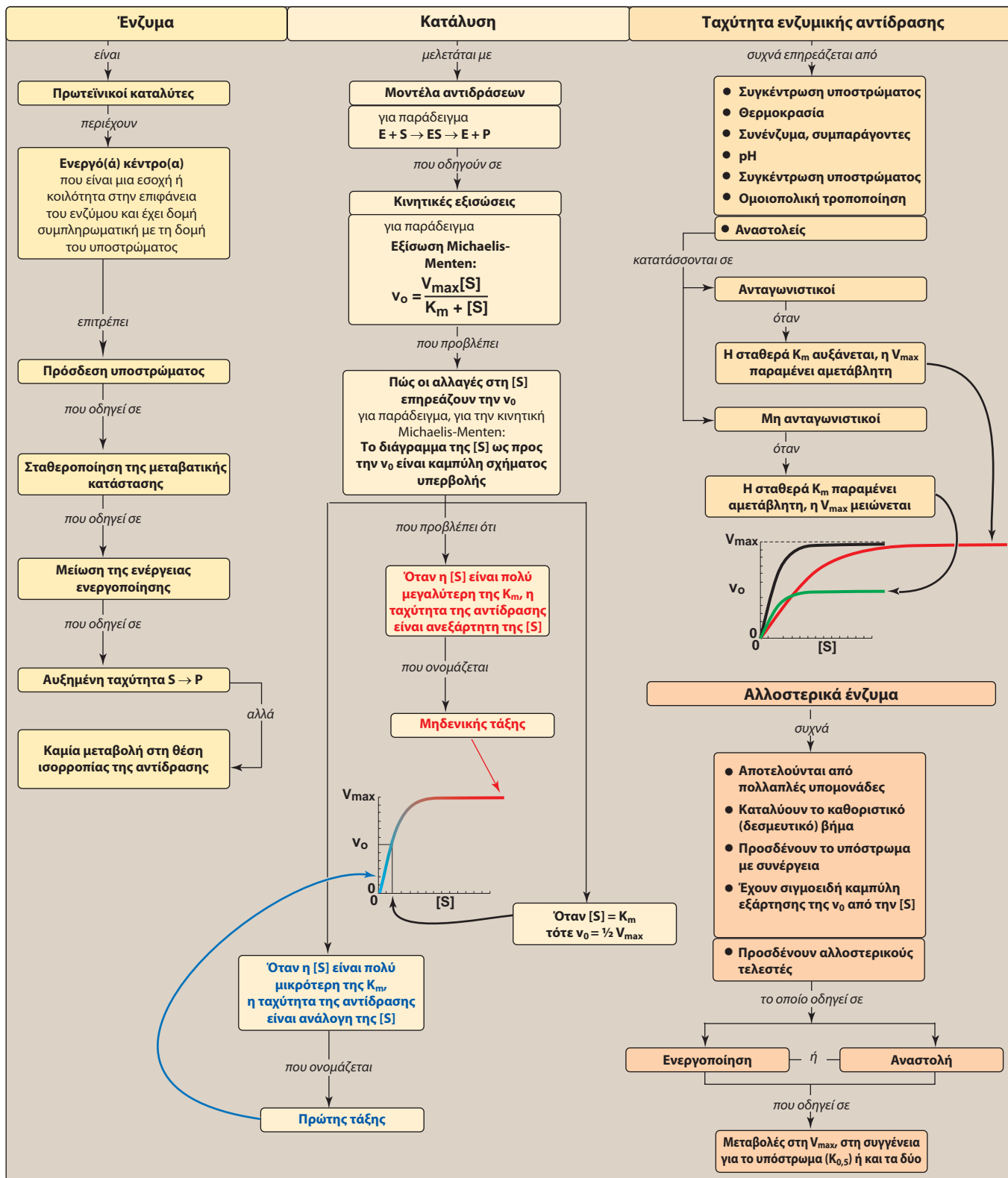
### A. Μεταβολή των ενζυμικών επιπέδων του πλάσματος σε ασθένειες

Σε αρκετές ασθένειες που συνοδεύονται από ιστική βλάβη παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση ενδοκυττάρων ενζύμων στο πλάσμα. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας αρκετών από αυτά αποτελεί συνήθη εργαστηριακή πρακτική για τη διάγνωση νόσων που σχετίζονται με την



**Εικόνα 5.21**

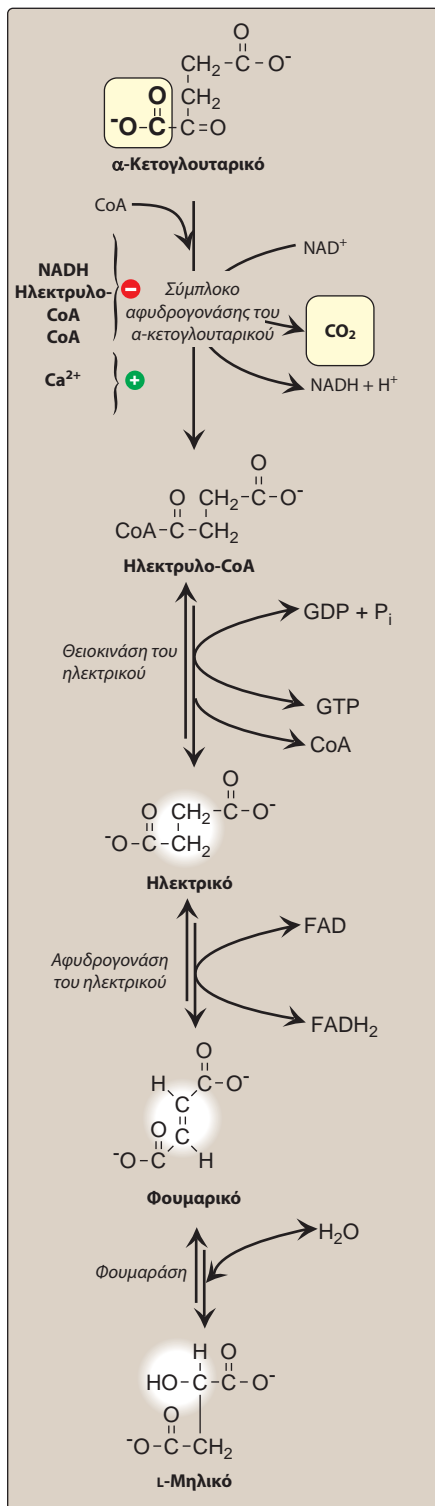
Δομή υπομονάδων, ηλεκτροφορητική κινητικότητα και ενζυμική ενεργότητα των ισοενζύμων της κινάσης της κρεατίνης (CK).



Εικόνα 5.23

Διάγραμμα βασικών εννοιών για τα ένζυμα. S = υπόστρωμα, [S] συγκέντρωση υποστρώματος, P = προϊόν, E = ένζυμο,  $v_0$  = αρχική ταχύτητα,  $V_{max}$  = μέγιστη ταχύτητα,  $K_m$  = σταθερά Michaelis,  $K_{0,5}$  = η συγκέντρωση υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα έχει τιμή ίση με το ήμισυ της μέγιστης τιμής της.



