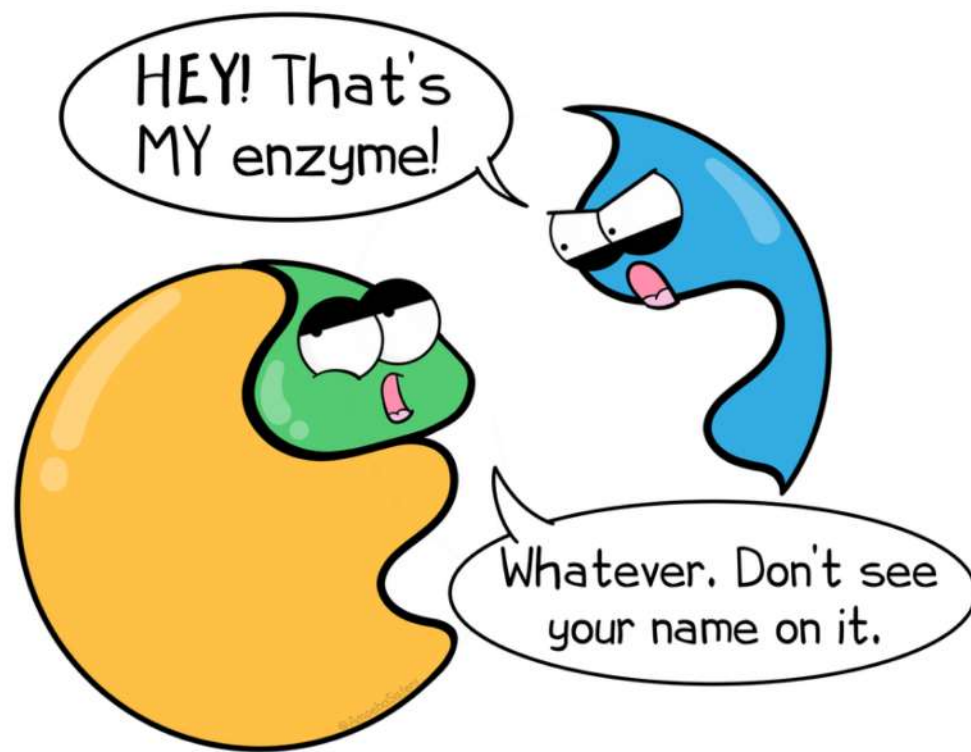


Σχεδιασμός και ανάπτυξη φαρμάκων

Κεφάλαιο 02

Ένζυμα: Δομή και λειτουργία



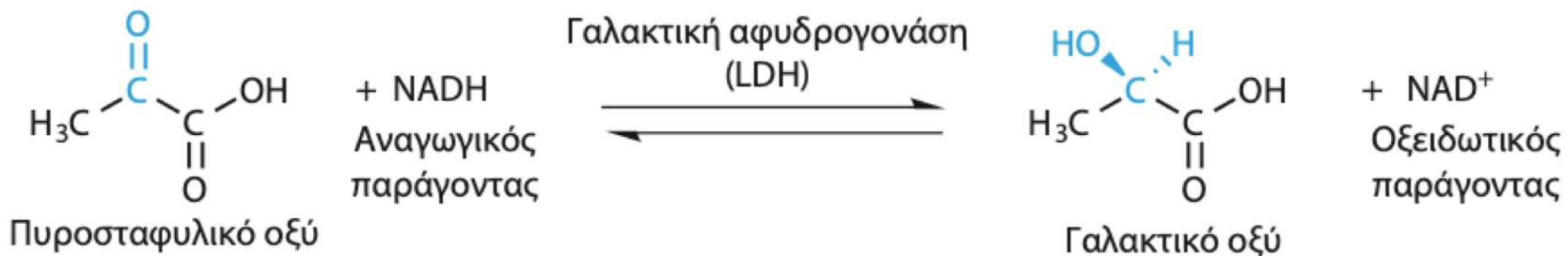
Περιεχόμενα Κεφαλαίου

- 3.1 Ένζυμα ως καταλύτες
- 3.2 Πως τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις
- 3.3 Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου
- 3.4 Πρόσδεση υποστρώματος σε ενεργό κέντρο
- 3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων
- 3.6 Ρύθμιση των ενζύμων
- 3.7 Ισοένζυμα
- 3.8 Κινητική ενζύμων

3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

Σφαιρικές πρωτεΐνες που δρουν ως καταλύτες του σώματος

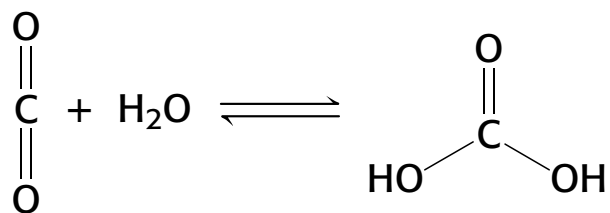
Επιταχύνουν το χρόνο που χρειάζεται μια αντίδραση για να επιτευχθεί η ισορροπία



3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

Τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις

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	$1,3 \times 10^{-1}$	1×10^6	$7,7 \times 10^6$

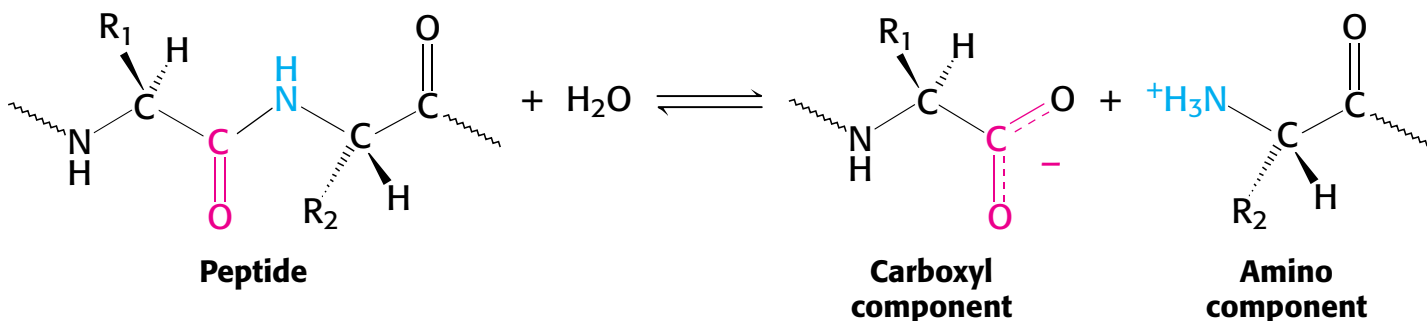


Ενυδάτωση του CO_2 ώστε να είναι εφικτή η μεταφορά του από τους ιστούς στο αίμα

3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

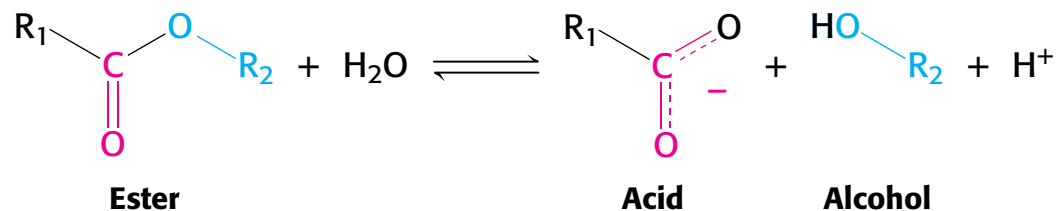
Τα ένζυμα είναι ισχυροί και σε μεγάλο βαθμό εξειδικευμένοι καταλύτες

π.χ. Πρωτεολυτικά ένζυμα



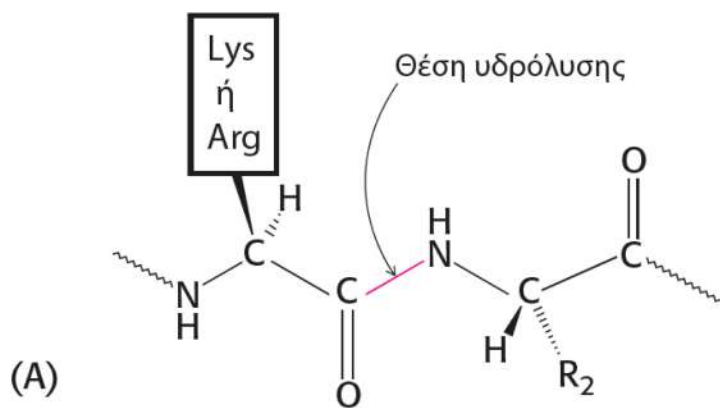
Υψηλό βαθμό εξειδίκευσης:

- Αντιδράσεις που καταλύουν: Υδρόλυση ενός πεπτιδικού και εστερικού δεσμού
- Επιλογή αντιδρώντων: **υποστρώματα**



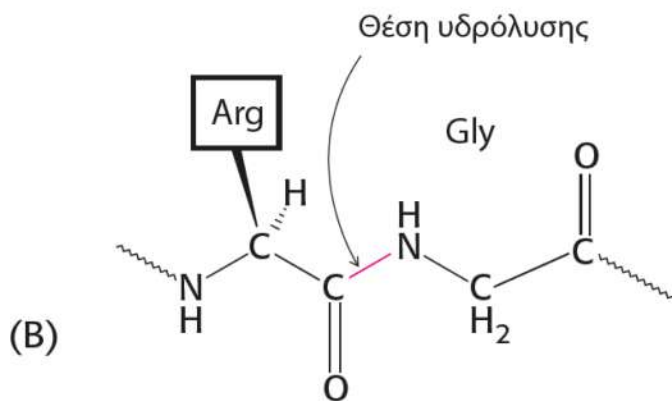
3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

π.χ. Πρωτεολυτικά ένζυμα



Θρυψίνη

- Διαφορετικός βαθμός εξειδίκευσης
- Οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου



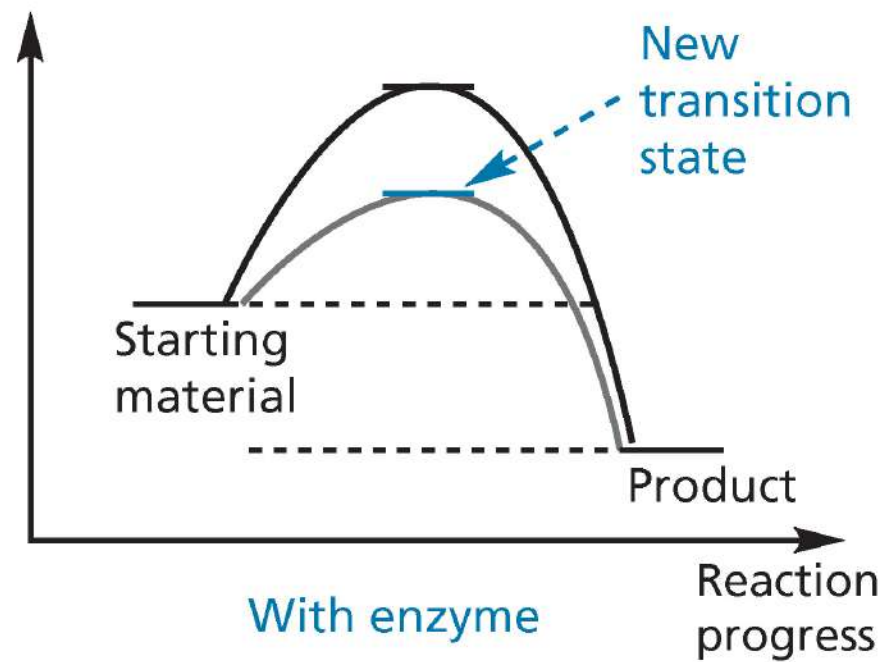
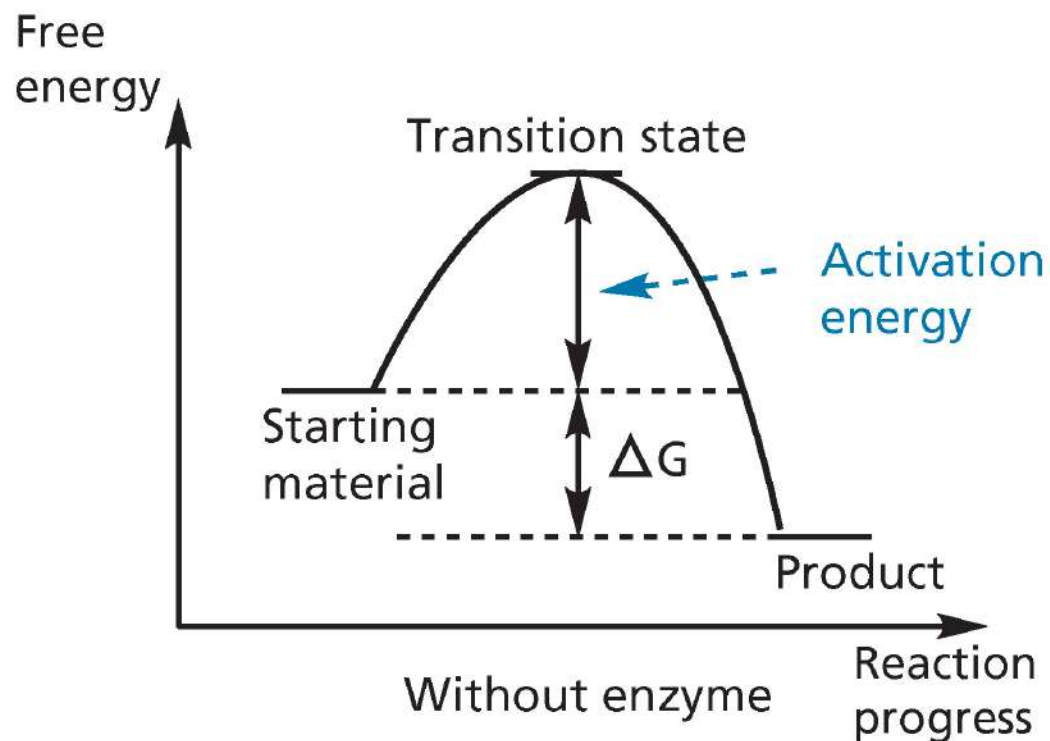
Θρομβίνη

(συμμετέχει στην πήξη του αίματος)

- Η ακρίβεια αυτή είναι αποτέλεσμα της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης

