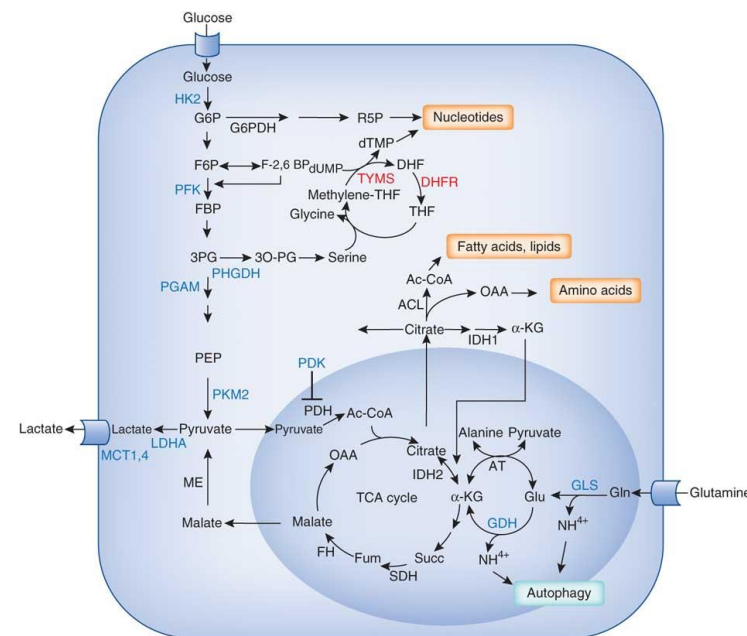




# Ρύθμιση μεταβολικών μονοπατιών

Καθηγητής  
Δημοσθένης Σαρηγιάννης



Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής



# Ρύθμιση

- Στα βιολογικά συστήματα ο έλεγχος των βιολογικών διεργασιών γίνεται τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο.
- Ο έλεγχος επιτελείται μέσω της ρύθμισης της συγκέντρωσης των συστηματικών μιας βιοχημικής αντίδρασης.
- Η ρύθμιση αυτή μπορεί να αφορά τη συγκέντρωση των ενζύμων (E), των υποστρωμάτων (S), των προϊόντων (P), και των ρυθμιστικών μορίων (R).
- Με βάση τα παραπάνω η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να εκφρασθεί ως:

$$V = f(c_e, c_s, c_p, c_r)$$



- Όλα τα μόρια της παραπάνω αντίδρασης βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στα κύτταρα συμμετέχοντας σε εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους
- Παρά την τεράστια πολυπλοκότητα τους, τα βιοχημικά συστήματα χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα τους να επιτυγχάνουν σταθερές καταστάσεις (steady states) γεγονός που θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων σε μοριακό επίπεδο
- Το σύνολο των αλληλεπιδράσεων αυτών έχουν ως αποτέλεσμα τον έλεγχο και τη ρύθμιση του πολύπλοκου δικτύου αντιδράσεων που εμφανίζεται σε όλους τους ζώντες οργανισμούς



# Επαναλαμβανόμενα μοτίβα

- Η ροή των μορίων στις περισσότερες μεταβολικές πορείες καθορίζεται κυρίως από τις ποσότητες και τις δραστηρότητες των ενζύμων παρά από τις ποσότητες των διαθέσιμων υποστρωμάτων
- Ο έλεγχος του μεταβολισμού επιτελείται με διαφορετικούς τρόπους οι οποίοι βασίζονται είτε
  - Στην ρύθμιση της ενζυμικής δραστηρότητας
  - Στη σύνθεση του ενζύμου
  - Με βάση το ενεργειακό φορτίο