**Εικόνα 9.5**

Σχηματισμός μηλικού από α-κετογλουταρικό.

NAD(H) = δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου-αδενίνης, GDP = διφωσφορική γουανοσίνη, P = φωσφορικό, CoA = συνένζυμο A, FAD(H<sub>2</sub>) = δινουκλεοτιδίου φλαβίνης-αδενίνης.

και συμπεριλαμβάνουν νευροεκφυλισμό, σπαστικότητα μυών και, στη μορφή της διαταραχής που εμφανίζεται στα νεογνά, πρώιμο θάνατο. Το γονίδιο της υπομονάδας α του E1 είναι φυλοσύνδετο (στο χρωμόσωμα X) και, δεδομένου του ότι μπορούν να προσβληθούν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά άτομα, η ανεπάρκεια αυτή ταξινομείται ως φυλοσύνδετη επικρατής. Αν και δεν υπάρχει αποδεδειγμένα καλή θεραπεία για την ανεπάρκεια του συμπλόκου PDH, η μείωση των συμπτωμάτων σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να γίνει με περιορισμό των υδατανθράκων της διατροφής και συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν θειαμίνη.

**5. Μηχανισμοί δηλητηρίασης από το αρσενικό:** Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (βλ. σελ. 116), το πεντασθενές ιόν αρσενικού (αρσενικό) μπορεί να παρεμποδίσει τη γλυκόλυση στο βήμα σχηματισμού της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την παραγωγή ATP. Ωστόσο, η «δηλητηρίαση από αρσενικό» οφείλεται κυρίως στην αναστολή ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το λιποϊκό οξύ, όπως είναι το ένζυμο E2 του συμπλόκου PDH, η αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού (βλ. παρακάτω) και η αφυδρογονάση των διακλαδισμένων α-κετοξέων (βλ. σελ. 306). Το αρσενικό δεσμεύει (τρισθενές ιόν του αρσενικού) σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με τις θειολικές ομάδες (-SH) του λιποϊκού οξέος, εμποδίζοντας τη δράση της ένωσης αυτής ως συνένζυμο. Η δέσμευση του λιποϊκού οξέος του συμπλόκου PDH από το αρσενικό οδηγεί σε συσσώρευση πυροσταφυλικού (και, κατά συνέπεια, επίσης, γαλακτικού). Η κατάσταση αυτή, όπως συμβαίνει και με την ανεπάρκεια του συμπλόκου PDH, επηρεάζει ιδιαίτερα τον εγκέφαλο, προκαλώντας νευρολογικές διαταραχές και θάνατο.

## B. Σύνθεση κιτρικού από ακετυλο-CoA και οξαλοξικό

Η συμπύκνωση του ακετυλο-CoA και του οξαλοξικού προς σχηματισμό κιτρικού (ενός τρικαρβοξυλικού οξέος) καταλύεται από τη συνθάση του κιτρικού (Εικόνα 9.4). Αυτή η αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης έχει μια θέση χημικής ισορροπίας μετατοπισμένη κατά πολύ προς την κατεύθυνση της σύνθεσης κιτρικού. Στον άνθρωπο, η συνθάση του κιτρικού δεν είναι αλλοστερικό ένζυμο. Η ενεργότητα του ενζύμου αναστέλλεται από το προϊόν της αντίδρασης, το κιτρικό. Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της συνθάσης του κιτρικού είναι ο έλεγχος της διαθεσιμότητας του υποστρώματος. Η πρόσδεση του οξαλοξικού προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης στο ένζυμο η οποία δημιουργεί ένα κέντρο δέσμευσης για το ακετυλο-CoA. [Σημείωση: Εκτός από ενδιάμεσο του κύκλου TCA, το κιτρικό παρέχει μια πηγή ακετυλο-CoA για τη σύνθεση λιπαρών οξέων στο κυτταροδιάλυμα (βλ. σελ. 215). Επίσης, το κιτρικό αναστέλλει τη φωσφοφρουκτοκινάση-1 (PFK-1), το ρυθμορυθμιστικό (rate-limiting) ένζυμο της γλυκόλυσης (βλ. σελ. 114) και ενεργοποιεί την καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA, το ρυθμορυθμιστικό ένζυμο της σύνθεσης λιπαρών οξέων (βλ. σελ. 215).]

## Γ. Ισομερείωση του κιτρικού

Το κιτρικό ισομερειώνεται προς ισοκιτρικό μέσω της δράσης της ακονιτάσης (υδρατάσης του ακονιτικού), μιας πρωτεΐνης Fe-S (βλ. Εικόνα 9.4). [Σημείωση: Η ακονιτάση αναστέλλεται από το φθοροξικό, μια φυτική τοξίνη η οποία χρησιμοποιείται ως φυτοφάρμακο. Το φθοροξικό μετατρέπεται σε φθοροακετυλο-CoA, το οποίο συμπυκνώνεται με το οξαλοξικό και σχηματίζει φθοροκιτρικό (έναν ισχυρό αναστολέα της ακονιτάσης), οδηγώντας σε συσσώρευση του κιτρικού.]

## Δ. Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού

Η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού καταλύει τη μη αντιστρεπτή αντίδραση οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του ισοκιτρικού, η οποία αποδίδει το

πρώτο από τα τρία μόρια NADH που παράγει ο κύκλος TCA καθώς και το πρώτο από τα δύο μόρια CO<sub>2</sub> (βλ. Εικόνα 9.4). Πρόκειται για ένα από τα ρυθμορυθμιστικά βήματα του κύκλου TCA. Το ένζυμο αυτό ενεργοποιείται αλλοστερικά από το ADP (ένα μοριακό σήμα που σηματοδοτεί χαμηλά επίπεδα ενέργειας) και το Ca<sup>2+</sup> και αναστέλλεται από το ATP και το NADH, των οποίων τα επίπεδα είναι αυξημένα όταν το κύτταρο διαθέτει αφθονία πηγών ενέργειας.

**Ε. Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού**

Η μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρυλο-CoA καταλύεται από το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο από πολλαπλά αντίγραφα τριών ενζύμων (Εικόνα 9.5). Ο μηχανισμός αυτής της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης είναι πολύ παρόμοιος με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA μέσω του συμπλόκου PDH. Η αντίδραση της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του α-κετογλουταρικού αποδίδει το δεύτερο μόριο CO<sub>2</sub> που παράγει ο κύκλος TCA καθώς και το δεύτερο μόριο NADH που παράγεται από τον κύκλο. Στην αντίδραση αυτή απαιτούνται ως συνένζυμα τα TPP, λιποϊκό οξύ, FAD, NAD<sup>+</sup> και συνένζυμο A (CoA). Καθένα από τα συνένζυμα αυτά συμμετέχει στον καταλυτικό μηχανισμό με τρόπο ανάλογο προς αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω για το σύμπλοκο PDH (βλ. σελ. 129). Η θέση ισορροπίας της αντίδρασης είναι μετατοπισμένη κατά πολύ προς την κατεύθυνση του ηλεκτρυλο-CoA, ενός θειοεστέρα υψηλής ενέργειας παρόμοιου με το ακετυλο-CoA. Το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού αναστέλλεται από τα προϊόντα της αντίδρασης, NADH και ηλεκτρυλο-CoA, και ενεργοποιείται από Ca<sup>2+</sup>. Ωστόσο, διαφέρει από το σύμπλοκο PDH κατά το ότι δεν υπόκειται σε ρύθμιση από αντιδράσεις φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης. [Σημείωση: α-Κετογλουταρικό παράγεται επίσης μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης (βλ. σελ. 290) και τρανσαμίνωσης του γλουταμικού (βλ. σελ. 288).]