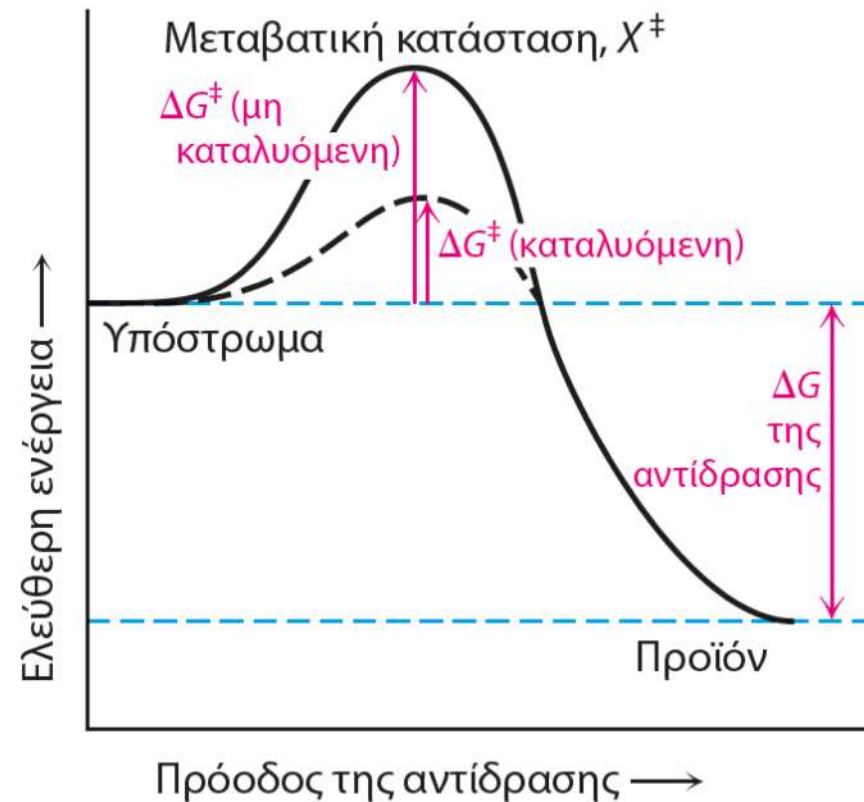
3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

Μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης



3.1 Ένζυμα ως καταλύτες

Μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης





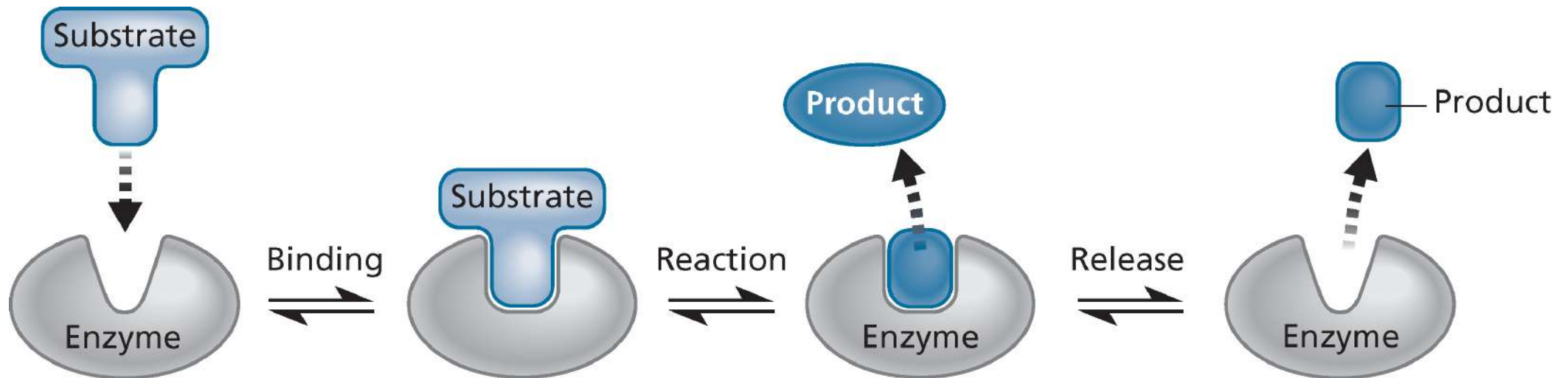
3.2 Πως τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις

- Παρέχουν την επιφάνεια αντίδρασης (το ενεργό κέντρο)
- Παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον (υδρόφοβο)
- Φέρνουν τα αντιδρώντα κοντά μεταξύ τους
- Τοποθετούν τα αντιδρώντα με κατάλληλο τρόπο για την αντίδραση
- Εξασθενούν τους δεσμούς στα αντιδρώντα
- Μπορεί να συμμετέχουν στον μηχανισμό
- Σταθεροποιούν τη μεταβατική κατάσταση με διαμοριακούς δεσμούς

3.3 Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου

Είναι υδρόφοβη κοιλότητα ή εσοχή στην επιφάνεια του ενζύμου

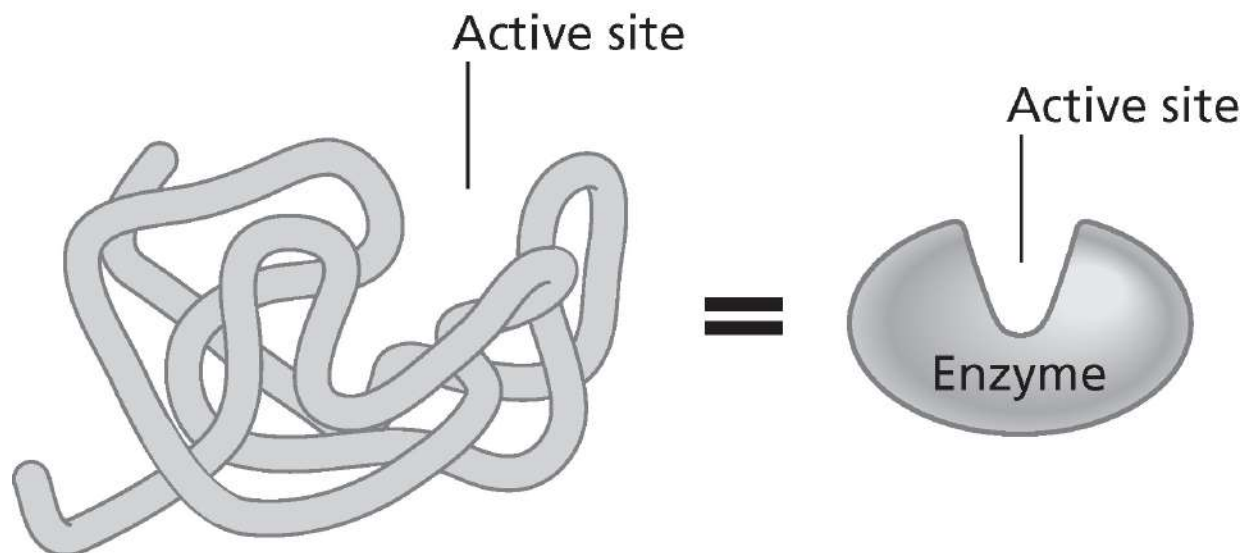
Υποδέχεται αντιδρώντα (υποστρώματα και συμπαραγοντες)



3.3 Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου

Περιέχει αμινοξέα στο ενεργό κέντρο μπορεί να έχουν ένα από τους παρακάτω ρόλους

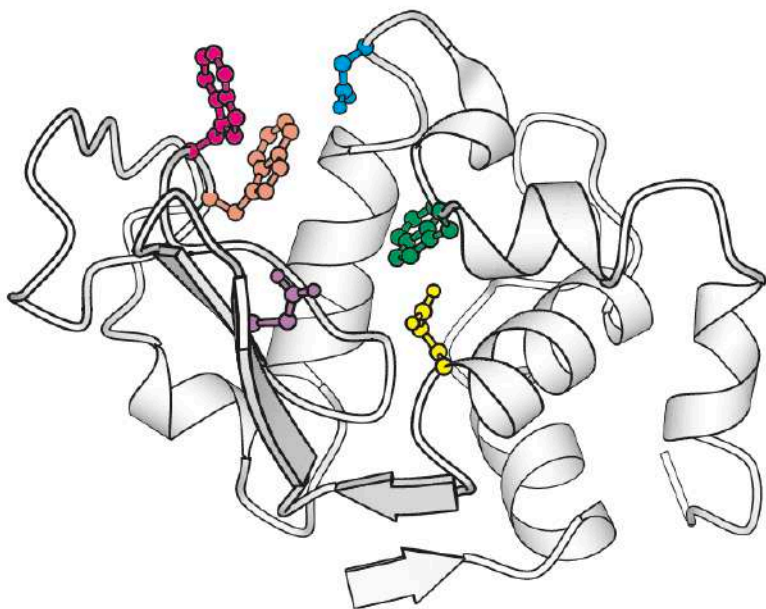
- Πρόσδεση του υποστρώματος ή/και του συμπαραγόνα
- Κατάλυση, όπου συμμετέχει στον μηχανισμό της αντίδρασης



3.3 Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου

Τα ενεργά κέντρα των ενζύμων έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά

(A)



1. Είναι μια τρισδιάστατη εσοχή ή σχισμή
(έχει σχηματιστεί από απομακρυσμένα αμινοξέα)

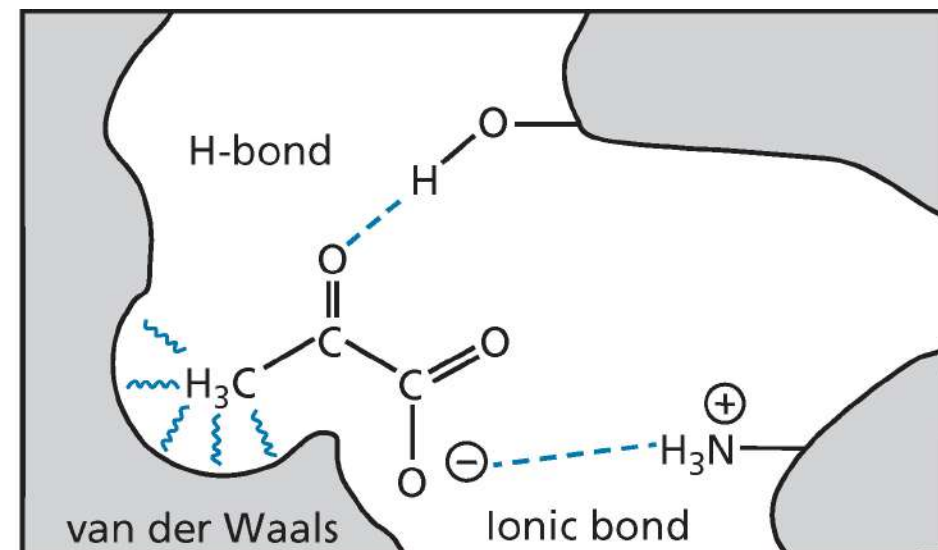
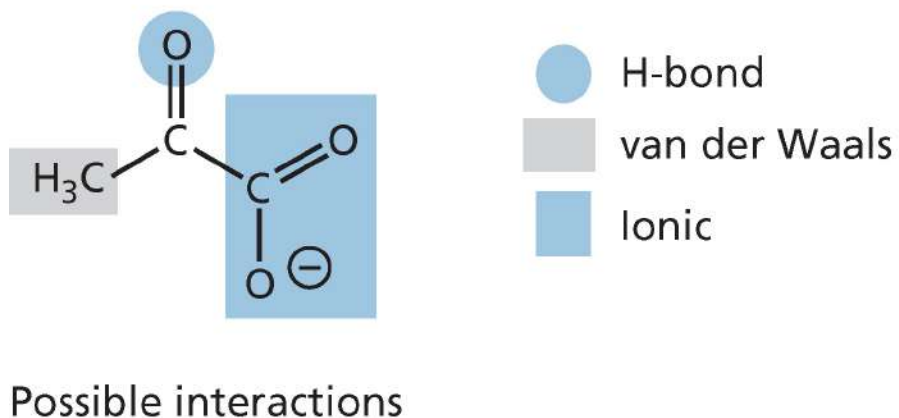
2. Μικρό μέρος από τον συνολικό όγκο

3. Είναι μοναδικά μικροπεριβάλλοντα
(το μη πολικό μικροπεριβάλλον ενισχύει την πρόσδεση του S και την κατάλυση. Υπάρχουν επίσης και κάποια πολικά αμινοξέα, που βοηθούν στην πρόσδεση)

3.4 Πρόσδεση υποστρώματος σε ενεργό κέντρο

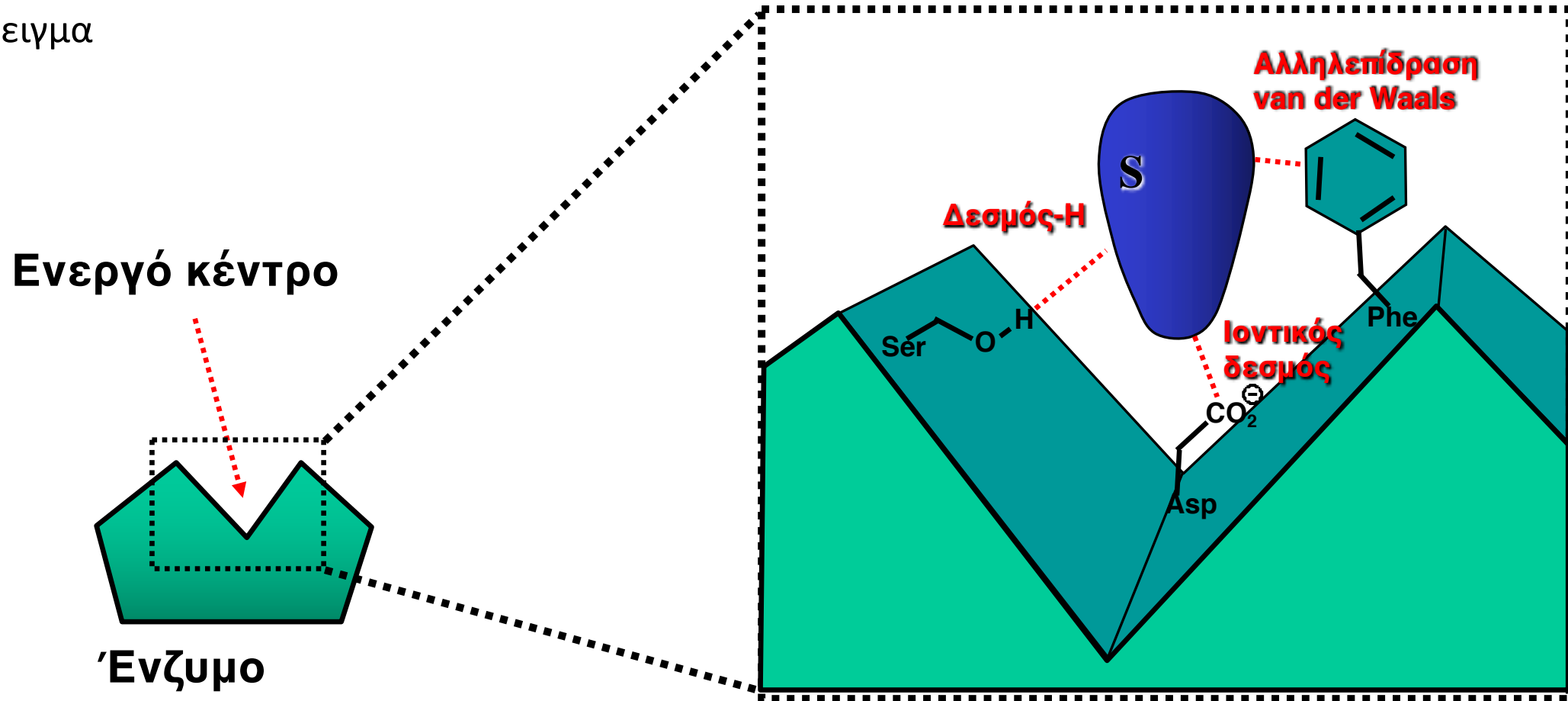
Κατά την πρόσδεση πραγματοποιούνται διαμοριακοί δεσμοί μεταξύ χαρακτηριστικών ομάδων του υποστρώματος και του ενεργού κέντρου αντίστοιχα

