

# Ένζυμα: Δομή και λειτουργία

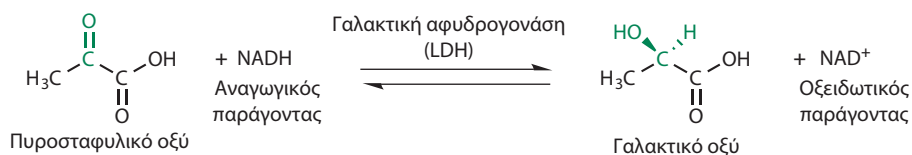
Σε αυτό το κεφάλαιο θα συζητήσουμε για τη δομή και τη λειτουργία των ενζύμων. Η δράση των φαρμάκων στα ένζυμα θα αναλυθεί στο Κεφάλαιο 7, καθώς και σε άλλα κεφάλαια του βιβλίου.

## 3.1 Τα ένζυμα ως καταλύτες

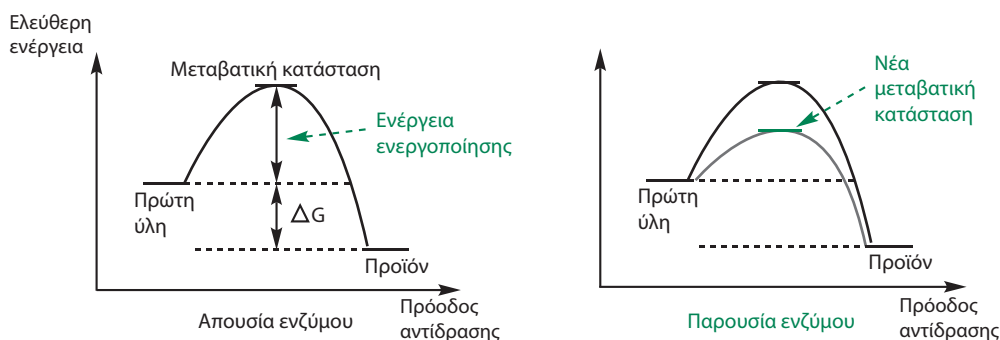
Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες οι οποίες δρουν ως καταλύτες του σώματος. Αποτελούν δηλαδή παράγοντες που επιταχύνουν μια χημική αντίδραση χωρίς να αναλώνονται οι ίδιοι. Χωρίς τα ένζυμα, οι χημικές αντιδράσεις του κυττάρου είτε θα ήταν πολύ αργές είτε δεν θα πραγματοποιούνταν καθόλου. Ένα παράδειγμα αντίδρασης καταλυόμενης από ένζυμο είναι η αναγωγή του **πυροσταφυλικού οξέος** (pyruvic acid) σε **γαλακτικό οξύ** (lactic acid), η οποία πραγματοποιείται όταν οι μύες ασκούνται εντατικά, ενώ η κατάλυση γίνεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται **γαλακτική αφυδρογονάση** (lactate dehydrogenase) (Σχήμα 3.1).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντίδραση παρουσιάζεται σε κατάσταση ισορροπίας. Συνεπώς, είναι σωστότερο να περιγράψουμε ένα ένζυμο ως παράγοντα ο οποίος επιταχύνει την προσέγγιση προς την ισορροπία, καθώς το ένζυμο επιταχύνει το ίδιο αποτελεσματικά τις αντιδράσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις. Οι τελικές συγκεντρώσεις ισορροπίας των πρώτων υλών και των προϊόντων δεν επηρεάζονται από την παρουσία ενός ενζύμου.

Πώς επηρεάζουν όμως τα ένζυμα την ταχύτητα μιας αντίδρασης χωρίς να επηρεάσουν την ισορροπία της; Η απάντηση έγκειται στην ύπαρξη μιας ενεργειακά υψηλής **μεταβατικής κατάστασης** (transition state) που πρέπει να διαμορφωθεί προτού οι πρώτες ύλες [το **υπόστρωμα** (substrate)] μετατραπούν σε προϊόν. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ της μεταβατικής κατάστασης και του υποστρώματος ονομάζεται **ενέργεια ενεργοποίησης** (activation energy) και το μέγεθός της είναι αυτό που θα καθορίσει την ταχύτητα μιας αντίδρασης και όχι η διαφορά ενέργειας μεταξύ του υποστρώματος και του προϊόντος (Σχήμα 3.2). Το ένζυμο μειώνει την ενέργεια ενεργο-



ΣΧΗΜΑ 3.1 Αντίδραση καταλυόμενη από τη γαλακτική αφυδρογονάση.