**ΣΤ. Διάσπαση του ηλεκτρυλο-CoA**

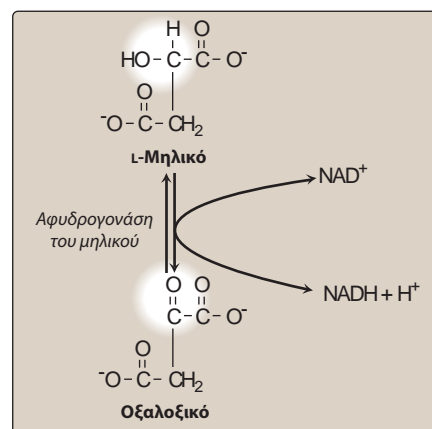
Η θειοκινάση του ηλεκτρικού (η οποία ονομάζεται επίσης συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA, από την αντίστροφη αντίδραση) διασπά τον υψηλής ενέργειας θειοεστερικό δεσμό του ηλεκτρυλο-CoA (βλ. Εικόνα 9.5). Αυτή η αντίδραση είναι συζευγμένη με τη φωσφορυλίωση της διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) προς τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP). Το GTP μπορεί να μετατραπεί σε ATP μέσω της αντίδρασης της κινάσης των διφωσφορικών νουκλεοσιδίων:



Η παραγωγή GTP μέσω της δράσης της θειοκινάσης του ηλεκτρικού αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος (βλ. σελ. 118). [Σημείωση: Ηλεκτρυλο-CoA παράγεται επίσης από το προπιονυλο-CoA που προέρχεται από τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα (βλ. σελ. 227) και από τον μεταβολισμό ορισμένων αμινοξέων (βλ. σελ. 306).]

**Ζ. Οξείδωση του ηλεκτρικού**

Το ηλεκτρικό οξειδώνεται σε φουμαρικό μέσω της δράσης της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού, η οποία συγχρόνως ανάγει το συνένζυμο της (FAD) σε FADH<sub>2</sub> (βλ. Εικόνα 9.5). Η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού είναι το μόνο ένζυμο του κύκλου TCA που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το μεμβρανικό αυτό ένζυμο συμμετέχει στο Σύμπλοκο II της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (βλ. σελ. 86). [Σημείωση: Δέκτης ηλεκτρονίων κατά την αντίδραση αυτή είναι το FAD και όχι το NAD<sup>+</sup> επειδή η αναγωγική ισχύς του ηλεκτρικού δεν επαρκεί για να αναχθεί το NAD<sup>+</sup>.]



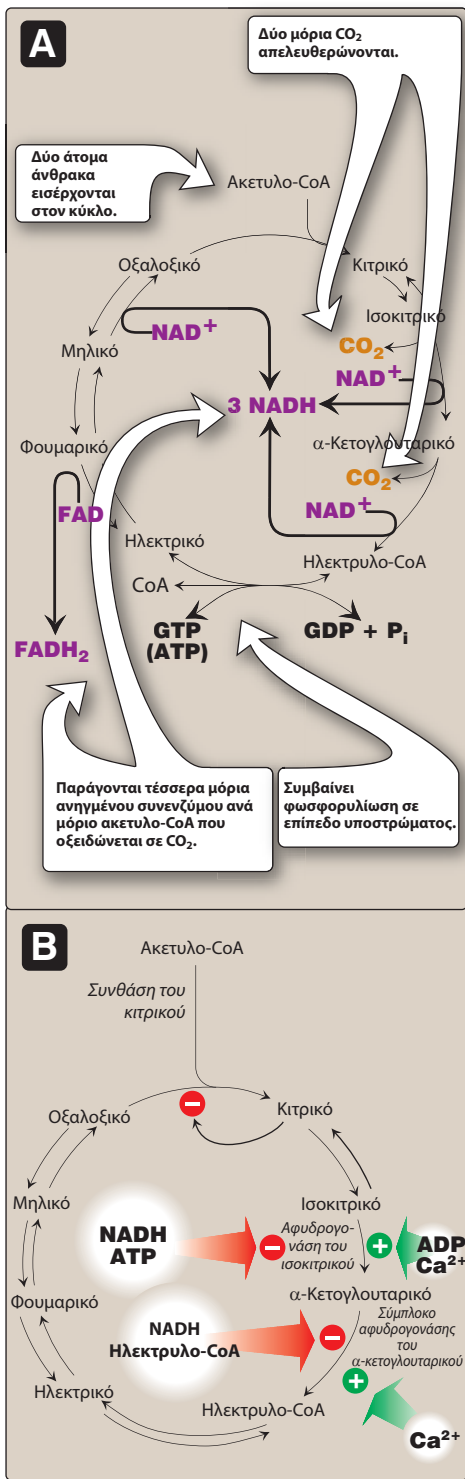
**Εικόνα 9.6**

Σχηματισμός (αναγέννηση) οξαλοξικού από μηλικό. NAD(H) = δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης.

Αντίδραση που παράγει ενέργεια	Αριθμός παραγόμενων μορίων ATP
3 NADH → 3 NAD <sup>+</sup>	9
FADH <sub>2</sub> → FAD	2
GDP + P <sub>i</sub> → GTP	1
	12 ATP ανά ακετυλο-CoA που οξειδώνεται

**Εικόνα 9.7**

Αριθμός μορίων ATP που παράγονται από την οξείδωση ενός μορίου ακετυλοσυνενζύμου A (CoA) χρησιμοποιώντας τόσο φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος όσο και οξειδωτική φωσφορυλίωση.



**Εικόνα 9.8**  
 Α. Παραγωγή ανηγμένων συνενζύμων, ATP και CO<sub>2</sub> στον κύκλο του κιτρικού οξέος. [Σημείωση: Το GTP μετατρέπεται σε ATP από την κινάση των διφωσφορικών νουκλεοσιδίων.] Β. Αναστολείς και ενεργοποιητές του κύκλου του κιτρικού οξέος.

**Η. Ενυδάτωση του φουμαρικού**

Το φουμαρικό ενυδατώνεται σε μηλικό μέσω μιας ελεύθερα αντιστρεπτής αντίδρασης που καταλύεται από τη *φουμαράση* (*υδρατάση του φουμαρικού*, βλ. Εικόνα 9.5). [Σημείωση: Φουμαρικό παράγεται επίσης μέσω του κύκλου της ουρίας (βλ. σελ. 294), κατά τη σύνθεση των πουρινών (βλ. σελ. 338) και μέσω του καταβολισμού των αμινοξέων φαινυλαλάνη και τυροσίνη (βλ. σελ. 303).]