- Ιοντική
- Δεσμός-H
- van der Waals



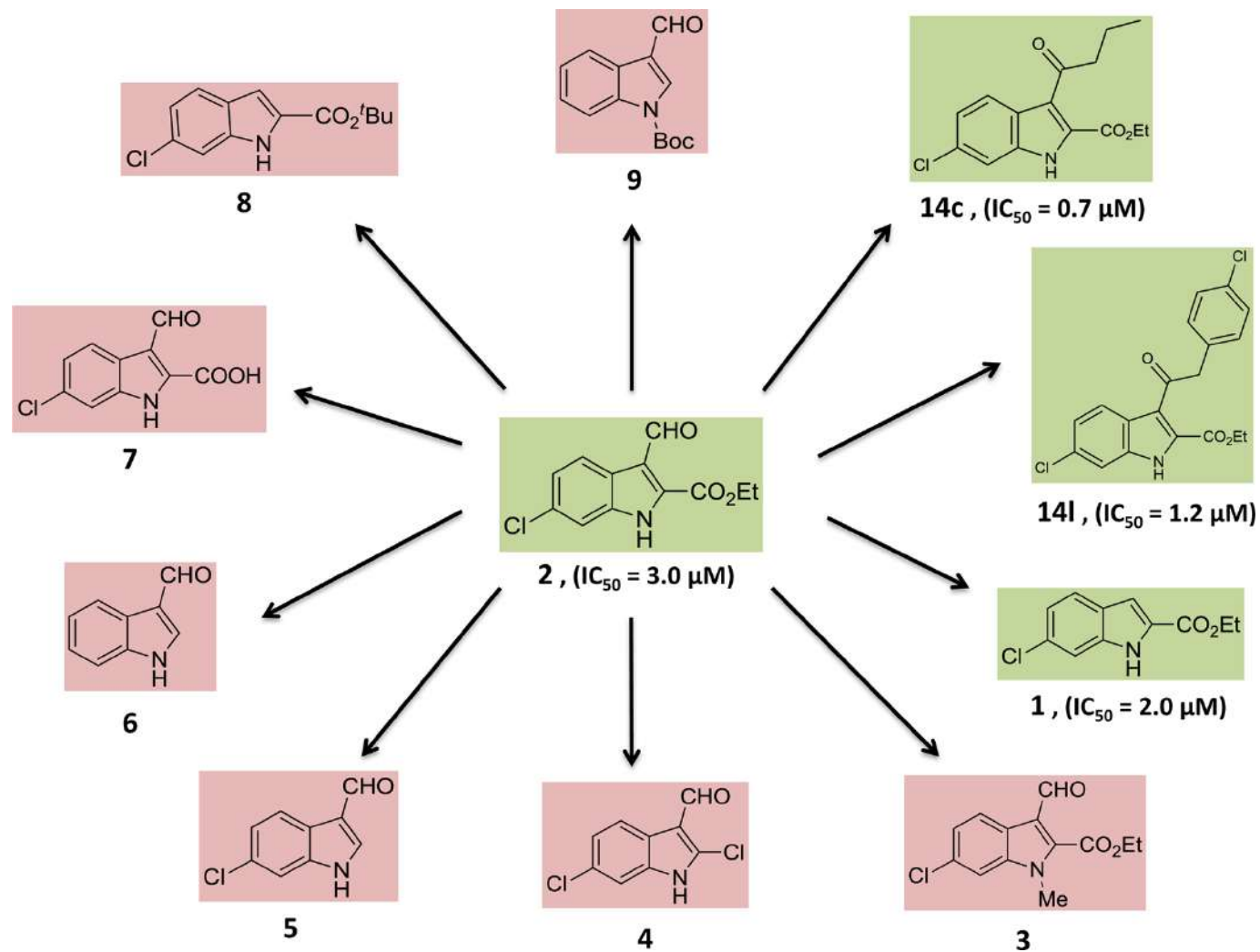
3.4 Πρόσδεση υποστρώματος σε ενεργό κέντρο

Παράδειγμα



3.Χ Πρόσδεση αναστολέα σε ενεργό κέντρο

Παράδειγμα

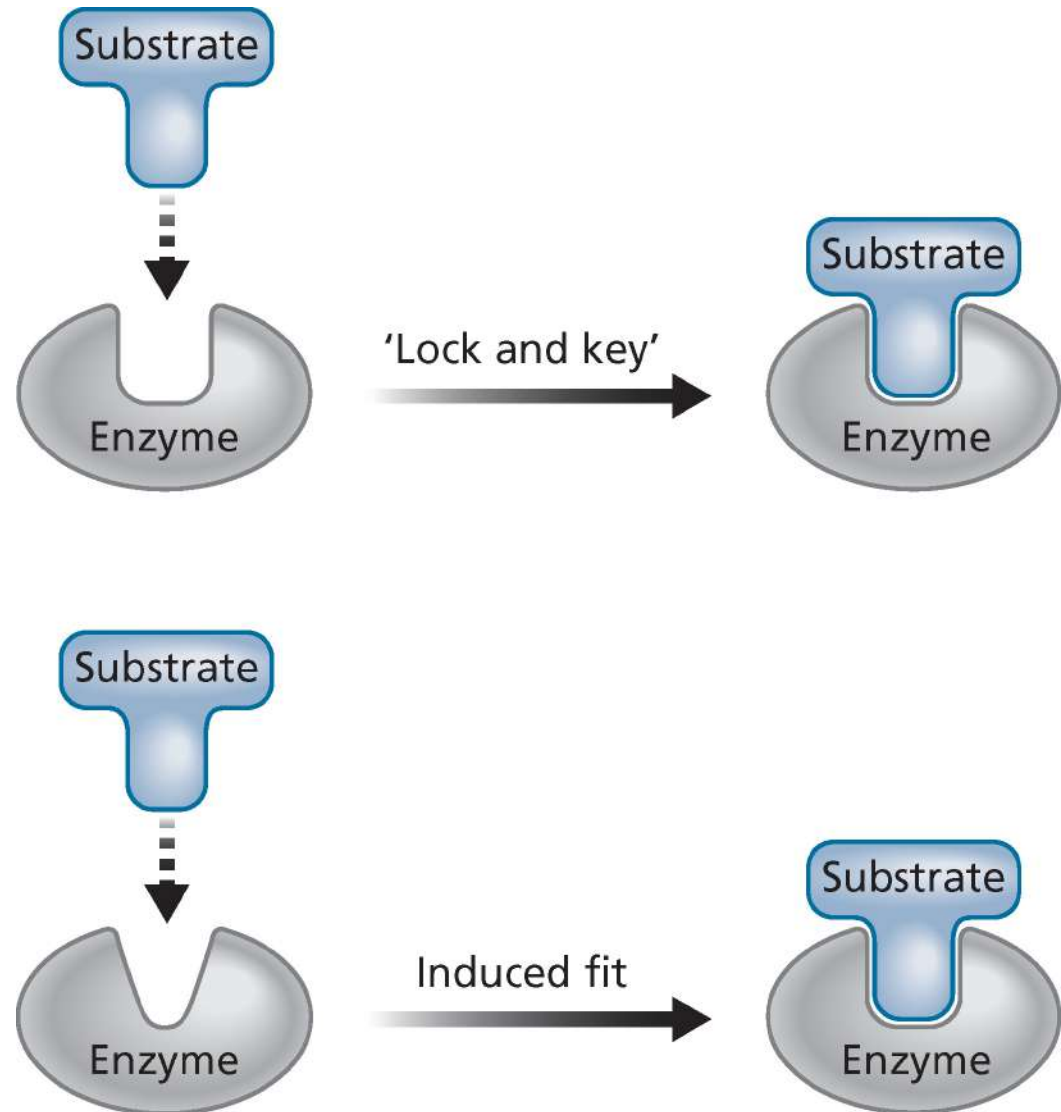


3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης

- Υπόθεση κλειδιού-κλειδαριάς του Fischer
- Θεωρία της επαγόμενης προσαρμογής του Koshland

Τι ισχύει και γιατί;



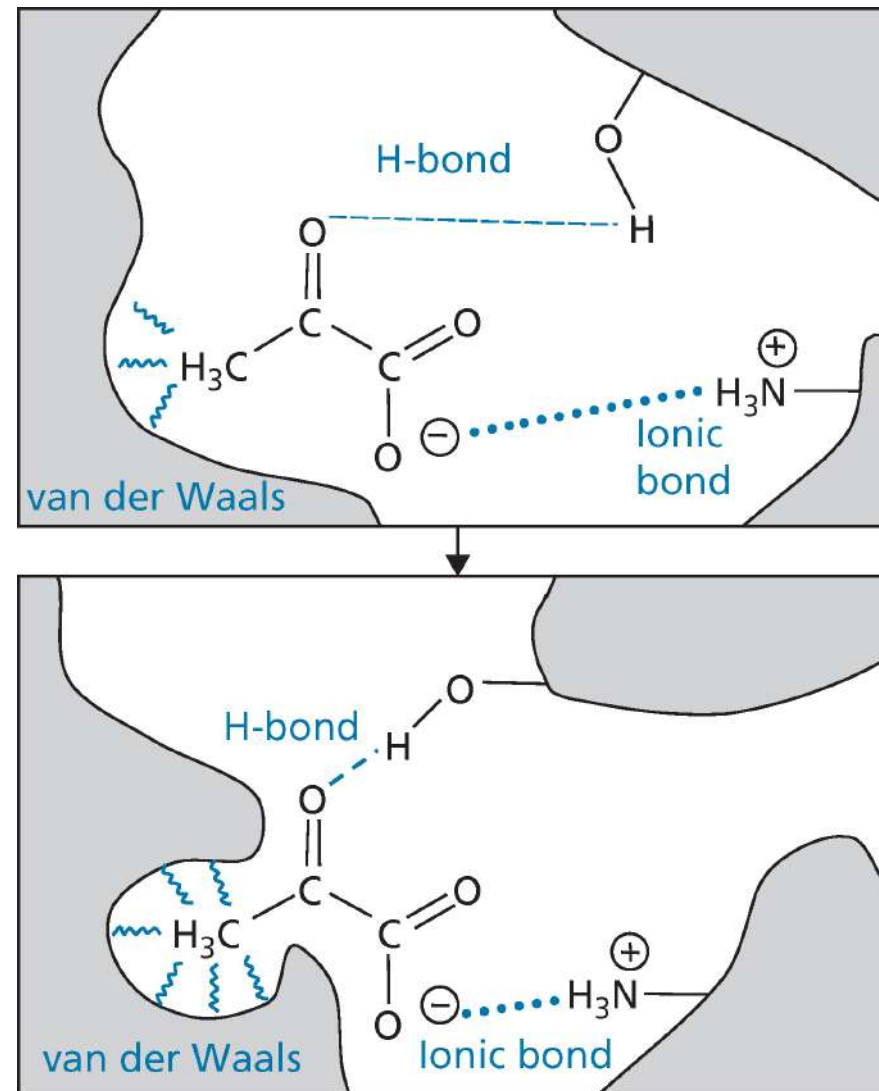
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης

- Το ενεργό κέντρο έχει σχεδόν το κατάλληλο σχήμα για το υπόστρωμα
- Η πρόσδεση αλλάζει το σχήμα του ενζύμου (επαγόμενη προσαρμογή)
- Η διαδικασία πρόσδεσης μπορεί να παραμορφώσει τους δεσμούς στο υπόστρωμα αλλά και στο ένζυμο

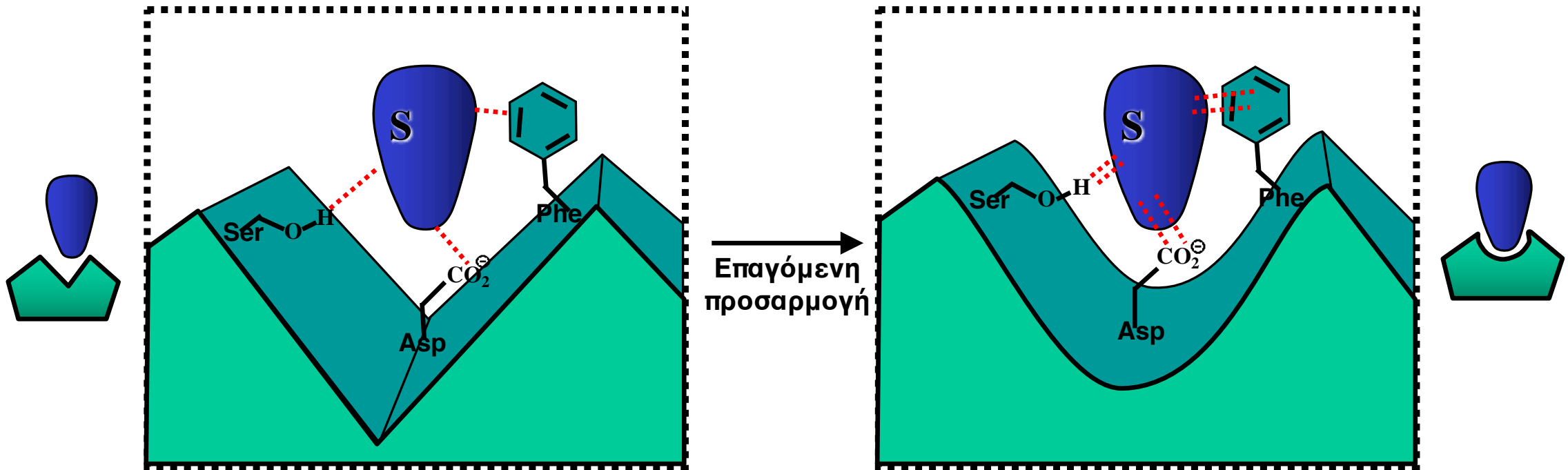
Τι μπορεί να αλλάξει;

Πόσο ισχυρά πρέπει να δεθεί το υπόστρωμα;