ΣΧΗΜΑ 3.2 Διαγράμματα που παρουσιάζουν τη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης μιας αντίδρασης από ένα ένζυμο.

ποίησης μέσω της βοήθειας που παρέχει στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης. Οι ενέργειες του υποστρώματος και του προϊόντος παραμένουν ανεπηρέαστες, συνεπώς η αναλογία του υποστρώματος προς το προϊόν στην κατάσταση ισορροπίας παραμένει επίσης ανεπηρέαστη. Η ενέργεια μπορεί να συσχετιστεί με τις σταθερές ταχύτητας και ισορροπίας μέσω των παρακάτω εξισώσεων:

$$\text{Διαφορά ενέργειας} = \Delta G = -RT \ln K$$

όπου  $K$  η σταθερά ισορροπίας ( $= [\text{προϊόντα}]/[\text{αντιδρώντα}]$ ),  $R$  η σταθερά ιδανικών αερίων ( $= 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) και  $T$  η θερμοκρασία.

$$\text{Σταθερά ταχύτητας} = k = Ae^{-E/RT}$$

όπου  $E$  η ενέργεια ενεργοποίησης και  $A$  ο παράγοντας συχνότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερά ταχύτητας  $k$  δεν εξαρτάται από τη σταθερά ισορροπίας  $K$ .

Μέχρι στιγμής, έχουμε αναφέρει ότι τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις, αλλά δεν έχουμε εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο το επιτυγχάνουν.

## 3.2 Πώς τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις;

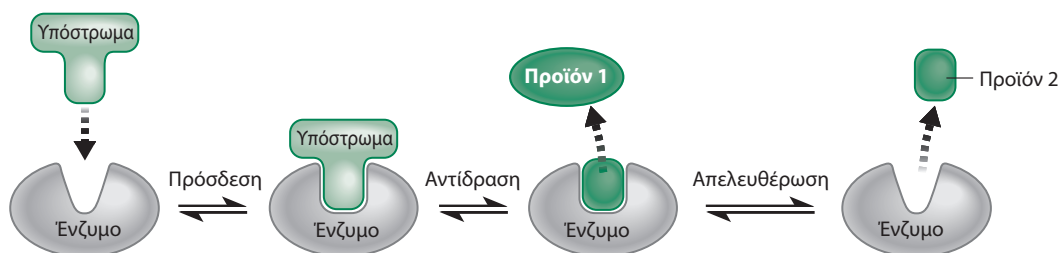
Οι παράγοντες που εμπλέκονται στην ενζυμική κατάλυση συνοψίζονται παρακάτω και θα συζητηθούν λεπτομερώς στις Ενότητες 3.2-3.5.

- Τα ένζυμα παρέχουν την επιφάνεια αντίδρασης και ένα κατάλληλο περιβάλλον.
- Τα ένζυμα φέρνουν τα αντιδρώντα κοντά μεταξύ τους και τα τοποθετούν με τον κατάλληλο τρόπο ώστε να αποκτήσουν με ευκολία τις διαμορφώσεις μεταβατικής κατάστασης.
- Τα ένζυμα εξασθενούν τους δεσμούς στα αντιδρώντα.
- Τα ένζυμα μπορεί να συμμετέχουν στον μηχανισμό.
- Τα ένζυμα δημιουργούν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με τη μεταβατική κατάσταση σε σχέση με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα.

Ένα ένζυμο καταλύει μια αντίδραση παρέχοντας την επιφάνεια πάνω στην οποία ένα υπόστρωμα μπορεί να προσδεθεί, οδηγώντας στην εξασθένιση των δεσμών υψηλής ενέργειας. Επιπλέον, η πρόσδεση διατηρεί το υπόστρωμα στον σωστό προσανατολισμό, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται υποβοηθούμενη από το ένζυμο, δίνοντας προϊόν, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνεται (Σχήμα 3.3). Αξίζει να σημειωθεί ξανά πως η διαδικασία είναι αντιστρέψιμη. Τα ένζυμα μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις. Το τελικό μείγμα της ισορροπίας ωστόσο θα παραμείνει ίδιο, ανεξάρτητα από το εάν παρέχεται στο ένζυμο υπόστρωμα ή προϊόν. Τα υποστρώματα προσδένονται και αντιδρούν σε συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου, η οποία ονομάζεται **ενεργό κέντρο** (active site) και αποτελεί τμήμα της συνολικής δομής της πρωτεΐνης.