**Θ. Οξείδωση του μηλικού**

Το μηλικό οξειδώνεται σε οξαλοξικό μέσω της *αφυδρογονάσης του μηλικού* (Εικόνα 9.6). Αυτή η αντίδραση αποδίδει το τρίτο και τελευταίο μόριο NADH που παράγει ο κύκλος TCA. Η πρότυπη διαφορά ελεύθερης ενέργειας (ΔG<sup>0</sup>, βλ. σελ. 81) της αντίδρασης έχει πρόσημο θετικό. Ωστόσο, η αντίδραση αυτή ωθείται προς την κατεύθυνση του οξαλοξικού μέσω της εξώεργης αντίδρασης της *συνθάσης του κιτρικού*. [Σημείωση: Οξαλοξικό παράγεται επίσης με τρανσαμίνωση του ασπαρτικού οξέος (βλ. σελ. 288).]

**III. ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ TCA**

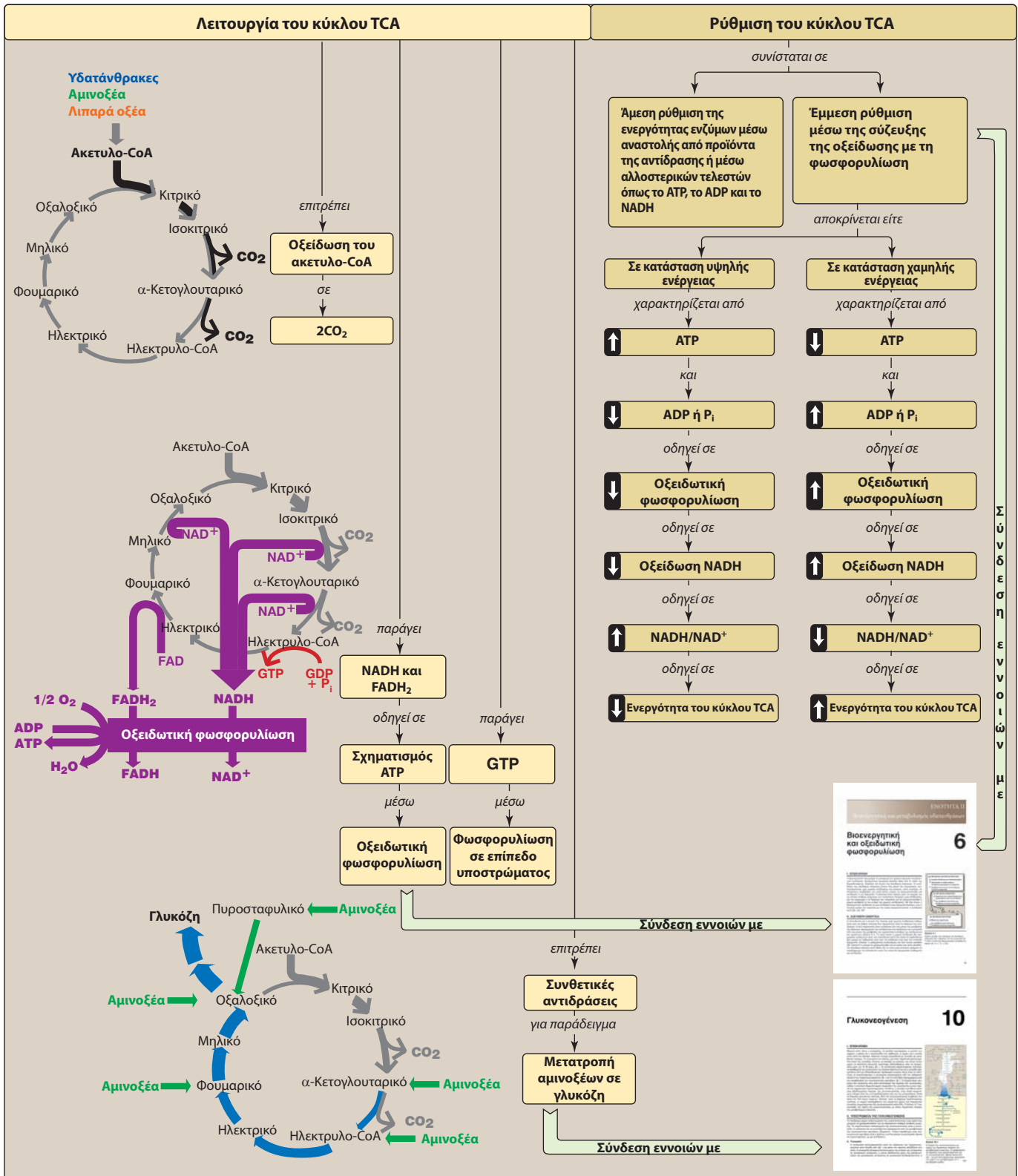
Τα άτομα άνθρακα εισέρχονται στον κύκλο ως ακετυλο-CoA και εξέρχονται ως CO<sub>2</sub>. Ο κύκλος TCA δεν οδηγεί σε καθαρή κατανάλωση ή παραγωγή οξαλοξικού ή οποιουδήποτε άλλου ενδιάμεσου μορίου. Στην πορεία του κύκλου, μεταφέρονται τέσσερα ζεύγη ηλεκτρονίων: τα τρία από αυτά χρησιμοποιούνται για την αναγωγή τριών μορίων NAD<sup>+</sup> σε NADH και το ένα για την αναγωγή FAD σε FADH<sub>2</sub>. Η οξείδωση ενός μορίου NADH μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγεί στον σχηματισμό τριών περίπου μορίων ATP, ενώ η οξείδωση ενός μορίου FADH<sub>2</sub> αποδίδει περίπου δύο ATP (βλ. σελ. 89). Η συνολική απόδοση ATP που προκύπτει από την οξείδωση ενός μορίου ακετυλο-CoA παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.7. Η Εικόνα 9.8 παρουσιάζει συνοπτικά τις αντιδράσεις του κύκλου TCA.

**IV. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ TCA**

Σε αντιδιαστολή προς τη γλυκόλυση, η οποία ρυθμίζεται κυρίως από την *PFK-1*, ο κύκλος TCA ελέγχεται με τη ρύθμιση αρκετών ενζύμων (βλ. Εικόνα 9.8). Τα κυριότερα από αυτά τα ρυθμιστικά ένζυμα είναι εκείνα που καταλύουν αντιδράσεις με υψηλά αρνητικές τιμές ΔG<sup>0</sup>, δηλαδή η *συνθάση του κιτρικού*, η *αφυδρογονάση του ισοκιτρικού*, και το *σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού*. Τα ισοδύναμα αναγωγικής ισχύος που απαιτούνται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγονται από την αντίδραση που καταλύει το *σύμπλοκο PDH* και από τον κύκλο TCA. Και οι δύο αυτές διεργασίες επαυξάνονται ως απόκριση σε μείωση του λόγου των συγκεντρώσεων ATP προς ADP.