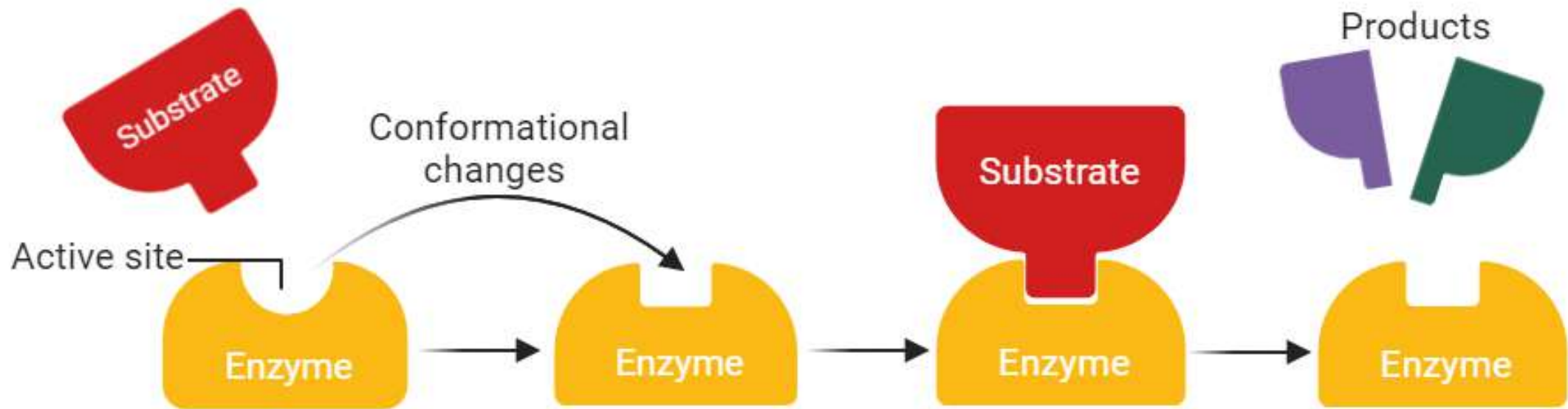
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Επαγόμενη προσαρμογή – Το ενεργό κέντρο αλλάζει σχήμα ώστε να μεγιστοποιηθεί η ισχύς των διαμοριακών δεσμών



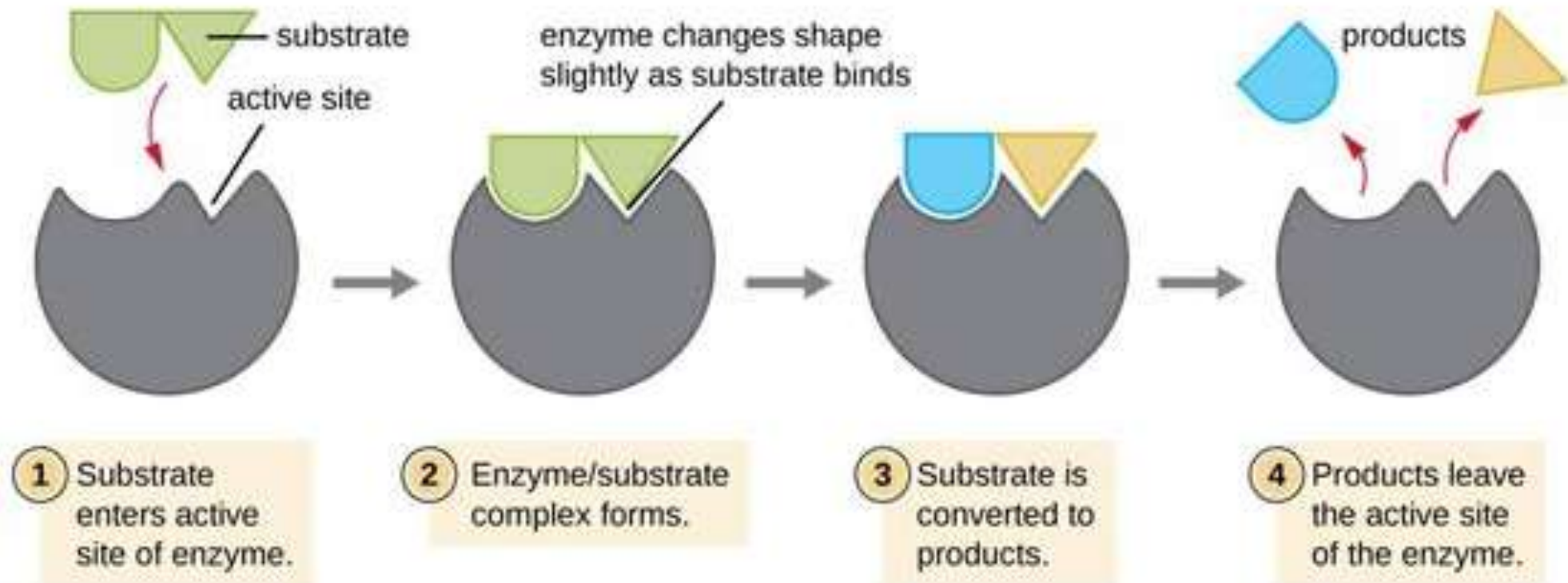
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Επαγόμενη προσαρμογή



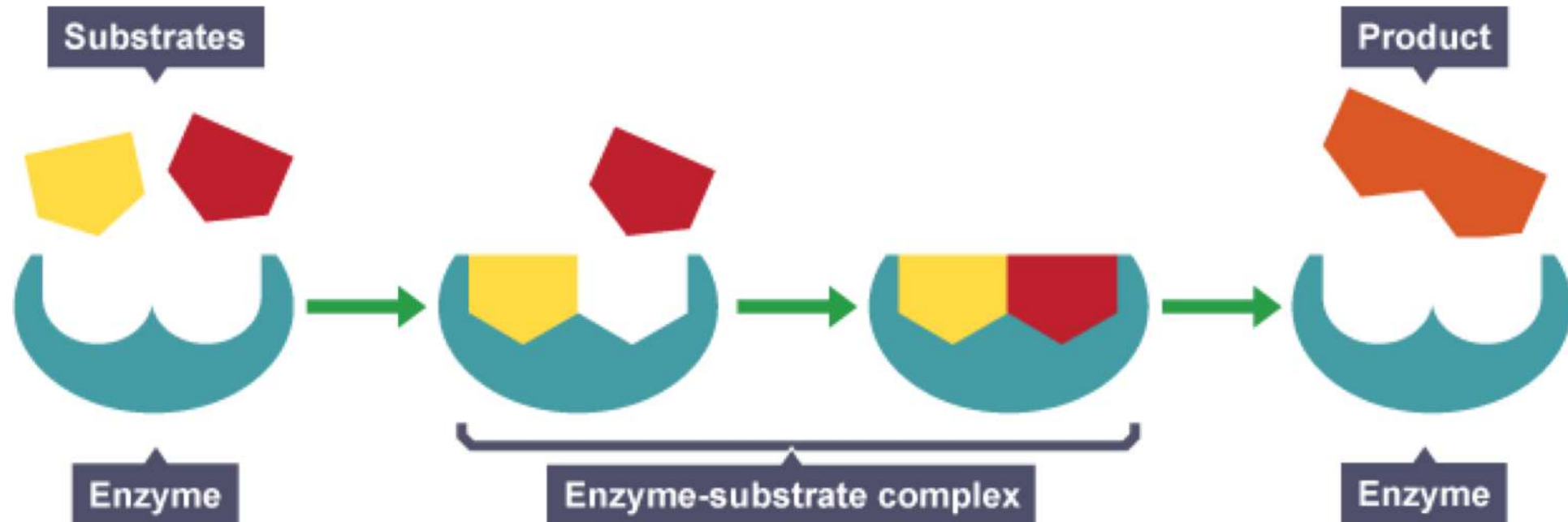
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Επαγόμενη προσαρμογή



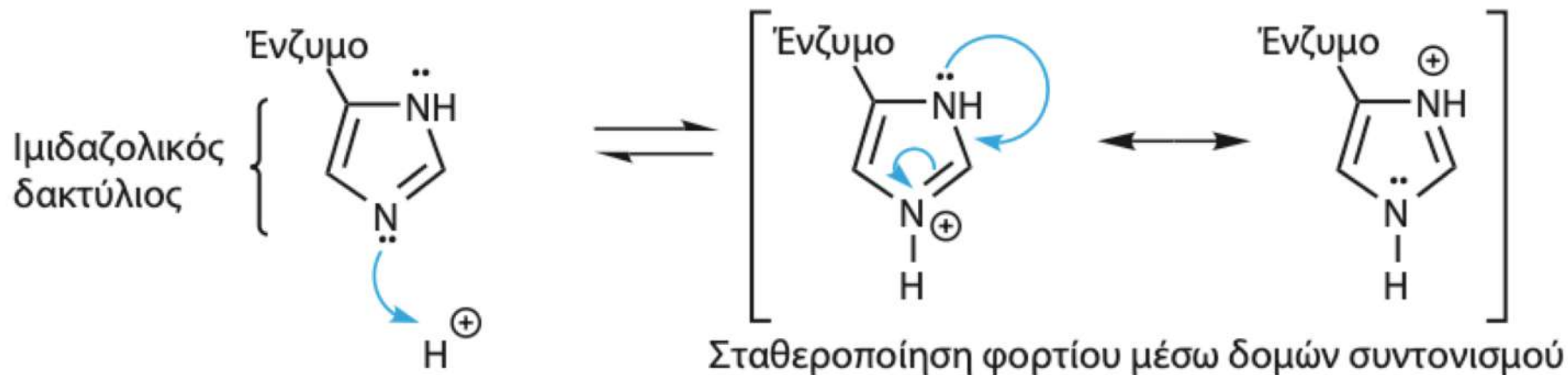
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Επαγόμενη προσαρμογή



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Οξεοβασική κατάλυση



- Η ιστιδίνη (His) συχνά λειτουργεί ως ασθενής βάση (βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ πρωτονιωμένης μορφής του και της ελεύθερης βάσης)
- Μπορεί να δεχτεί και να προσφέρει H^+ κατά την διάρκεια του μηχανισμού αντίδρασης

Ποια άλλα αμινοξέα;

3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Πυρηνόφιλες ομάδες

- Τα αμινοξέα σερίνη και κυστεΐνη

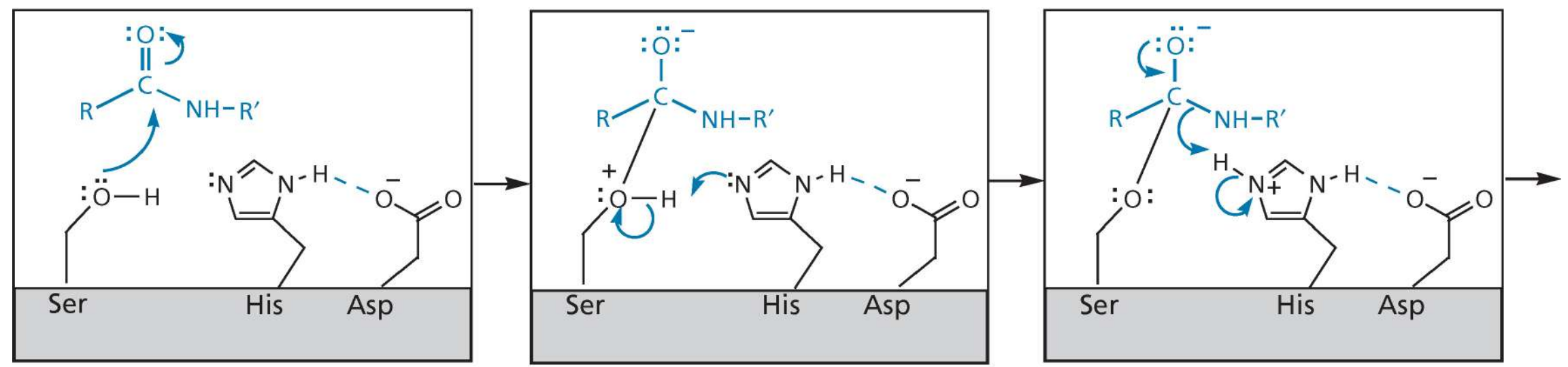
π.χ. Υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών καταλυόμενη από το ένζυμο χυμοθρυψίνη

Ο μηχανισμός περιλαμβάνει...

- Καταλυτική τριάδα από σερίνη, ιστιδίνη και ασπαραγινικού οξέος
- Η σερίνη δρα ως πυρηνόφιλος καταλύτης
- Η ιστιδίνη δρα ως οξεοβασικός καταλύτης
- Η ομάδα του ασπαραγινικού προσανατολίζει την ιστιδίνη

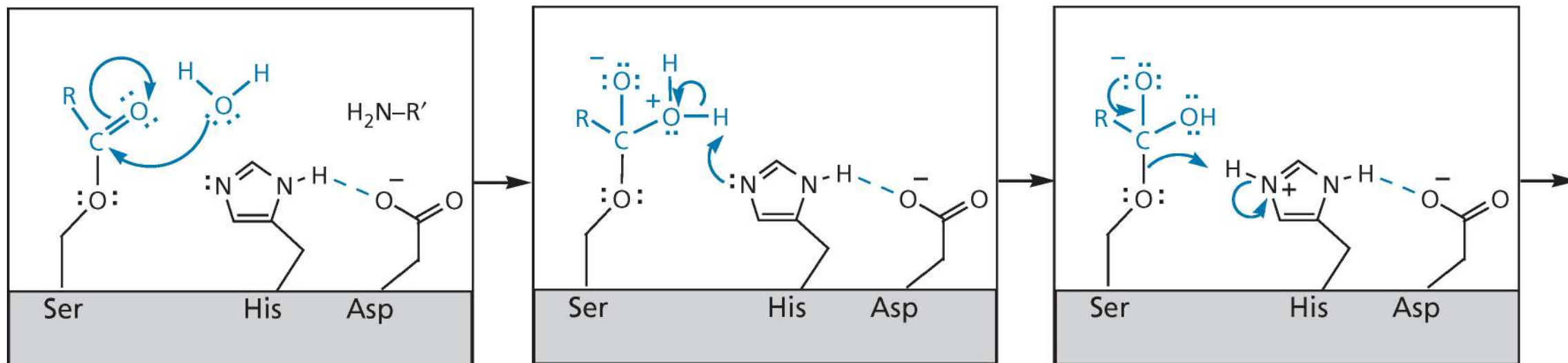
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Μηχανισμός για τη χυμοθρυψίνη