## 3.3 Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου

Το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου (Σχήμα 3.4) πρέπει να βρίσκεται πάνω ή κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, ώστε να μπορεί ένα υπόστρωμα να το φτάσει. Ωστόσο, το κέντρο θα μπορούσε να βρίσκεται σε αύλακα ή κοιλότητα,



ΣΧΗΜΑ 3.3 Η διαδικασία της ενζυμικής κατάλυσης.

επιτρέποντας στο υπόστρωμα να βυθιστεί στο εσωτερικό του ενζύμου. Φυσιολογικά, το ενεργό κέντρο έχει περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα απ' ό,τι η επιφάνεια του ενζύμου, παρέχοντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για πολλές αντιδράσεις, οι οποίες θα ήταν δύσκολο ή αδύνατο να πραγματοποιηθούν σε υδατικό περιβάλλον.

Λόγω της αναδίπλωσης του ενζύμου, τα κατάλοιπα αμινοξέων που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο μπορεί να είναι απομακρυσμένα στην πρωτοταγή δομή. Αρκετά αμινοξέα στο ενεργό κέντρο παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ενζύμου, και αυτό μπορεί να αποδειχθεί συγκρίνοντας τις πρωτοταγείς δομές των ίδιων ενζύμων από διαφορετικούς οργανισμούς. Η πρωτοταγής δομή διαφέρει από είδος σε είδος, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων που έγιναν σε βάθος εκατομμυρίων ετών, ενώ η μεταβλητότητα είναι ανάλογη με την εξελικτική απόσταση μεταξύ των οργανισμών. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα αμινοξέα τα οποία παραμένουν σταθερά, ανεξαρτήτως της προέλευσης του ενζύμου. Αυτά είναι αμινοξέα καθοριστικά για τη λειτουργία του ενζύμου και συνήθως βρίσκονται στο ενεργό κέντρο. Εάν ένα από αυτά τα αμινοξέα άλλαζε μέσω μετάλλαξης, τότε το ένζυμο θα μπορούσε να χάσει τη λειτουργικότητά του και το κύτταρο που περιέχει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη θα είχε μειωμένες πιθανότητες επιβίωσης. Έτσι, η μετάλλαξη δεν θα διατηρούνταν. Μοναδική εξαίρεση θα αποτελούσε μια μετάλλαξη σε ένα αμινοξύ η οποία θα οδηγούσε σε παρόμοια ενζυμική δράση ή θα βελτίωνε την πρόσδεση ενός υποστρώματος σε αυτό. Η σταθερότητα των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο μπορεί να βοηθήσει ορισμένες φορές να προσδιοριστούν τα αμινοξέα που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο, εάν αυτό δεν είναι ήδη γνωστό.

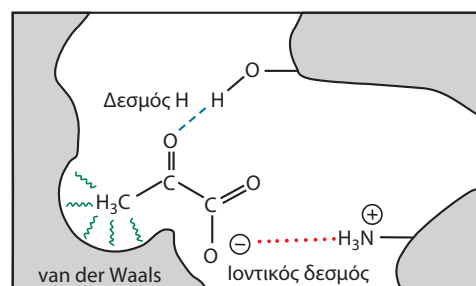
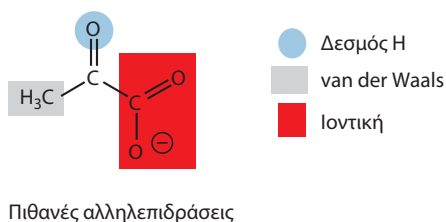
Τα αμινοξέα που βρίσκονται σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να διαδραματίζουν έναν από τους δύο παρακάτω ρόλους:

- Πρόσδεση, όπου το κατάλοιπο αμινοξέος εμπλέκεται στην πρόσδεση του υποστρώματος ή του συμπαραγόμενου στο ενεργό κέντρο.
- Κατάλυση, όπου το αμινοξύ εμπλέκεται στον μηχανισμό της αντίδρασης.