**V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το **πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά** με την αντίδραση που καταλύει το **σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (σύμπλοκο PDH)**, η οποία παράγει **ακετυλοσυνένζυμο Α (CoA)**, δηλαδή το κυριότερο καύσιμο που τροφοδοτεί τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλο TCA) (Εικόνα 9.9). Αυτό το πολυενζυμικό σύμπλοκο απαιτεί πέντε συνένζυμα: την **πυροφωσφορική θειαμίνη**, το **λιποϊκό οξύ**, το **δινουκλεοτίδιο φλαβίνης-αδενίνης (FAD)**, το **δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης (NAD<sup>+</sup>)** και το **συνένζυμο Α (CoA)**. Το **σύμπλοκο PDH** ρυθμίζεται μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης του ενζύμου *E1* (*αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού*) από την κινάση του *PDH* και τη φωσφατάση του *PDH*: η φωσφορυλίωση αναστέλλει την ενεργότητα του *E1*. Η κινάση του



**Εικόνα 9.9**

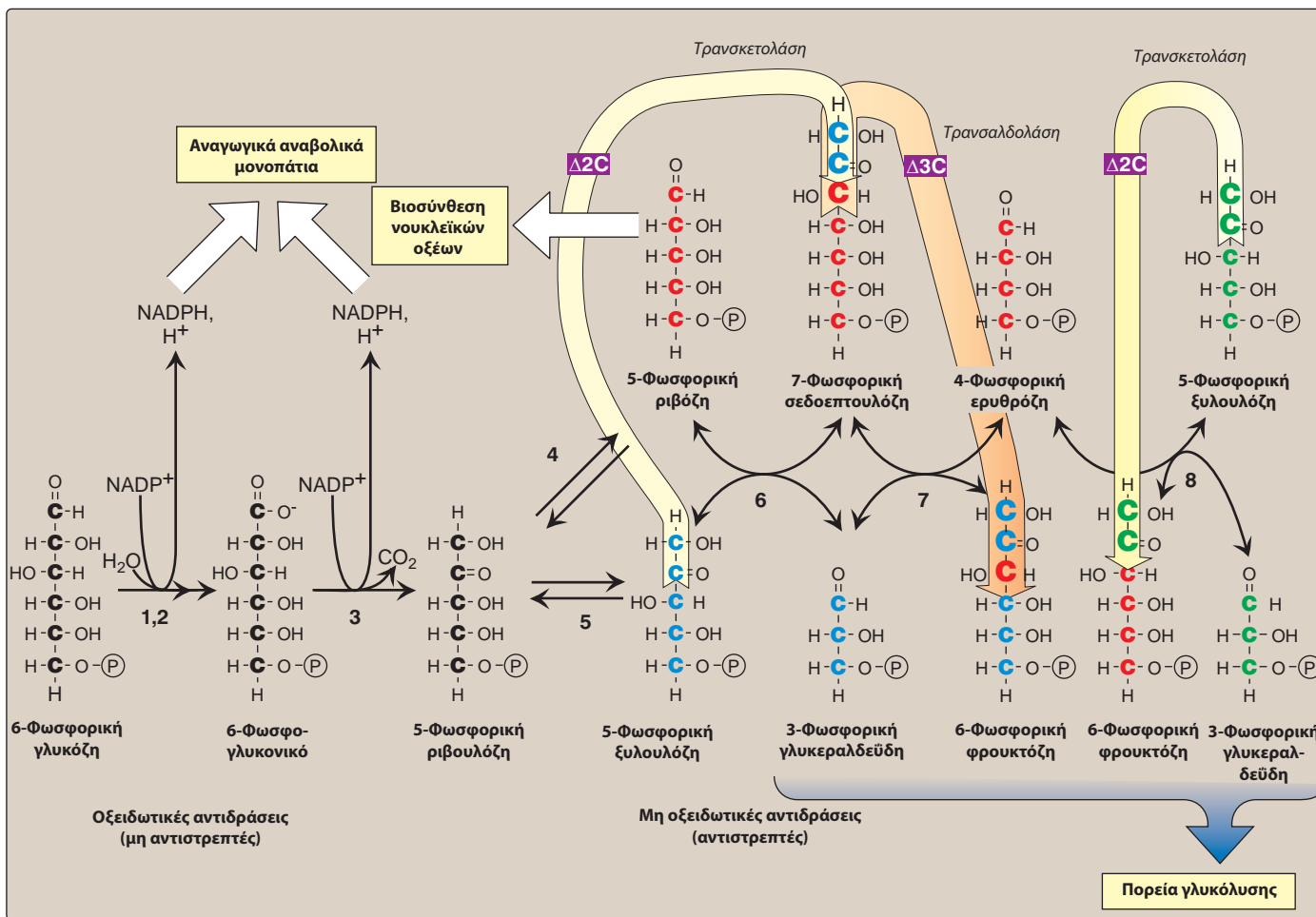
Διάγραμμα βασικών εννοιών του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). CoA = συνένζυμο A, NAD(H) = δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης, FAD(H<sub>2</sub>) = δινουκλεοτίδιο φλαβίνης-αδενίνης, GDP = διφωσφορική γουανοσίνη, GTP = τριφωσφορική γουανοσίνη, ADP = διφωσφορική αδενοσίνη, P<sub>i</sub> = φωσφορικό.



και, κάτω από τις περισσότερες μεταβολικές συνθήκες, ο λόγος NADPH/NADP<sup>+</sup> είναι αρκούτσως υψηλός για να αναστείλει τη δραστικότητα του ενζύμου. Ωστόσο, όταν η ζήτηση για NADPH είναι αυξημένη, η αναλογία του NADPH/NADP<sup>+</sup> μειώνεται και η ροή μέσω του κύκλου αυξάνεται ως αποτέλεσμα της ενισχυμένης δραστικότητας της G6PD. Η ινσουλίνη αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της G6PD, και η ροή της οδού αυξάνεται κατά το στάδιο της απορρόφησης (μετά το γεύμα) (βλ. σελ. 371-2).

**Β. Σχηματισμός της 5-φωσφορικής ριβουλόζης**

Η 6-φωσφογλυκονολακτόνη υδρολύεται από την *υδρολάση της 6-φωσφογλυκονολακτόνης*. Η αντίδραση είναι μη αντιστρεπτή και δεν αποτελεί καθοριστικό βήμα της ταχύτητας της πορείας. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του προϊόντος, 6-φωσφογλυκονικού, καταλύεται από την *αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού*. Αυτή η μη αντιστρεπτή αντίδραση παράγει μια φωσφορική πεντόζη (5-φωσφορική ριβουλόζη), CO<sub>2</sub> (από τον άνθρακα 1 της γλυκόζης) και ένα δεύτερο μόριο NADPH (βλ. Εικόνα 13.2).