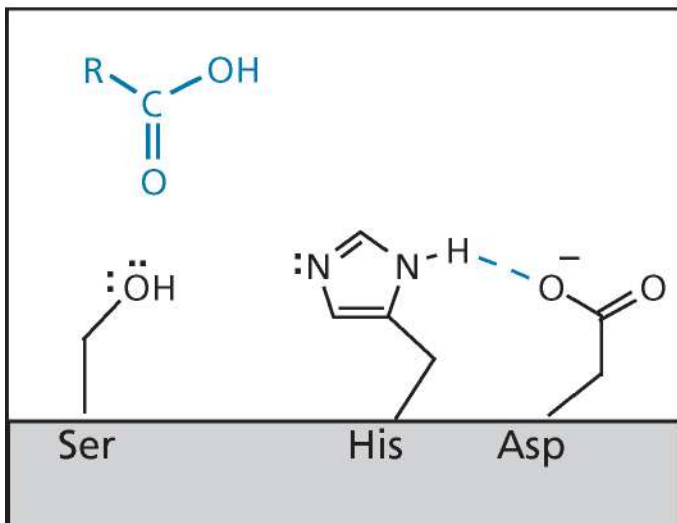
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Μηχανισμός για τη χυμοθρυψίνη



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Μηχανισμός για τη χυμοθρυψίνη



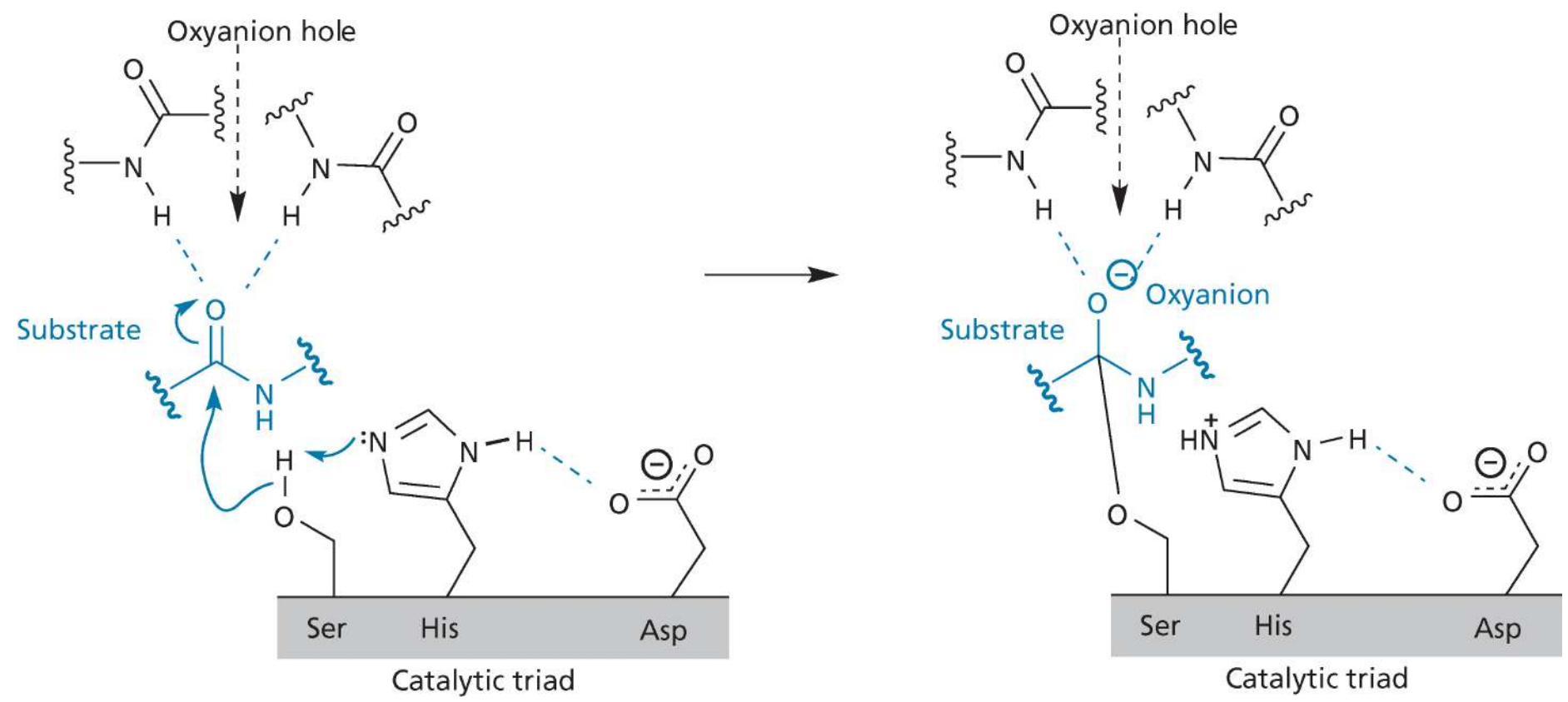
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης – Οπή οξυανιόντος

- Η περιοχή του ενεργού κέντρου είναι κατειλημμένη από το αρνητικά φορτισμένο άτομο οξυγόνου του τετραεδρικού ενδιάμεσου
- Το οξυανιόν σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν οι προσκείμενοι πεπτιδικοί δεσμοί
- Οι αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν τη μεταβατική κατάσταση που οδηγεί στο ενδιάμεσο οξυανιόν και ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης

3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

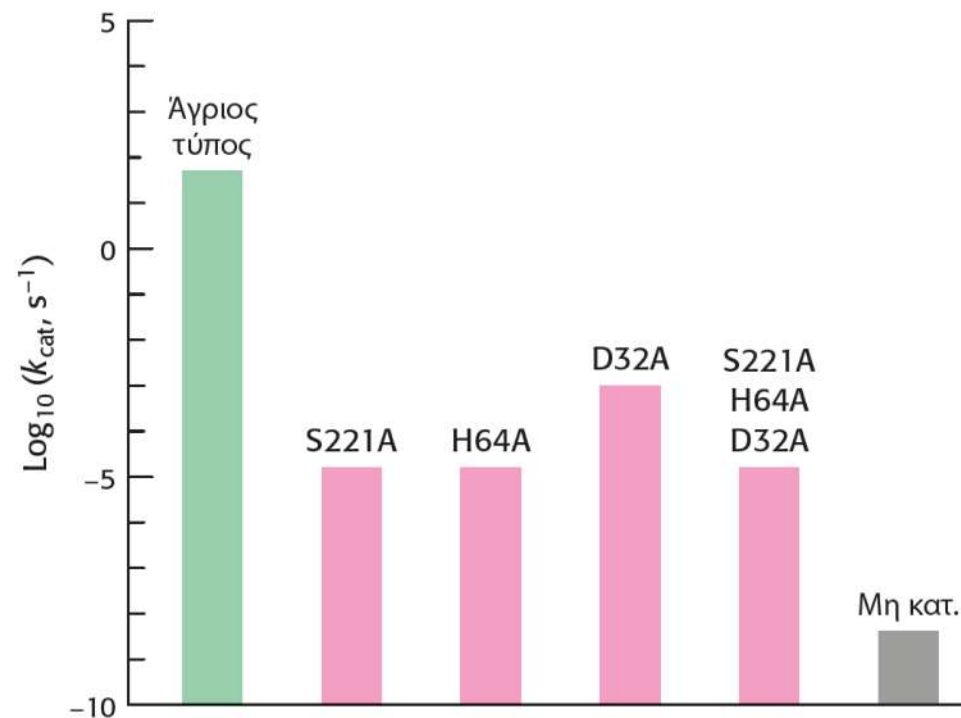
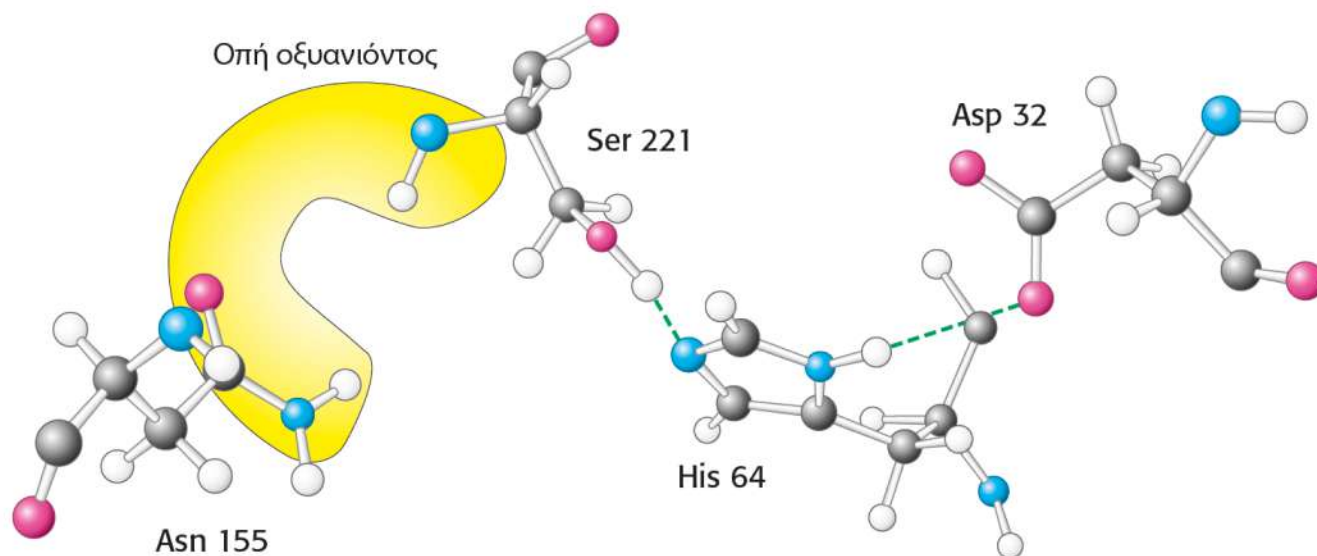
Μηχανισμός για τη χυμοθρυψίνη – Οπή οξυανιόντος



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Η λειτουργία της καταλυτικής τριάδας έχει αναλυθεί με μεταλλαγμένες σε συγκεκριμένη θέση

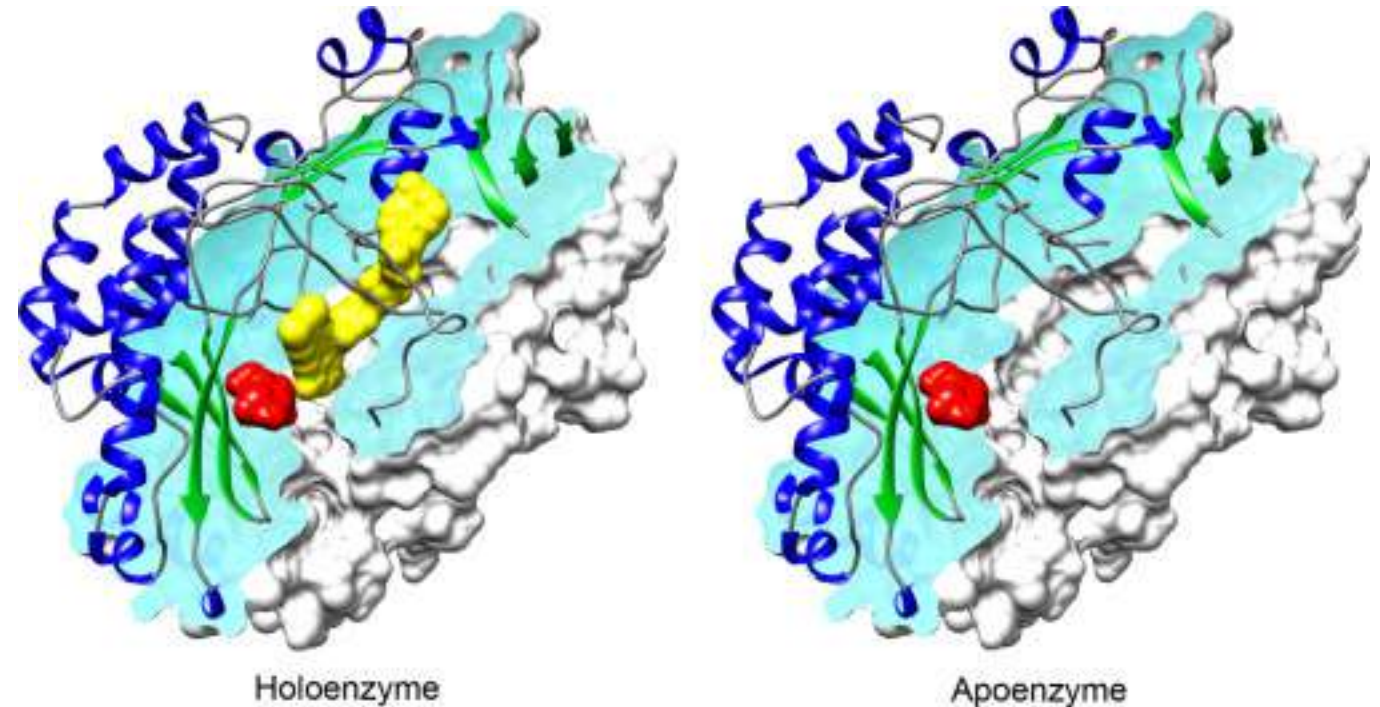
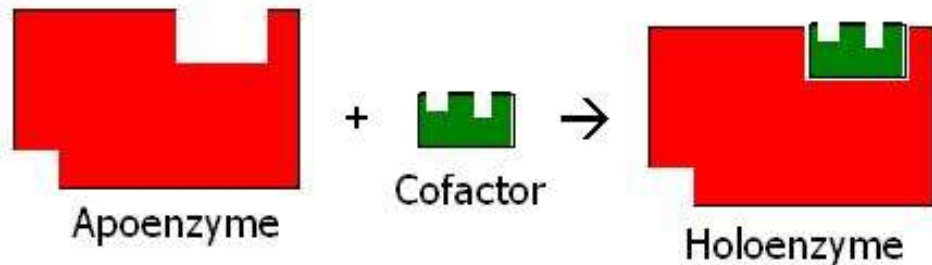
Καταλυτική τριάδα και οπή οξυανιόντος της σουμπιλισίνης



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Πολλά ένζυμα χρειάζονται συμπράγοντες για δραστικότητα

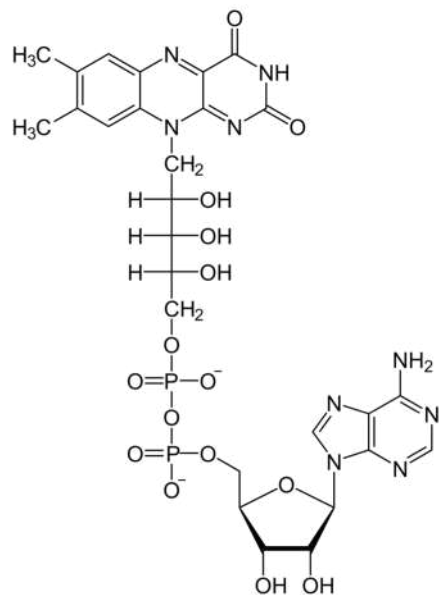
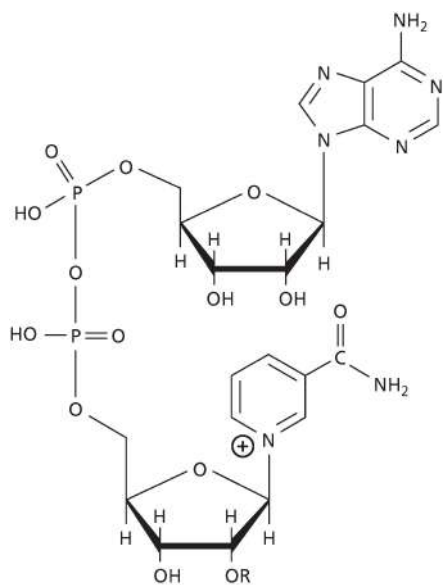
Αποένζυμο + συμπράγοντας = ολοένζυμο