# Έλεγχος της δραστηριότητας

- Οι πιθανές θέσεις ελέγχου είναι σε ένζυμα που καταλύουν μη αντιστρεπτές αντιδράσεις.
  - Με την πρώτη μη αντιστρεπτή αντίδραση σε μια μεταβολική πορεία να αποτελεί ένα σημαντικό σημείο ελέγχου.
  - Τα ένζυμα που καταλύουν τα καθοριστικά βήματα είναι δυνατό να ρυθμίζονται αλλοστερικά
- Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν σε τέτοια ένζυμα να αναγνωρίζουν μια ποικιλία σημάτων και να προσαρμόζουν αναλόγως τη δραστηριότητά τους
- Μερικά ρυθμιστικά ένζυμα ελέγχονται και με ομοιοπολική τροποποίηση, με το αποτέλεσμα της ομοιοπολικής τροποποίησης στη δράση κάποιου ενζύμου να έχει μόνιμο ή παροδικό χαρακτήρα
  - Οι μόνιμες μεταβολές αφορούν τη μετάπτωση ενός προενζύμου σε ενεργό ένζυμο μετά την υδρολυτική απόσπαση ενός ολιγοπεπτιδίου
  - Οι παροδικές μεταβολές αφορούν στον αλλοστερισμό και την αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση με την προσθήκη ή αφαίρεση αυτών των τροποποιητικών ομάδων να καταλύονται από ειδικά ένζυμα



## Αλλοστερικά ένζυμα

ένζυμα τα οποία διαθέτουν πολλές θέσεις πρόσδεσης μορίων (αλλοστερικές θέσεις) που είναι διαφορετικές θέσεις από τη θέση του ενεργού κέντρου. Μετά την πρόσδεση με τα μόρια στις αλλοστερικές θέσεις αλλάζει η διαμόρφωση των ενζύμων στο χώρο ενισχύοντας ή καταστέλλοντας τη δράση του.



# Έλεγχος της ποσότητας των ενζύμων

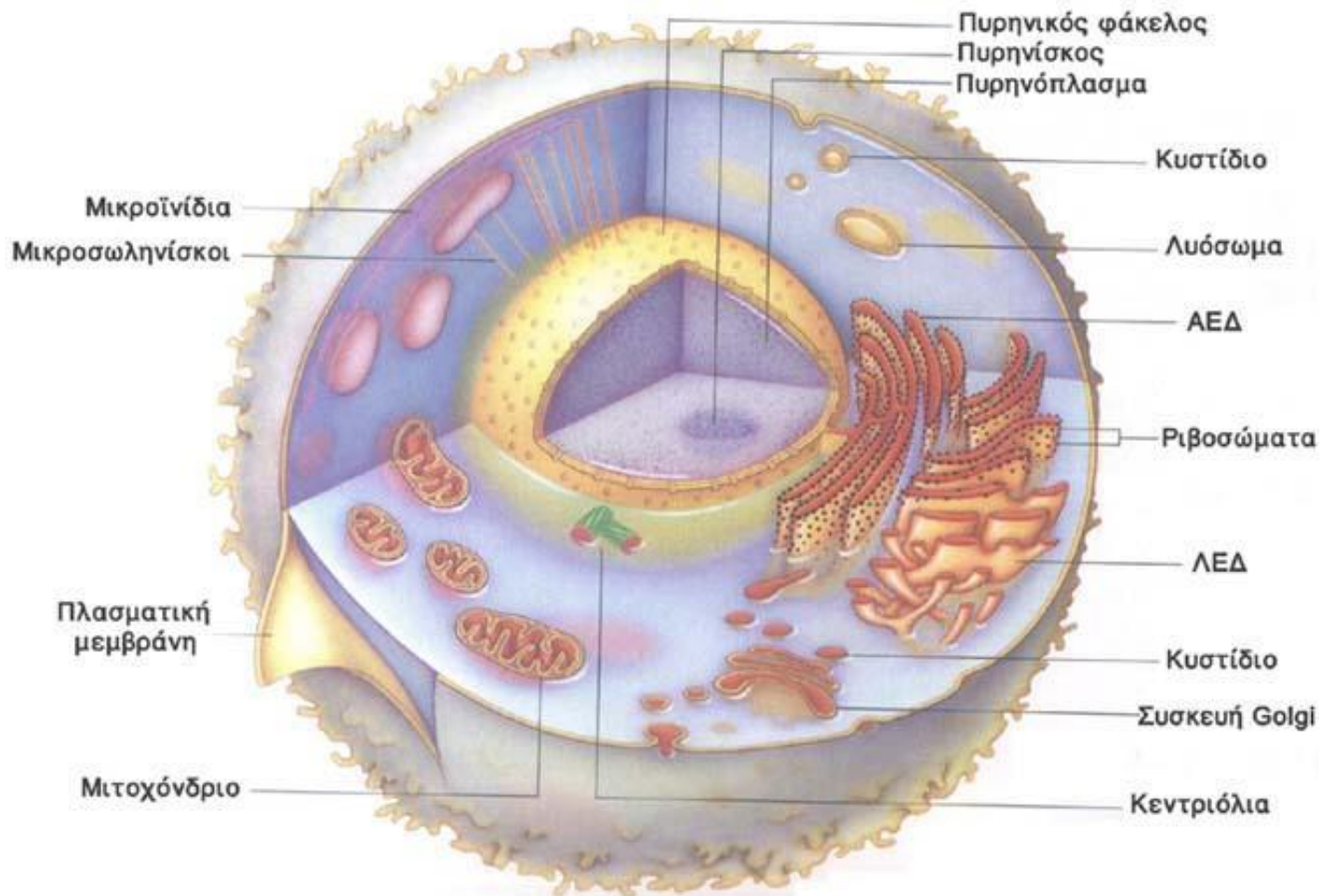
- Η ποσότητα των ενζύμων στο κύτταρο ελέγχονται σε γενετικό επίπεδο
- Οι ρυθμοί σύνθεσης και αποικοδόμησης μερικών ρυθμιστικών ενζύμων είναι αντικείμενο ορμονικών επιδράσεων
- Σε αντίθεση με τους μηχανισμούς ελέγχου της δραστηριότητας των ενζύμων η επαγωγή ή η αναστολή της σύνθεσης ενός ενζύμου αποτελεί μια αργή διαδικασία ελέγχου του μεταβολισμού