### 3.4 Πρόσδεση υποστρώματος σε ενεργό κέντρο

Οι αλληλεπιδράσεις με τις οποίες ένα υπόστρωμα προσδένεται στο ενεργό κέντρο περιλαμβάνουν ιοντικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και ιόντος-διπόλου, όπως επίσης και van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Ενότητα 1.3). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης είναι ίδιες με τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις που ευθύνονται για την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, αλλά η σχετική σημασία τους διαφέρει. Οι ιοντικοί δεσμοί παίζουν σχετικά μικρό ρόλο στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών σε σχέση με τους δεσμούς υδρογόνου ή τις αλληλεπιδράσεις van der Waals, αλλά μπορεί να έχουν κρίσιμο ρόλο στην πρόσδεση ενός υποστρώματος στο ενεργό κέντρο.

Καθώς οι διαμοριακές δυνάμεις συμμετέχουν στην πρόσδεση ενός υποστρώματος, είναι δυνατό, εξετάζοντας τη δομή του υποστρώματος, να εικάσουμε ποιες είναι οι πιθανές αλληλεπιδράσεις του με το ενεργό κέντρο. Ως παράδειγμα, ας αναλογιστούμε το **πυροσταφυλικό οξύ**, το οποίο είναι υπόστρωμα της **γαλακτικής αφυδρογονάσης** (Σχήμα 3.5).



**ΣΧΗΜΑ 3.5** Αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης μεταξύ πυροσταφυλικού οξέος και γαλακτικής αφυδρογονάσης.

Εάν παρατηρήσουμε τη δομή του πυροσταφυλικού οξέος, μπορούμε να προτείνουμε τρεις πιθανές αλληλεπιδράσεις με τις οποίες αυτό θα μπορούσε να προσδένεται στο ενεργό κέντρο: μια ιοντική αλληλεπίδραση μέσω της ιοντισμένης καρβοξυλομάδας, έναν δεσμό υδρογόνου μέσω του οξυγόνου της κετόνης και μια αλληλεπίδραση van der Waals μέσω της μεθυλομάδας. Εάν η υπόθεση αυτή είναι σωστή, τότε στο ενεργό κέντρο θα πρέπει να υπάρχουν **περιοχές πρόσδεσης** (binding regions) οι οποίες να περιέχουν κατάλληλα αμινοξέα που μπορούν να συμμετέχουν σε αυτές τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (κατάλοιπα λυσίνης, σερίνης και φαινυλαλανίνης θα ήταν κατάλληλα για την κάθε αλληλεπίδραση αντίστοιχα). Η γνώση του τρόπου με τον οποίο ένα υπόστρωμα προσδένεται σε ένα ενεργό κέντρο είναι πολύτιμη για τον σχεδιασμό φαρμάκων τα οποία στοχεύουν συγκεκριμένα ένζυμα (Κεφάλαιο 7).

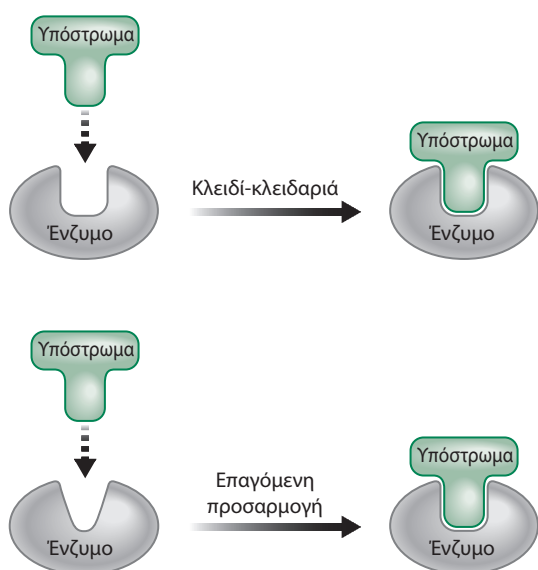
### 3.5 Ο καταλυτικός ρόλος των ενζύμων

Σε αυτό το σημείο θα αναλυθούν οι μηχανισμοί των ενζύμων και ο τρόπος με τον οποίο αυτά καταλύουν αντιδράσεις. Γενικά, τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις παρέχοντας αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης, οξεοβασική κατάλυση, πυρηνόφιλες ομάδες και συμπαραγόντες.