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Οι συμπράγοντες υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες:

- Μέταλλα (π.χ. Zn^{2+})
- Συνένζυμο (μικρά οργανικά μόρια, π.χ. NAD^+)



Συμπράγοντας

Ένζυμο

Συνένζυμο

- Πυροφωσφορική θειαμίνη
- Φλαβινο-αδενινο-νουκλεοτίδιο
- Νικοτιναμιδο-αδενινο-νουκλεοτίδιο
- Φωσφορική πυριδοξάλη
- Συνένζυμο A (CoA)
- Βιοτίνη
- 5'-Δεοξυαδενοσυλο-κοβαλαμίνη
- Τετραϋδροφυλλικό

- Πυροσταφυλική αφυδρογονάση
- Οξειδάση των μονοαμινών
- Γαλακτική αφυδρογονάση
- Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
- Καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA
- Πυροσταφυλική καρβοξυλάση
- Μουτάση του μεθυλομηλονικού
- Συνθάση του θυμιδυλικού

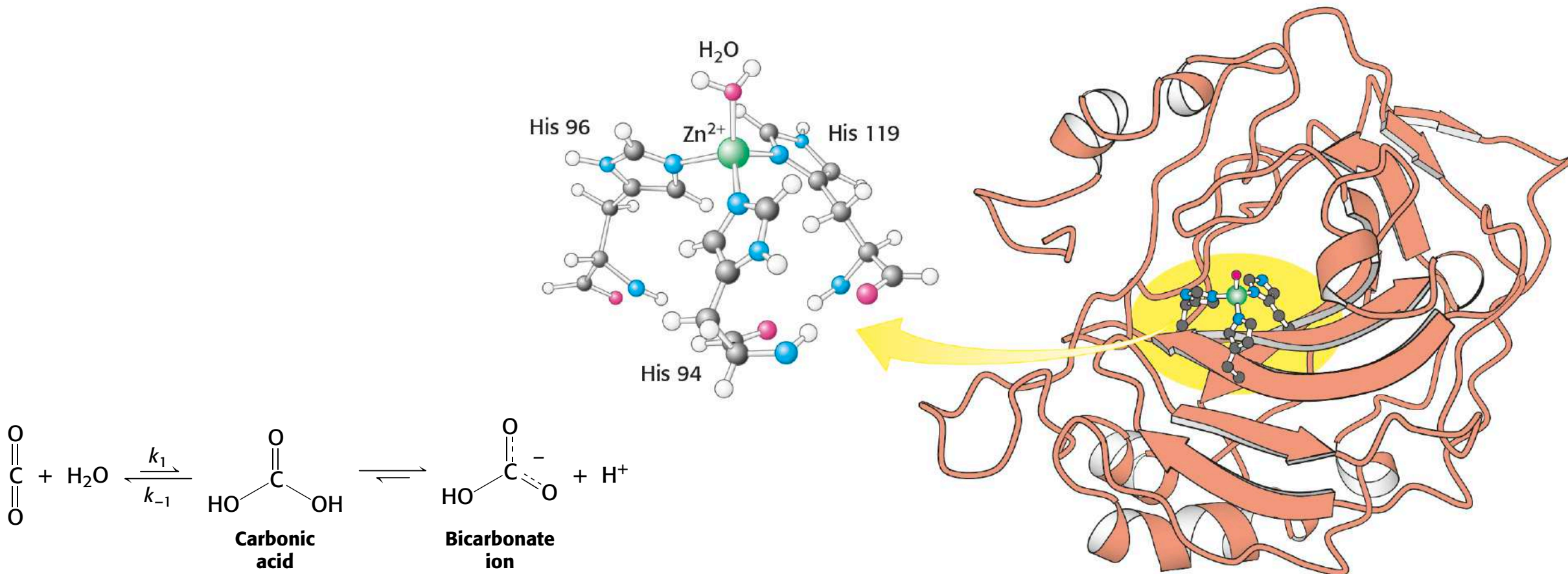
Μέταλλο

- Zn^{2+}
- Zn^{2+}
- Mg^{2+}
- Mg^{2+}
- Ni^{2+}
- Mo
- Se
- Mn^{2+}
- K^+

- Ανθρακική ανυδράση
- Καρβοξυπεπτιδάση
- EcoRV
- Εξοκινάση
- Θυρεάση
- Αναγωγάση του νιτρικού
- Υπεροξειδάση του γλουταθείου
- Δισμουτάση του σουπεροξειδίου
- Καρβοξυλάση του προπιονυλο-CoA

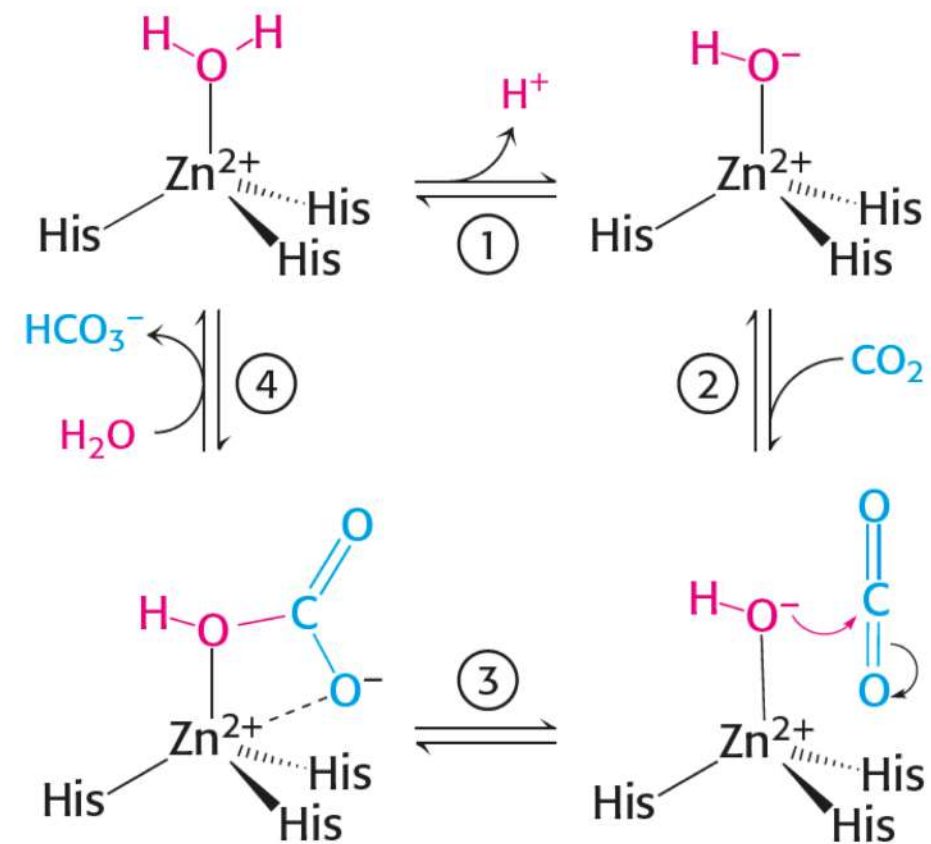
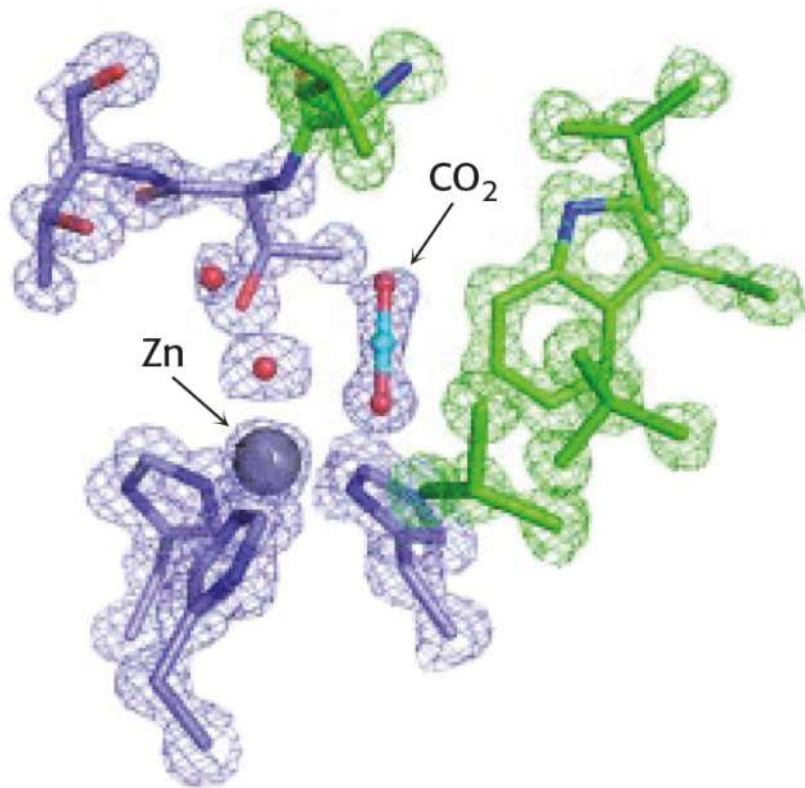
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Η ανθρακική ανυδράση περιέχει ένα προσδεμένο Zn^{2+} απαραίτητο για την καταλυτική δραστηρότητα



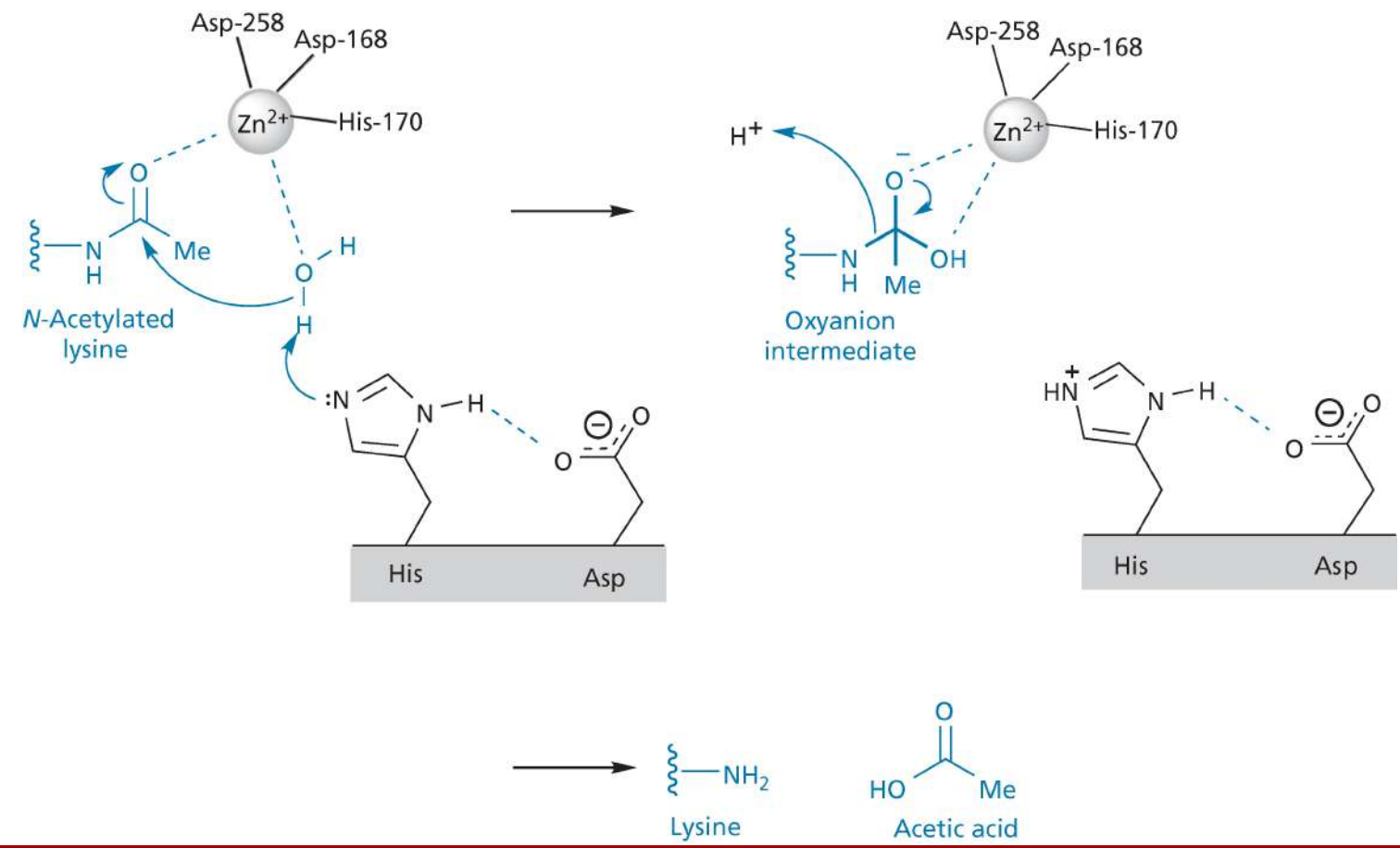
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Θέση πρόσδεσης του CO₂ και μηχανισμός ανθρακικής ανύδρασης



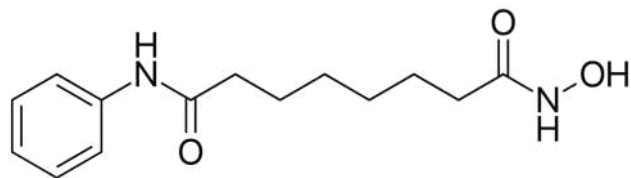
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Ο ρόλος του Zn²⁺ στην HDAC