# Διαμερισματοποίηση

- Οι μεταβολικές πορείες των ευκαριωτικών κυττάρων επιτελούνται σε καθορισμένες θέσεις στο εσωτερικό των κυττάρων και επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την ύπαρξη διαφορετικών διαμερισμάτων
- Η γλυκόλυση, η πορεία των φωσφορικών πεντοζών και η σύνθεση των λιπαρών οξέων λαμβάνουν χώρα στο κυτταροδιάλυμα, ενώ η οξείδωση των λιπαρών οξέων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια
- Άλλες πορείες όπως η γλυκογένεση εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται σε αμφότερα τα διαμερίσματα
- Η τύχη μερικών μορίων εξαρτάται από τη θέση στην οποία βρίσκονται και για αυτόν το λόγο η ροή τους δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης υπόκειται σε ρύθμιση. Παράδειγμα αποτελούν τα λιπαρά οξέα τα οποία αποικοδομούνται όταν βρεθούν στα μιτοχόνδρια, αντίθετα με την περίπτωση που βρεθούν στο κυτταροδιάλυμα όπου είτε εστεροποιούνται είτε εξάγονται







# Έλεγχος με βάση το ενεργειακό φορτίο

- Η ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου αποτελεί παράγοντα ελέγχου των αντιδράσεων στο μεταβολισμό. Το ενεργειακό φορτίο, το οποίο ορίζεται από τον παρακάτω τύπο, αποτελεί έναν δείκτη της ενεργειακής κατάστασης του κύτταρου

$$\text{Ενεργειακό φορτίο} = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