**Εικόνα 13.2**

Αντιδράσεις της πορείας των φωσφορικών πεντοζών. Τα ένζυμα που αριθμούνται ανωτέρω είναι: 1, 2) *αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης* και *υδρολάση της 6-φωσφογλυκονολακτόνης*, 3) *αφυδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού*, 4) *ισομεράση της 5-φωσφορικής ριβόζης*, 5) *επιμεράση φωσφοπεντοζών*, 6) και 8) *τρανσκετολάση* (συνένζυμο: πυροφωσφορική θειαμίνη), και 7) *τρανσαλδολάση*. Δ2C = Στις αντιδράσεις *τρανσκετολάσης* μεταφέρονται δύο άτομα άνθρακα, Δ3C = Στις αντίδραση *τρανσαλδολάσης* μεταφέρονται τρία άτομα άνθρακα. Αυτό μπορεί να αναπαρασταθεί ως εξής: Σάκχαρο 5C + σάκχαρο 5C Δ2C → σάκχαρο 7C + σάκχαρο 3C Δ3C → σάκχαρο 4C + σάκχαρο 6C. NADP(H)= φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης, P= φωσφορική ομάδα.

### III. ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ ΜΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι μη οξειδωτικές αντιδράσεις της πορείας των φωσφορικών πεντοζών συμβαίνουν σε όλους τους τύπους κυττάρων που συνθέτουν νουκλεοτίδια και νουκλεϊκά οξέα. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύουν την αλληλομετατροπή των σακχάρων που περιέχουν τρία έως επτά άτομα άνθρακα (βλ. Εικόνα 13.2). Αυτές οι αντιστρεπτές αντιδράσεις επιτρέπουν στην 5-φωσφορική ριβουλόζη (που παράγεται στο οξειδωτικό μέρος της πορείας) να μετατραπεί είτε σε 5-φωσφορική ριβόζη (που χρειάζεται στη σύνθεση των νουκλεοτιδίων, βλ. σελ. 337) είτε σε ενδιάμεσα της γλυκόλυσης (δηλαδή, 6-φωσφορική φρουκτόζη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη). Για παράδειγμα, πολλά κύτταρα που πραγματοποιούν αναγωγικές βιοσυνθετικές αντιδράσεις έχουν μεγαλύτερη ανάγκη για NADPH από ό,τι για 5-φωσφορική ριβόζη. Στην περίπτωση αυτή, η *τρανσκετολάση* (η οποία μεταφέρει ομάδες δύο ατόμων άνθρακα σε μια αντίδραση που απαιτεί πυροφωσφορική θειαμίνη [TPP]) και η *τρανσaldολάση* (η οποία μεταφέρει ομάδες τριών ατόμων άνθρακα) μετατρέπουν την 5-φωσφορική ριβουλόζη, που παράγεται ως τελικό προϊόν των οξειδωτικών αντιδράσεων, προς 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και 6-φωσφορική φρουκτόζη, τα οποία είναι ενδιάμεσα της γλυκόλυσης. Αντίθετα, υπό συνθήκες στις οποίες η ζήτηση για ριβόζη, για παραγωγή νουκλεοτιδίων και νουκλεϊκών οξέων είναι μεγαλύτερη από την ανάγκη για NADPH, οι μη οξειδωτικές αντιδράσεις μπορούν να παράγουν την 5-φωσφορική ριβόζη από 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και 6-φωσφορική φρουκτόζη απουσία των οξειδωτικών σταδίων (Εικόνα 13.3).

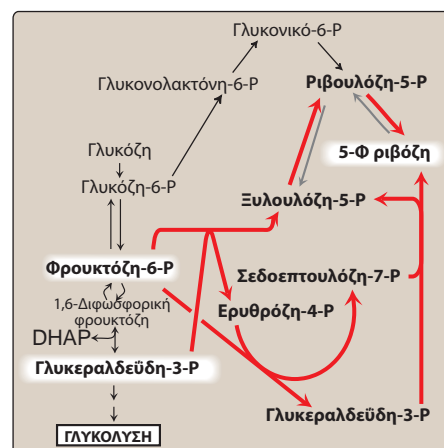
Εκτός από τις *τρανσκετολάσες*, η TPP χρειάζεται ως συνένζυμο στα ενζυμικά σύμπλοκα της *αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού* (βλ. σελ. 128), της *αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού* στον κύκλο του κιτρικού οξέος (βλ. σελ. 131), και της *αφυδρογονάσης του α-κετοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας* στον καταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (βλ. σελ. 306–7).

### IV. ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ NADPH

Το συνένζυμο NADPH διαφέρει από το δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης (NADH) μόνο κατά την παρουσία μιας φωσφορικής ομάδας σε μία από τις ομάδες ριβόζης (Εικόνα 13.4). Αυτή η φαινομενικά μικρή αλλαγή στη δομή επιτρέπει στο NADPH να αλληλεπιδρά με ένζυμο που αναγνωρίζουν ειδικά το NADPH και έχουν ιδιαίτερους ρόλους στο κύτταρο. Για παράδειγμα, στο κυτταροδιάλυμα των ηπατοκυττάρων ο λόγος  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  σε σταθερή κατάσταση είναι περίπου 0,1, μια τιμή η οποία ευνοεί τη χρήση του NADPH σε αναγωγικές βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Αντίθετα, ο λόγος  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  είναι υψηλός (περίπου 1.000), γεγονός που ευνοεί έναν οξειδωτικό ρόλο για το  $\text{NAD}^+$ . Αυτή η ενόχληση συνοψίζει μερικές σημαντικές ειδικές λειτουργίες των  $\text{NADP}^+$  και NADPH σε αντιδράσεις αναγωγικής βιοσύνθεσης και αποτοξίνωσης.

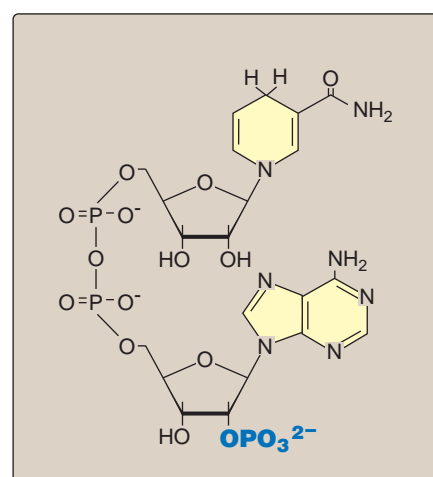
#### A. Αναγωγική βιοσύνθεση

Το NADPH μπορεί να θεωρηθεί μόριο υψηλής ενέργειας, όπως είναι και το NADH. Ωστόσο, τα ηλεκτρόνια του NADPH προορίζονται για χρήση σε αναγωγικές βιοσυνθέσεις και όχι για μεταφορά στο οξυγόνο όπως συμβαίνει στην περίπτωση του NADH (βλ. σελ. 86). Έτσι, στους μεταβολικούς μετασχηματισμούς της πορείας των φωσφορικών πεντοζών, μέρος της ενέργειας της 6-φωσφορικής γλυκόζης μετατρέπεται σε NADPH, ένα μόριο με αρνητική τιμή αναγωγικού δυναμικού (βλ. σελ. 88), το οποίο, κατά συνέπεια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις που