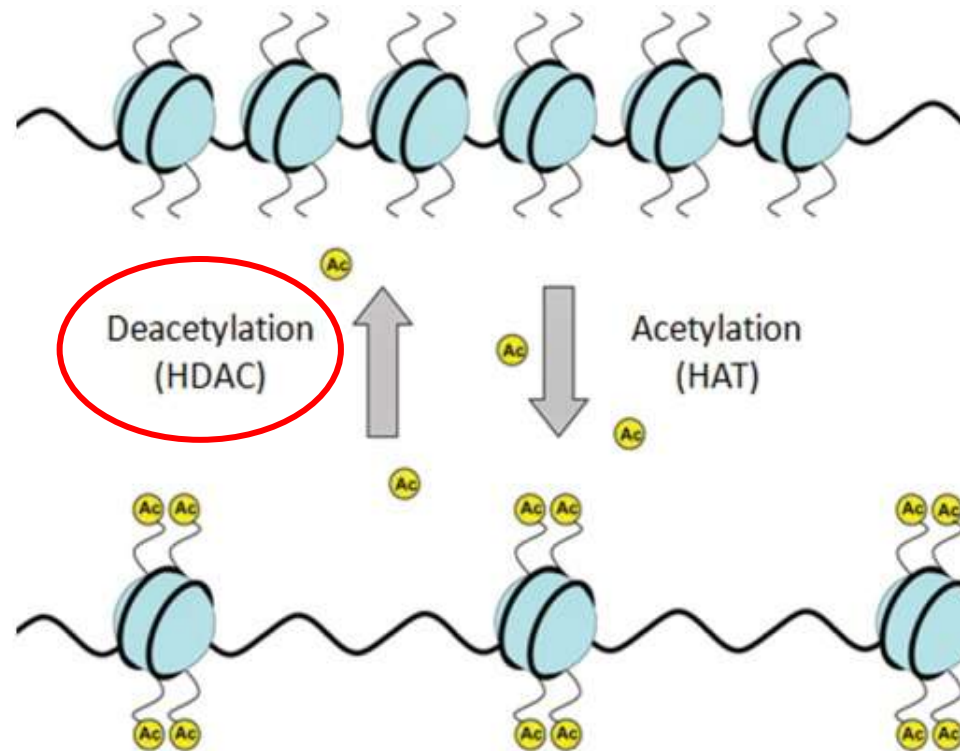
3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Αναστολέας της HDAC – Αντικαρκινικό φάρμακο (Λέμφωμα)



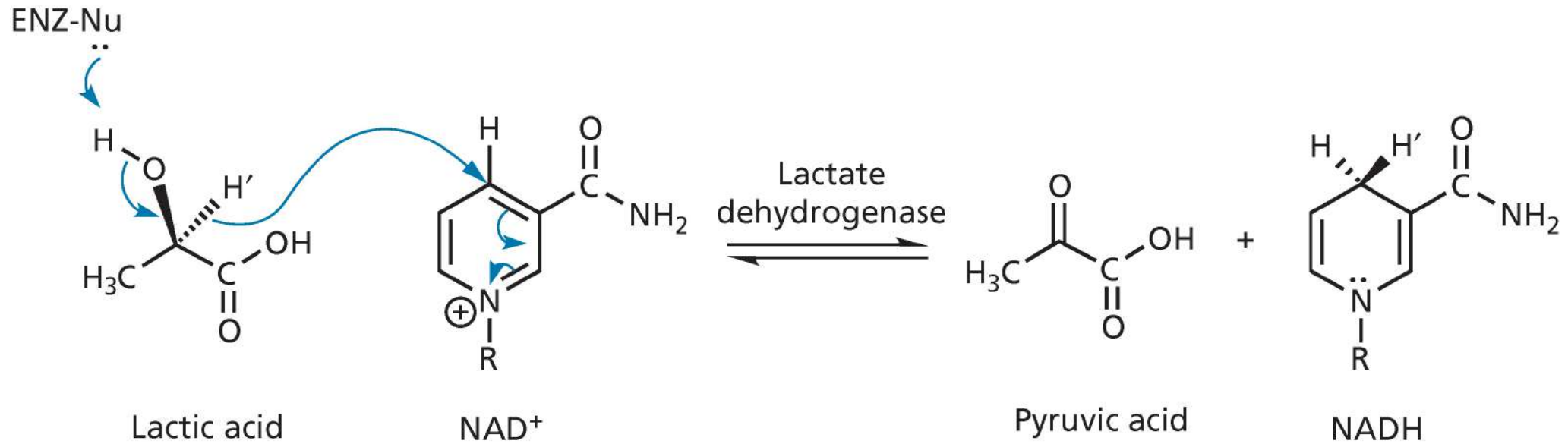
Βορινοστάτη
(vorinostat)

Πως λειτουργεί;



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Το NAD^+ ως συνένζυμο



3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Κατηγοριοποίηση ενζύμων

EC number	Enzyme class	Type of reaction
E.C.1.x.x.x	Oxidoreductases	Oxidations and reductions
E.C.2.x.x.x	Transferases	Group transfer reactions
E.C.3.x.x.x	Hydrolases	Hydrolysis reactions
E.C.4.x.x.x	Lyases	Addition or removal of groups to form double bonds
E.C.5.x.x.x	Isomerases	Isomerizations and intra-molecular group transfers
E.C.6.x.x.x	Ligases	Joining two substrates at the expense of ATP hydrolysis

Note: EC stands for Enzyme Commission, a body set up by the International Union of Biochemistry (as it then was) in 1955.

3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

Η ενζυμική δραστηριότητα ρυθμίζεται με 5 κύριους τρόπους:

1. Αλλοστερικός έλεγχος

- Πρωτεΐνες που περιέχουν ξεχωριστές ρυθμιστικές θέσεις και πολλαπλές λειτουργικές θέσεις
- Η πρόσδεση μικρών σηματοδοτικών μορίων σε θέσεις ρύθμισης ελέγχει την δραστηριότητα
- Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα της συνεργειακότητας
- π.χ. Ασπαραγινική τρανσκαρβαμοϋλάση (ΑΤΚάση)

2. Πολλαπλές μορφές ενζύμου

- Ισοένζυμα, είναι ομόλογα ένζυμα ενός οργανισμού τα οποία καταλύουν την ίδια αντίδραση
- Διαφέρουν ελαφρώς στην δομή και πιο πολύ στις τιμές K_M και V_{max} , καθώς και στις ρυθμιστικές ιδιότητες

3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

3. Αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση

- Οι καταλυτικές ιδιότητες πολλών ενζύμων μεταβάλλονται αξιοσημείωτα από την ομοιοπολική πρόσδεση μιας τροποποιητικής ομάδας, συνήθως φωσφορικής
- Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες (χρησιμοποιούν ATP)

4. Πρωτεολυτική ενεργοποίηση

- Μη αντιστρεπτή μετατροπή ενός ανενεργού ενζύμου σε ενεργό
- Τα ένζυμα ενεργοποιούνται με υδρόλυση μερικών ή ακόμα και ενός πεπτιδικού δεσμού ανενεργών προδρόμων που ονομάζονται ζυμογόνα ή προένζυμα



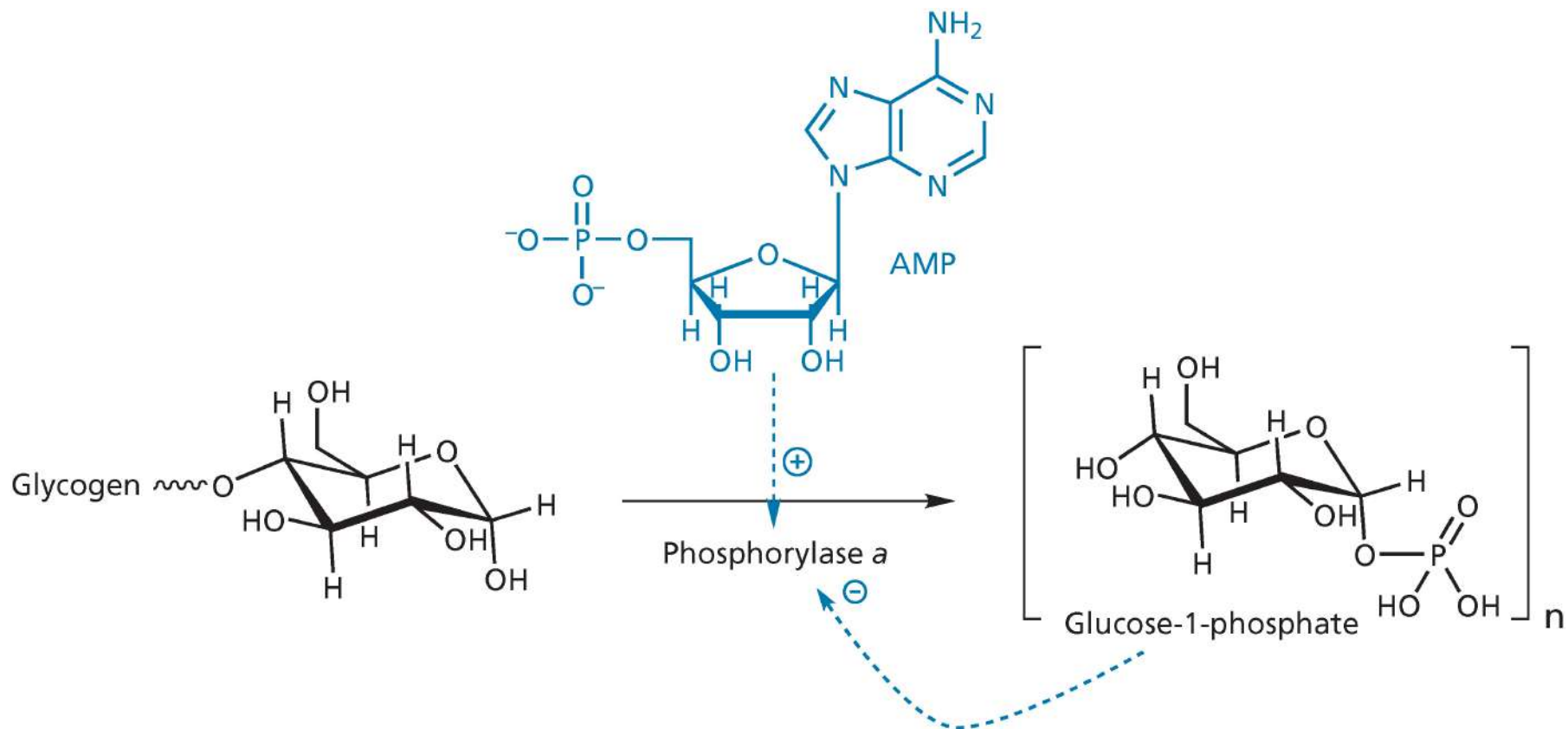
3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

5. Έλεγχος της ποσότητας του ενζύμου

- Η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να ρυθμιστεί με την ποσότητα του ενζύμου που είναι παρούσα
- Ο τρόπος ρύθμισης λαμβάνει χώρα σε επίπεδο μεταγραφής

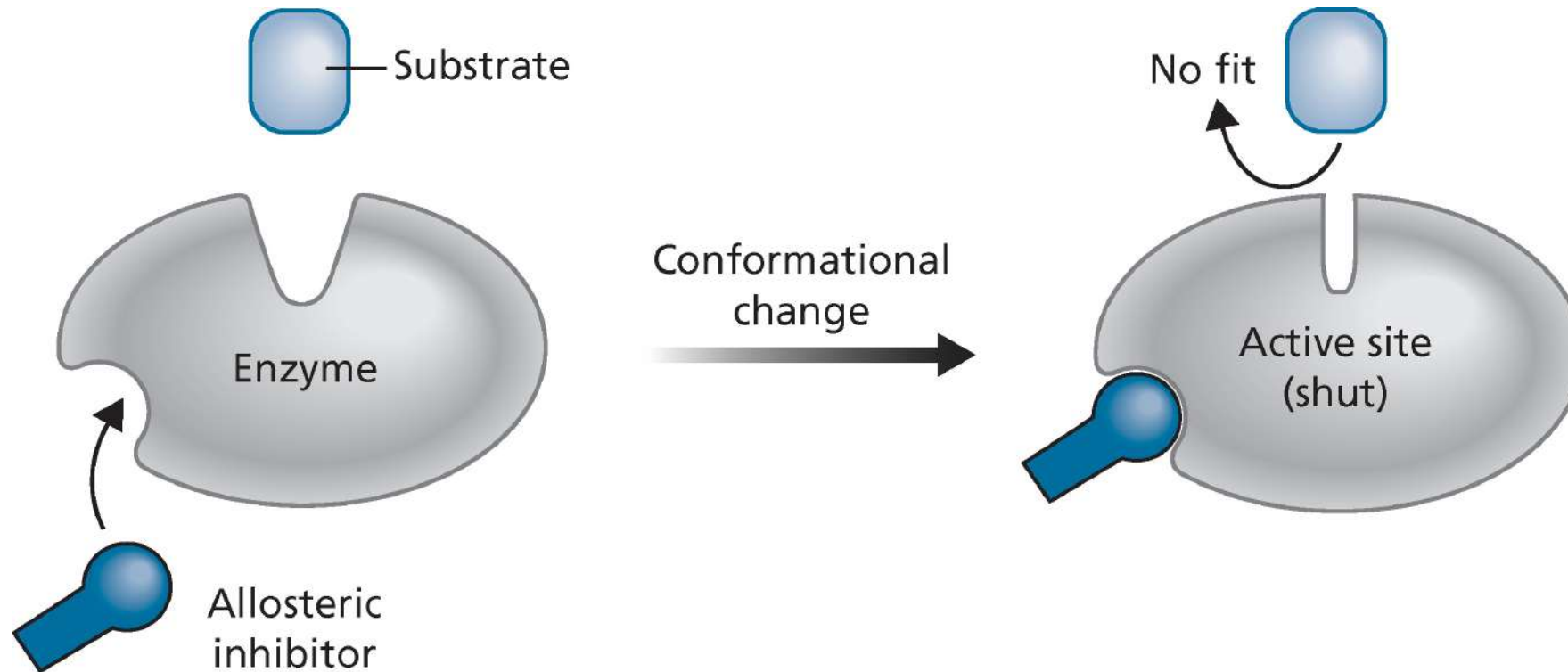
3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

Εσωτερικός έλεγχος της καταλυτικής ενεργότητας της φωσφορυλάσης α



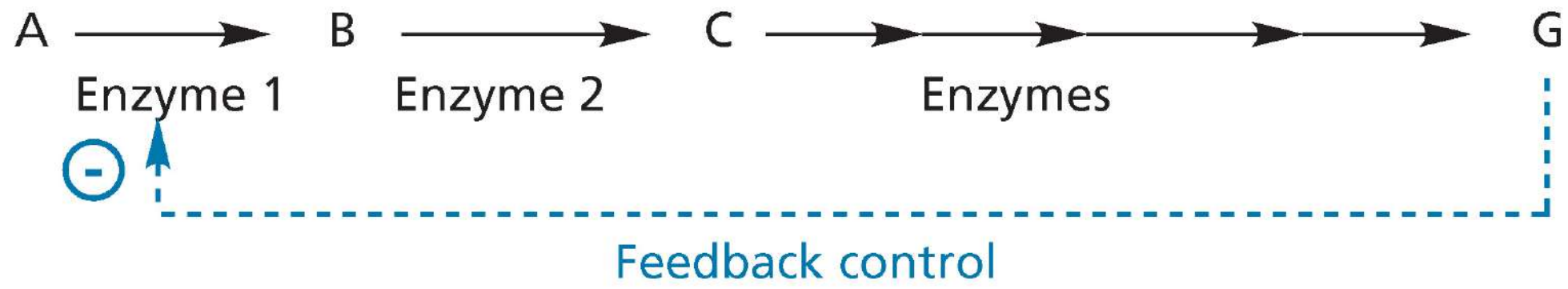
3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