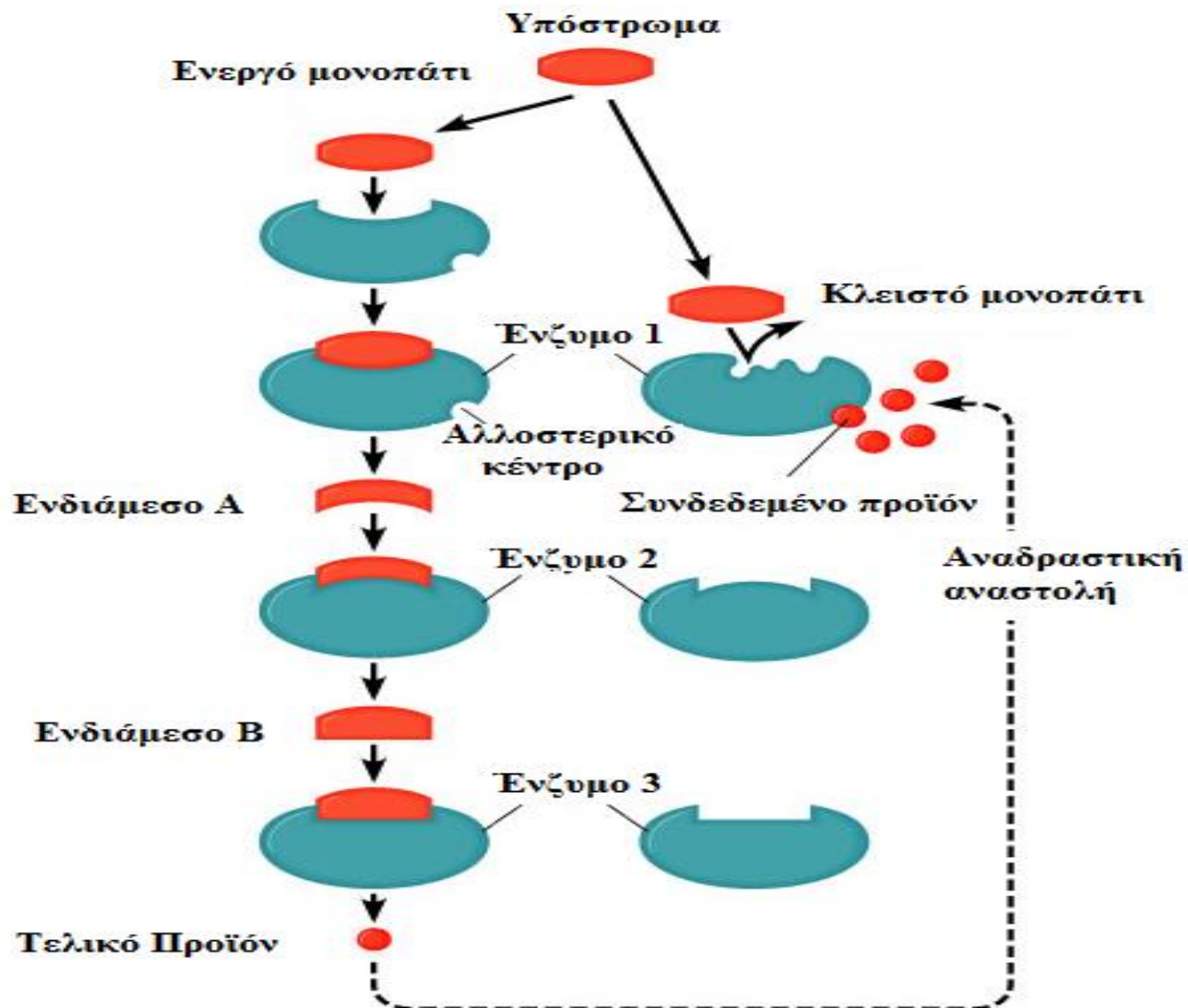
- Η τιμή του ενεργειακού φορτίου μπορεί να κυμαίνεται από 0 (μόνο AMP) έως 1 (μόνο ATP)
- Οι καταβολικές πορείες οι οποίες παράγουν ATP αναστέλλονται από το ενεργειακό φορτίο, ενώ οι αναβολικές πορείες που χρησιμοποιούν ATP διεγείρονται από υψηλό ενεργειακό φορτίο





# Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας

- Ο πλέον συνήθης τρόπος μεταβολικού ελέγχου συνίσταται στον έλεγχο των επιπέδων της ενζυμικής δραστηριότητας.
  - Έλεγχος δια μέσω της επανατροφοδοτικής (αναδραστικής) αναστολής ή ενεργοποίησης (feedback inhibition or activation) αποτελεί μια μέθοδο που ελέγχει την ενζυμική δραστηριότητα σε όλους τους τύπους κυττάρων
  - Το ένζυμο που καταλύει την είσοδο του υποστρώματος στο μονοπάτι μπορεί να είναι αλλοστερικό και η σύνθεσή του τελικού προϊόντος στο αλλοστερικό του κέντρο είναι δυνατόν να τροποποιήσει την ενεργότητα του ενζύμου. Κατά συνέπεια, εάν το κύτταρο βρεθεί σε περιβάλλον όπου η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος P είναι υψηλή θα απενεργοποιηθεί το μονοπάτι με αποτέλεσμα τα υποστρώματα που κανονικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντος να αξιοποιηθούν αλλού.
  - Στις μεταβολικές οδούς που αποτελούνται από σημεία διακλάδωσης, οι μεταβολίτες στα σημεία αυτά δρουν ως επανατροφοδοτικοί αναστολείς για το πρώτο ένζυμο της μεταβολικής οδού