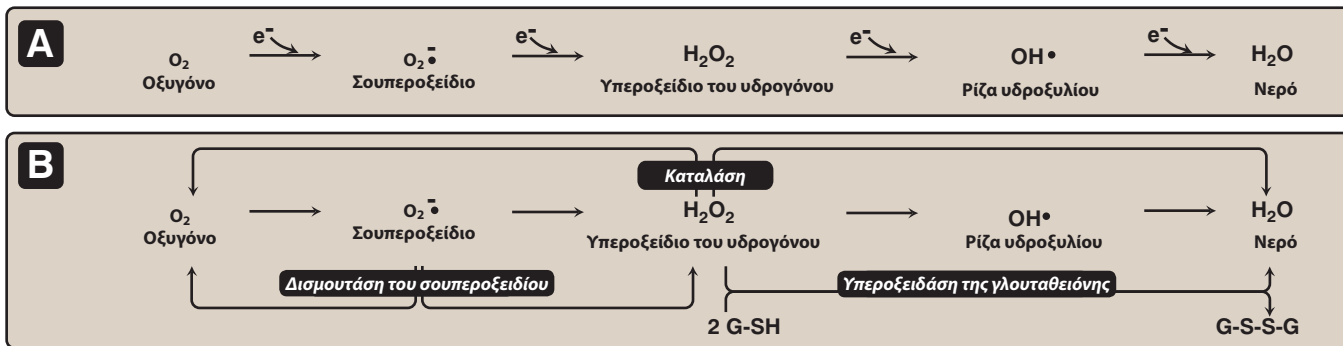
**Εικόνα 13.3**

Σχηματισμός 5-φωσφορικής ριβόζης από ενδιάμεσα της γλυκόλυσης. P = φωσφορική ομάδα, DHAP = φωσφορική διυδροξυακετόνη.



**Εικόνα 13.4**

Δομή του φωσφορικού δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου-αδενίνης σε ανηγμένη μορφή (NADPH).



**Εικόνα 13.5**

A. Σχηματισμός ενδιάμεσων δραστικών μορίων από μοριακό οξυγόνο. e<sup>-</sup> = ηλεκτρόνια. B. Δράσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων. G-SH = ανηγμένη γλουταθειόνη, G-S-S-G = οξειδωμένη γλουταθειόνη. (Βλέπε Εικόνα 13.6B για την αναγέννηση της G-SH.)

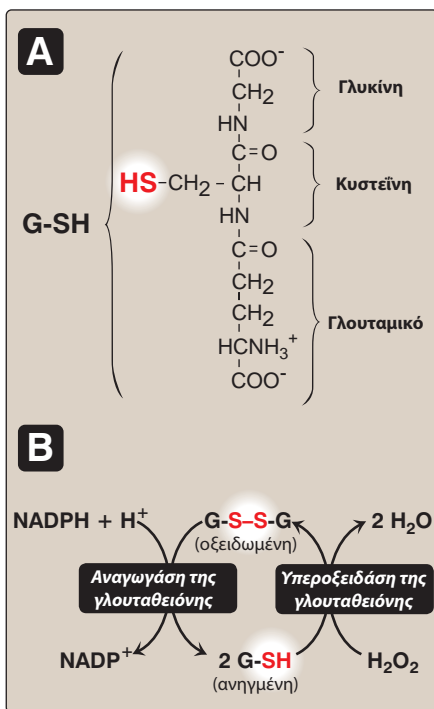
απαιτούν έναν δότη ηλεκτρονίων, όπως στη σύνθεση λιπαρών οξέων (βλ. σελ. 219) και στεροειδών (βλ. σελ. 275).

**B. Αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου**

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανήκει στην οικογένεια των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που σχηματίζονται από τη μερική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (Εικόνα 13.5A). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται συνεχώς ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, μέσω αντιδράσεων με φάρμακα και περιβαλλοντικές τοξίνες, ή όταν μειώνεται το επίπεδο των αντιοξειδωτικών ουσιών, δημιουργώντας συνολικά την κατάσταση του οξειδωτικού στρες. Τα εξαιρετικά δραστικά ενδιάμεσα μόρια οξυγόνου μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή χημική βλάβη στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα ακόρεστα λιπίδια και μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Οι ROS έχουν εμπλακεί σε έναν αριθμό παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της βλάβης από επαναιμάτωση, του καρκίνου, της φλεγμονώδους νόσου και της γήρανσης. Το κύτταρο έχει αρκετούς προστατευτικούς μηχανισμούς που ελαχιστοποιούν την τοξική δράση αυτών των ενώσεων.

- 1. Ένζυμα που καταλύουν αντιοξειδωτικές αντιδράσεις:** Η ανηγμένη γλουταθειόνη (G-SH), μια τριπεπτιδική θειόλη (γ-γλουταμιλο-κυστεϊνο-γλυκίνη) που βρίσκεται στα περισσότερα κύτταρα, μπορεί να αποτοξινώσει χημικά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Εικόνα 13.5B). Αυτή η αντίδραση, που καταλύεται από τη σεληνιο-φέρουσα *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης*, σχηματίζει οξειδωμένη γλουταθειόνη (G-S-S-G), η οποία δεν έχει πλέον προστατευτικές ιδιότητες. Το κύτταρο αναγεννά την G-SH σε μια αντίδραση που καταλύεται από την *αναγωγή της γλουταθειόνης*, χρησιμοποιώντας NADPH ως πηγή αναγωγικών ισοδυνάμων. Έτσι, το NADPH παρέχει ηλεκτρόνια έμμεσα για την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Σχήμα 13.6). [Σημείωση: Τα ερυθροκύτταρα (RBC) εξαρτώνται απόλυτα από την πορεία των φωσφορικών πεντοζών για τον εφοδιασμό τους με NADPH, διότι, σε αντίθεση με άλλους τύπους κυττάρων, δεν έχουν εναλλακτική πηγή για αυτό το απαραίτητο συνένζυμο.] Επιπλέον ένζυμα, όπως η *δισμουτάση του σουπεροξειδίου* και η *καταλάση*, καταλύουν τη μετατροπή άλλων δραστικών ενδιάμεσων μορίων οξυγόνου σε αβλαβή προϊόντα (βλ. Εικόνα 13.5B). Ως σύνολο, τα ένζυμα αυτά χρησιμεύουν ως αμυντικό σύστημα για την προστασία από τις τοξικές επιδράσεις των ROS.