Αλλοστερική αναστολή ενός ενζύμου



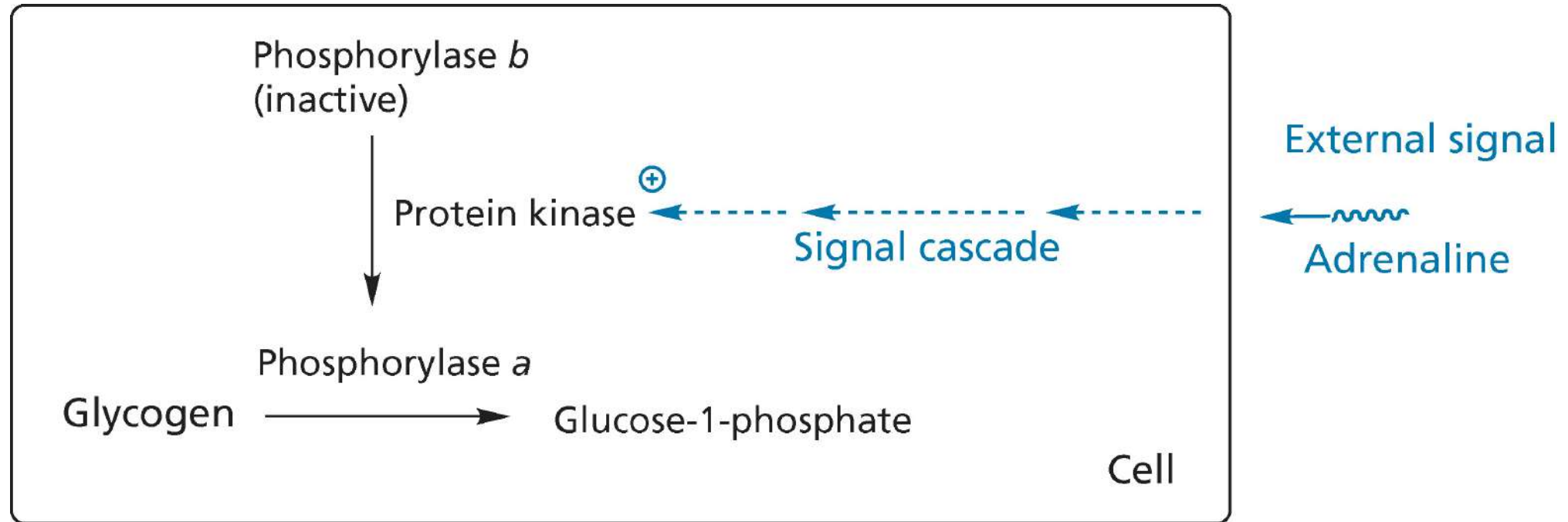
3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

Έλεγχος μέσω ανατροφοδότησης του ενζύμου 1



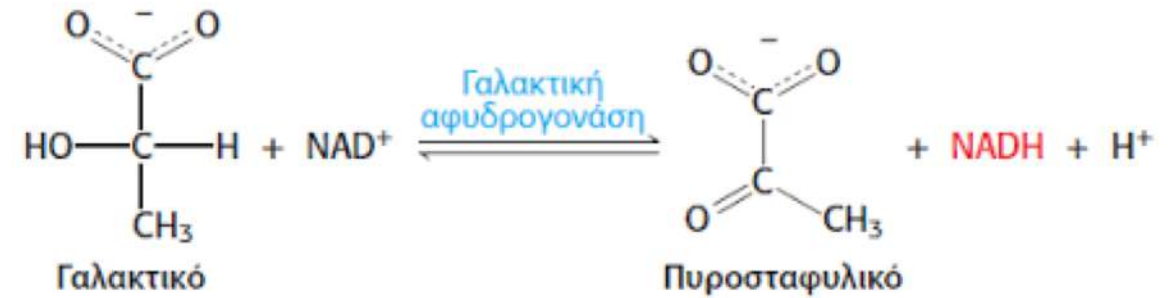
3.6 Ρύθμιση των ενζύμων

Εξωτερικός έλεγχος της φωσφορυλάσης α

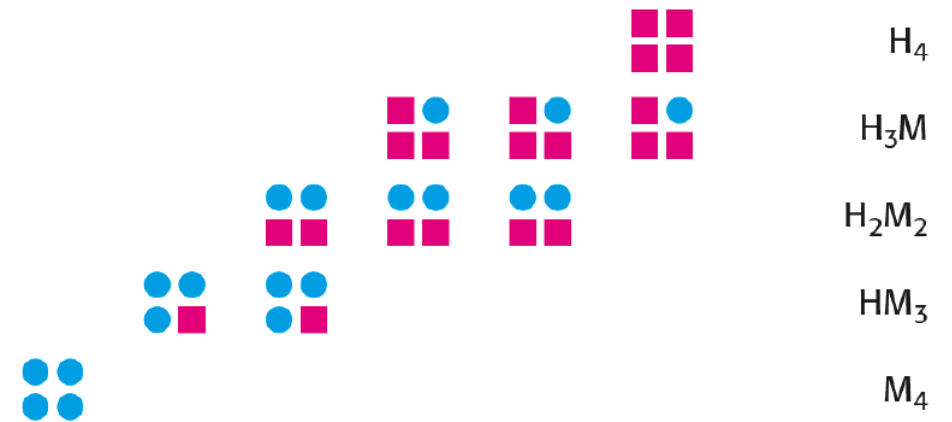
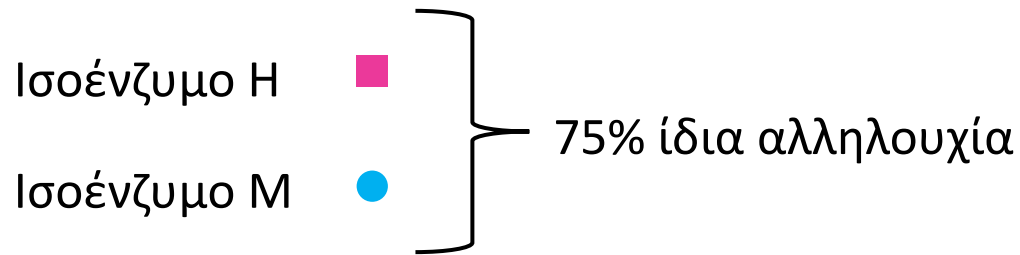


3.7 Ισοένζυμα

Τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)



Ο άνθρωπος έχει δυο ισοενζυμικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες



Κάθε λειτουργικό ένζυμο είναι **τετραμερές**

- Το H_4 (που βρέθηκε στην καρδιά) έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα από ότι έχει το M_4
- Υψηλά επίπεδα πυροσταφυλικού αναστέλλουν αλλοστερικά το H_4 αλλά όχι το M_4

3.7 Ισοένζυμα

Τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Η ποσότητα των ισοενζύμων της LDH ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό

(B)

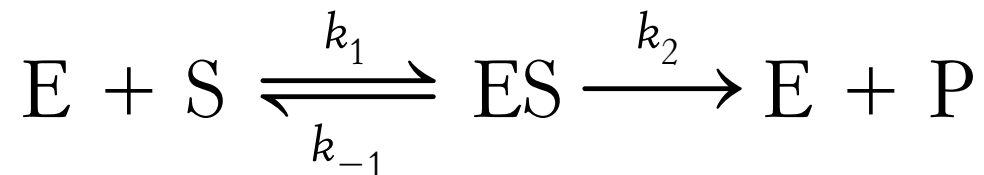
	Καρδιά	Νεφρός	Ερυθρο- κύτταρα	Εγκέφαλος	Λευκο- κύτταρα	Μυς	Ήπαρ
H ₄	████	████	████	████	████	—	—
H ₃ M	████	████	████	████	████	—	—
H ₂ M ₂	—	████	—	████	████	████	—
HM ₃	—	—	—	—	████	—	—
M ₄	—	—	—	—	—	████	████

Η εμφάνιση μερικών ισοενζύμων στο αίμα είναι σημάδι καταστροφής του ιστού

π.χ αύξηση στα επίπεδα του H₄ στον ορό σε σχέση με το H₃M είναι ένδειξη ότι ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου ή καρδιακή προσβολή έχει καταστρέψει μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, οδηγώντας στην απελευθέρωση κυτταρικών ουσιών

3.8 Κινητική ενζύμων

Η υπόθεση της σταθερής κατάστασης διευκολύνει την περιγραφή της ενζυμικής κινητικής



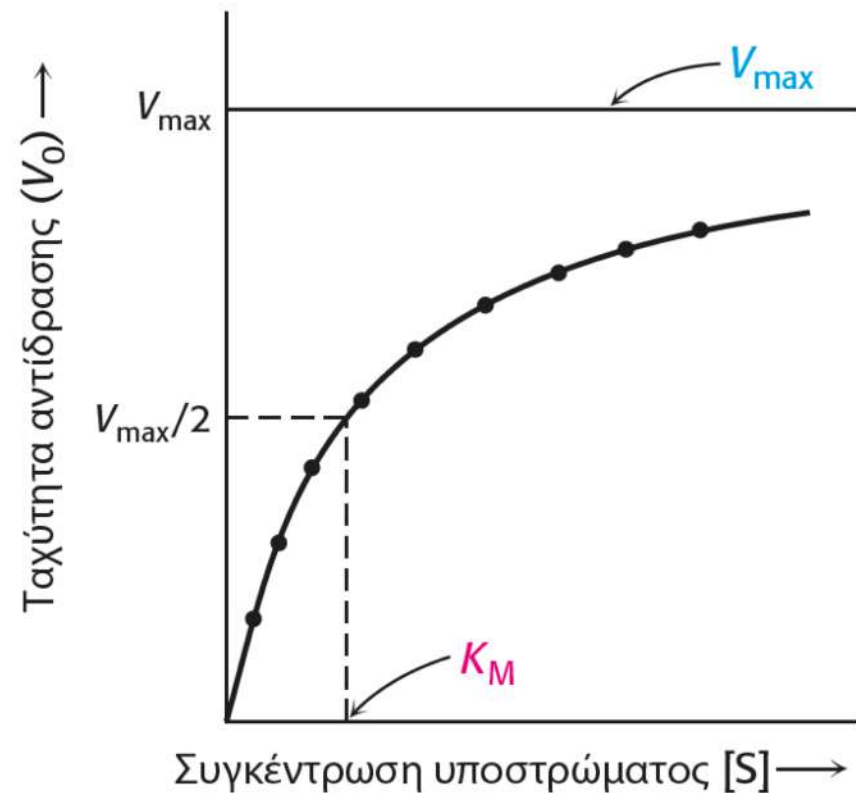
εξίσωση Michaelis-Menten

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

Η K_M είναι ίση με $[S]$ όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι το ήμισυ της μέγιστης (V_{\max})

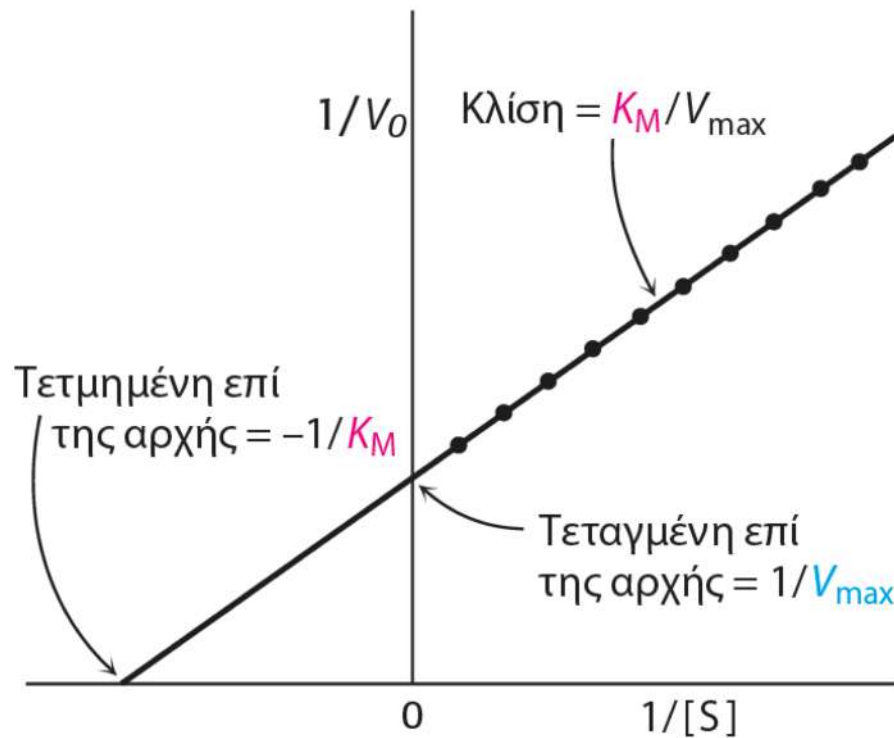
σταθερά Michaelis

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



3.8 Κινητική ενζύμων

Οι τιμές K_M και V_{max} προσδιορίζονται με αρκετούς τρόπους

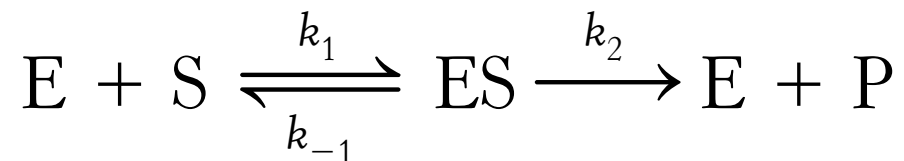


εξίσωση Lineweaver-Burk

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

3.8 Κινητική ενζύμων

Οι τιμές K_M και V_{max} είναι σημαντικά χαρακτηριστικά του ενζύμου



- Η K_M παρέχει ένα μέτρο της συγκέντρωσης του S που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί σημαντικά η κατάλυση
- Η V_{max} αποκαλύπτει τον αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου (αριθμός μορίων S που μετατρέπονται σε P ανά μονάδα χρόνου από ένα E)
- Ο αριθμός μετατροπής ισούται με την σταθερά ταχύτητας k_2 ή αλλιώς k_{cat}
- Ο λόγος k_{cat}/K_M είναι ένα μέτρο της καταλυτικής αποτελεσματικότητας