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

# Λοιποί τρόποι ελέγχου

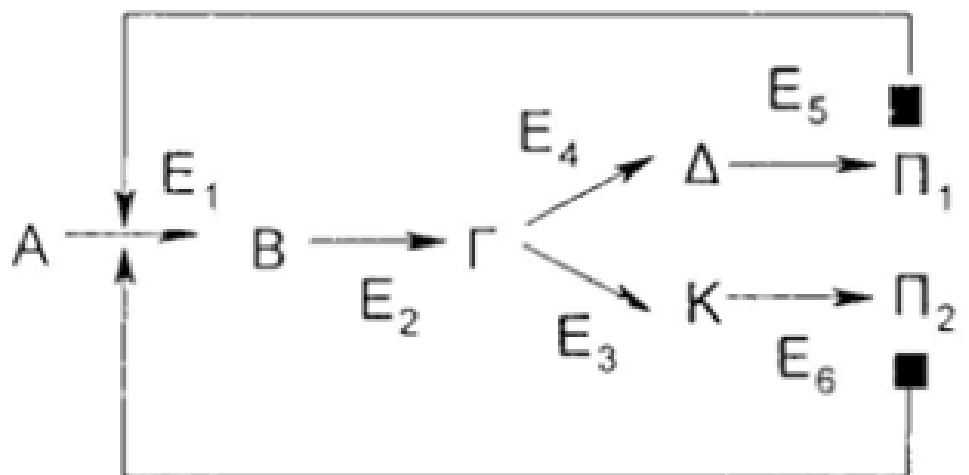
- Χρήση ενζύμων που καταλύουν την ίδια αντίδραση (ισοένζυμα-ισολειτουργικά ένζυμα)
  - Δυο χωριστά ισοένζυμα ( $E_1$  &  $E_2$ ) παράγονται για την πραγματοποίηση της ίδιας αντίδρασης. Τα καθένα από αυτά είναι ευαίσθητο στην αναστολή από διαφορετικό τελικό προϊόν. Αν το  $\Pi_1$ , προστεθεί σε υπερβολική ποσότητα στο θρεπτικό υλικό, αναστέλλει ένα από τα ισοένζυμα, ενώ το άλλο παραμένει πλήρως ενεργό.





- **Αθροιστική ή μερική αναστολή.** Στο μηχανισμό αυτό, το ένζυμο που υπόκειται σε ρύθμιση **E1**, διαθέτει πολλαπλά αλλοστερικά κέντρα για κάθε ένα από τα τελικά προϊόντα της μεταβολικής πορείας. Υψηλές συγκεντρώσεις ξεχωριστά του **Π1** ή του **Π2**, δεν είναι από μόνες τους ικανές να αναστείλουν το ένζυμο, ενώ η από κοινού δράση τους μπορούν να οδηγήσουν στην πλήρη αναστολή της διεργασίας