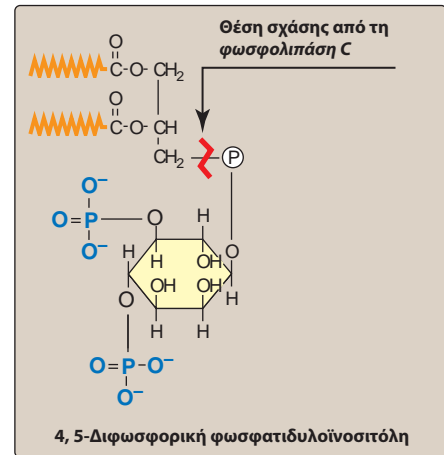
- 2. Αντιοξειδωτικά χημικά:** Ένας αριθμός ενδοκυτταρικών αναγωγικών παραγόντων, όπως το ασκορβικό (βλ. σελ. 433), η βιταμίνη E (βλ. σελ. 391), και το β-καροτένιο (βλ. σελ. 438-440), μπορούν να ανάγουν και, ως εκ τούτου, να αποτοξινώσουν ενδιάμεσες δραστικές



**Εικόνα 13.6**

Δομή της ανηγμένης γλουταθειόνης (G-SH). [Σημείωση: Το γλουταμικό συνδέεται με την κυστεΐνη μέσω του γ-, και όχι του α-καρβοξυλίου. B. Αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ανηγμένο φωσφορικό διουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADPH), η οποία διαμεσολαβείται από τη γλουταθειόνη. G-S-S-G = οξειδωμένη γλουταθειόνη.

σφατιδυλοχολίνης ακόμη και όταν τα επίπεδα της ελεύθερης χολίνης είναι χαμηλά, γιατί εξαγεί σημαντικά ποσά φωσφατιδυλοχολίνης τόσο στη χολή όσο και ως συστατικό των λιποπρωτεϊνών του ορού. Για να παραχθεί η φωσφατιδυλοχολίνη που απαιτείται, η φωσφατιδυλοσερίνη αποκαρβοξυλιώνεται σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη από την αποκαρβοξυλάση της φωσφατιδυλοσερίνης, ένα ένζυμο το οποίο απαιτεί τη φωσφορική πυριδοξάλη ως συνένζυμο. Στη συνέχεια η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη μεθυλιώνεται σε τρία βήματα για να παραχθεί φωσφατιδυλοχολίνη, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 17.6. Η S-αδενοσυλομεθειονίνη είναι ο δότης των μεθυλομάδων (βλ. σελ. 304).



**Εικόνα 17.7**

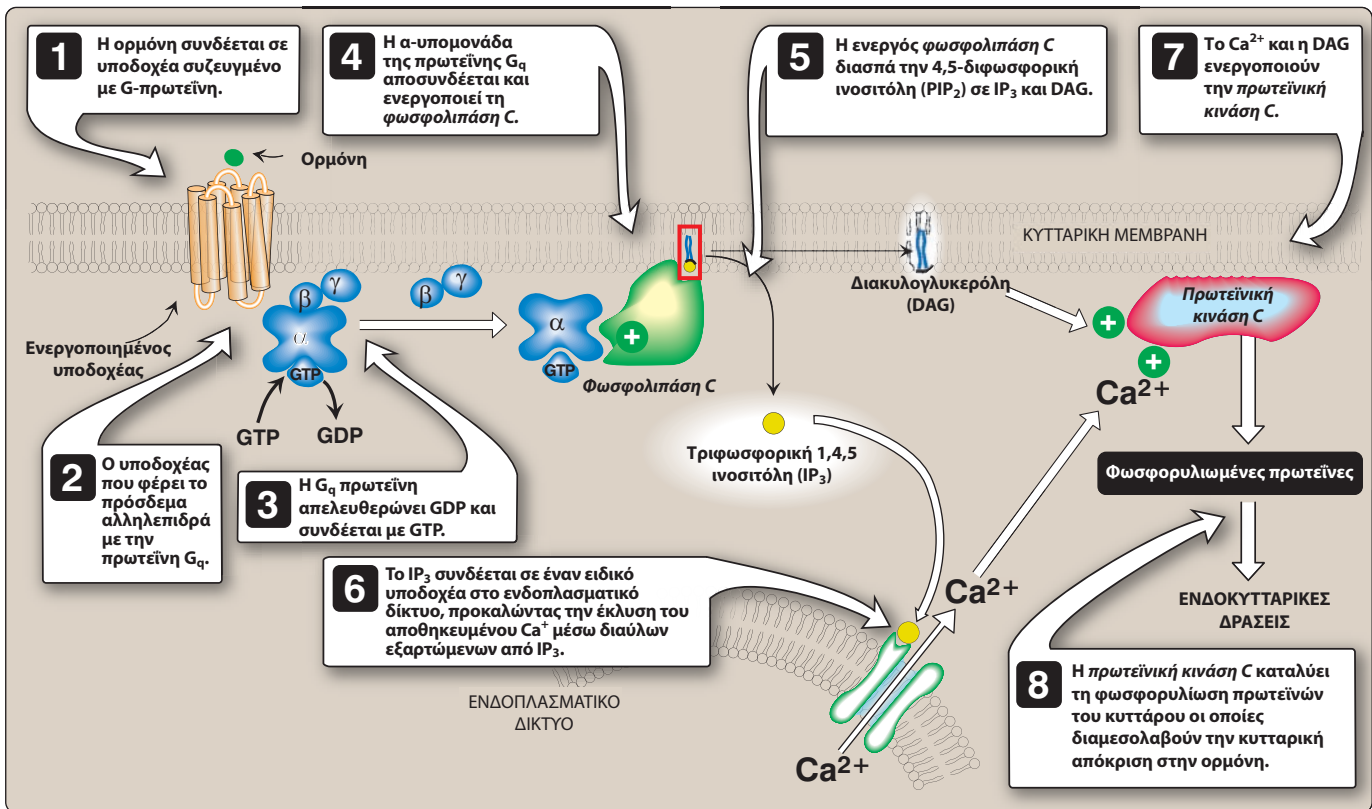
Η δομή της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Η πέψη με τη φωσφολιπάση C παράγει 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη και διακυλογλυκερόλη. (~~~~~ είναι η υδρογονοανθρακική αλυσίδα λιπαρού οξέος.) P = φωσφορική ομάδα.

**Γ. Φωσφατιδυλοσερίνη**

Η σύνθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στους ιστούς των θηλαστικών γίνεται με μια αντίδραση ανταλλαγής βάσης στην οποία η αιθανολαμίνη της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης ανταλλάσσεται με ελεύθερη σερίνη (βλ. Εικόνα 17.6). Η αντίδραση αυτή, αν και αντιστρεπτή, χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή της φωσφατιδυλοσερίνης που απαιτείται για τη σύνθεση των μεμβρανών.

**Δ. Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη**

Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη συντίθεται από ελεύθερη ινοσιτόλη και CDP-διακυλογλυκερόλη όπως φαίνεται στην Εικόνα 17.5. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη δεν είναι ένα συνηθισμένο φωσφολιπίδιο επειδή πολύ συχνά περιέχει στεατικό οξύ στον άνθρακα 1 και αραχιδονικό οξύ στον άνθρακα 2 της γλυκερόλης. Για τον λόγο αυτό, η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη χρη-



**Εικόνα 17.8**

Ο ρόλος της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλογλυκερόλης στην ενδοκυττάρια μεταγωγή μηνύματος. GTP = τριφωσφορική γουανοσίνη, GDP = διφωσφορική γουανοσίνη.