#### 3.5.1 Αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης

Στο παρελθόν, επικρατούσε η θεωρία πως το υπόστρωμα ταίριαζε στο ενεργό κέντρο όπως ταιριάζει ένα κλειδί σε μια κλειδαριά [**υπόθεση κλειδιού-κλειδαριάς του Fischer** (Fischer's lock and key hypothesis)]. Το ένζυμο και το υπόστρωμα θεωρούνταν άκαμπτες δομές, όπου το υπόστρωμα (κλειδί) ταίριαζε απόλυτα στο ενεργό κέντρο (κλειδαριά) (Σχήμα 3.6). Ωστόσο, το σενάριο αυτό δεν εξηγεί πώς ορισμένα ένζυμα μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις με διαφορετικά υποστρώματα. Αντιθέτως, το σενάριο υποστηρίζει ότι το ένζυμο έχει ένα βέλτιστο υπόστρωμα το οποίο ταιριάζει τέλεια, ενώ τα υπόλοιπα υποστρώματα εφαρμόζουν σε μικρότερο βαθμό. Το γεγονός αυτό υπονοεί πως η καταλυόμενη αντίδραση είναι αποτελεσματική μόνο για το βέλτιστο υπόστρωμα. Η υπόθεση κλειδιού-κλειδαριάς δεν είναι έγκυρη, καθώς αυτό δεν ισχύει για πολλά ένζυμα.

Σήμερα θεωρείται πως το υπόστρωμα δεν διαθέτει το ιδανικό σχήμα για το ενεργό κέντρο και πως εξαναγκάζει το ενεργό κέντρο να αλλάξει σχήμα όταν εισέρχεται σε αυτό, με μια διαδικασία ανάλογη της δημιουργίας εκμαγείου. Η θεωρία αυτή είναι γνωστή ως **θεωρία της επαγόμενης προσαρμογής του Koshland** (Koshland's theory of induced fit), καθώς το υπόστρωμα επάγει την αλλαγή του σχήματος του ενεργού κέντρου ώστε να εφαρμόζει σε αυτό (Σχήμα 3.6).



**ΣΧΗΜΑ 3.6** Η υπόθεση κλειδιού-κλειδαριάς και η θεωρία επαγόμενης προσαρμογής για την πρόσδεση υποστρώματος-ενζύμου.

Για παράδειγμα, ένα υπόστρωμα όπως το **πυροσταφυλικό οξύ** μπορεί να αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της γαλακτικής αφυδρογονάσης μέσω ενός δεσμού υδρογόνου, ενός ιοντικού δεσμού και μιας αλληλεπίδρασης van der Waals (Σχήμα 3.7). Παρ' όλα αυτά, εάν η εφαρμογή δεν είναι τέλεια, οι τρεις προσδετικές αλληλεπιδράσεις δεν θα είναι ιδανικές. Για παράδειγμα, οι ομάδες πρόσδεσης του υποστρώματος θα μπορούσαν να βρίσκονται ελάχιστα απομακρυσμένες από τις αντίστοιχες περιοχές πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο. Για να μεγιστοποιηθεί η ισχύς των δεσμών, το ένζυμο αλλάζει σχήμα έτσι ώστε τα κατάλοιπα αμινοξέων που εμπλέκονται στην πρόσδεση να μετακινηθούν πιο κοντά στο υπόστρωμα.

Η θεωρία της επαγόμενης προσαρμογής βοηθά να εξηγηθεί γιατί ορισμένα ένζυμα μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις που περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Κάθε υπόστρωμα επάγει ένα κατάλληλο σχήμα στο ενεργό κέντρο, έτσι ώστε αυτό να του ταιριάζει. Αρκεί βέβαια η διαδικασία του εκμαγείου να μην παραμορφώνει το ενεργό κέντρο σε τέτοιο βαθμό ώστε να καθιστά τον μηχανισμό της