### Αθροιστική επανατροφοδοτική αναστολή

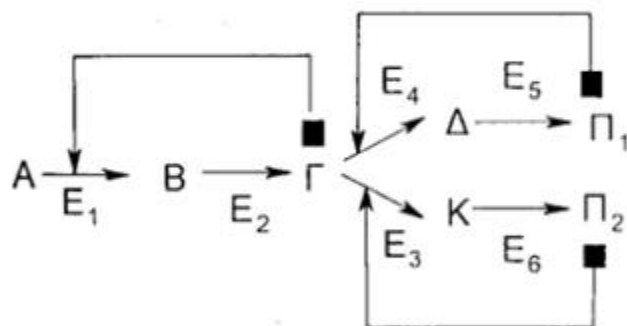




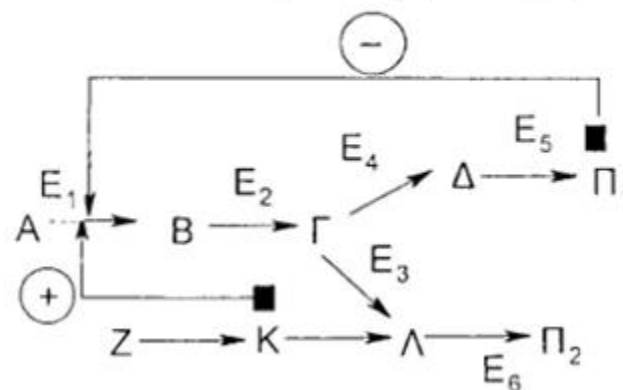


- **Αναστολή από διαδοχικές αναδράσεις.** Κατά τη διαδικασία αυτή μια ενδιάμεση ουσία στο σημείο διακλάδωσης του μονοπατιού μπορεί να συσσωρευτεί και να ενεργήσει ως αναστολέας της μεταβολικής ροής στο μονοπάτι. Υψηλές συγκεντρώσεις του **Π1** και **Π2** αναστέλλουν τα ένζυμα **E3** και **E4** αντίστοιχα. Εάν το **E3** και **E4** αναστέλλονται το **Γ** θα συσσωρευτεί αλλά όχι τόσο γρήγορα όπως στην περίπτωση όπου αμφότερα τα **E3** και **E4** αναστέλλονται ταυτόχρονα. Κατ' επέκταση ενδιάμεσα επίπεδα ροής επιτρέπονται εάν το **E4** ή το **E5** είναι υψηλό αλλά το μονοπάτι αδρανοποιείται όταν και τα δυο (**Π1** και **Π2**) είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις

Επανατροφοδοτική αναστολή  
από διαδοχικές αντιδράσεις



Αναστολή & ενεργοποίηση







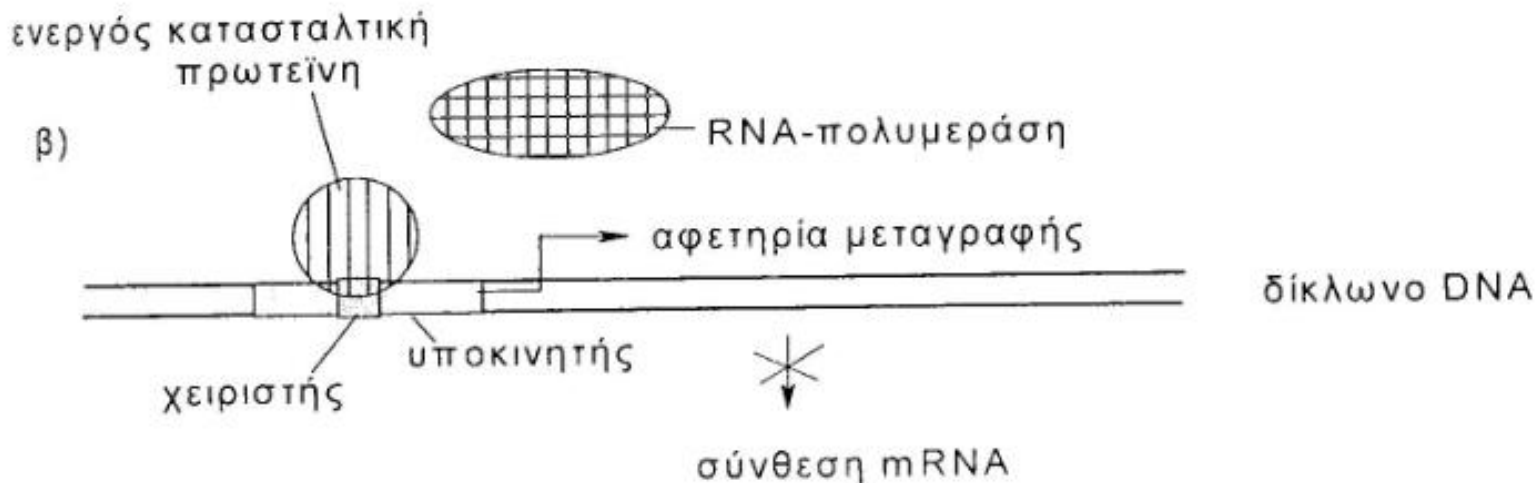
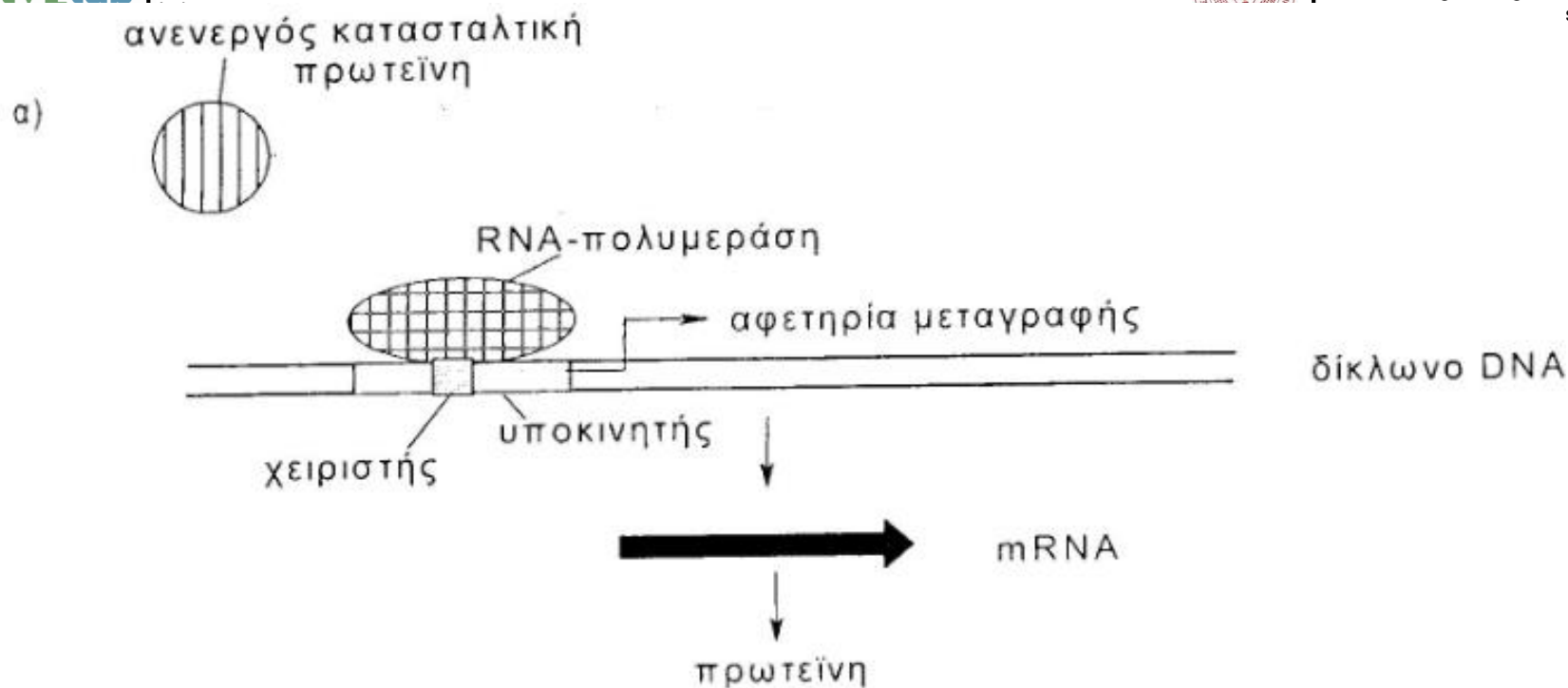
# Ο Έλεγχος της συγκέντρωσης των ενζύμων

- Καθότι τα ένζυμα είναι προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων, η ποσότητα τους μπορεί να ρυθμιστεί σε δυο επίπεδα
  - Της μεταγραφής του DNA
  - Της μετάφρασης του RNA
- Ο μεταγραφικός έλεγχος της πρωτεϊνικής σύνθεσης είναι ο πιο στρατηγικός έλεγχος που χρησιμοποιείται στα βακτήρια. Ο έλεγχος της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα ευκαριωτικά κύτταρα μπορεί να είναι πιο σύνθετος αλλά εκφράζονται οι ίδιες βασικές έννοιες.
  - Το κύτταρο αντιλαμβάνεται ότι έχει πολύ ή λίγη ποσότητα μιας πρωτεΐνης και αποκρίνεται με αύξηση ή μείωση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή
  - Τέτοιας μορφής ρύθμιση είναι η αναδραστική καταστολή, στη ρύθμιση αυτή το τελικό προϊόν της ενζυμικής ενεργότητας συσσωρεύεται και αναστέλλει τη μεταγραφή. Ανάλογα κατά την επαγωγή όταν ένας μεταβολίτης συσσωρεύεται είναι δυνατόν να δρα και ως απαγωγέας της μεταγραφής



# Έλεγχος της μεταγραφής

- Ο έλεγχος της μεταγραφής συνήθως ασκείται όταν η RNA πολυμεράση συνδέεται στον υποκινητή και ξεκινά η σύνθεση ενός RNA αντιγράφου του γονιδίου.
  - Οι υποκινητές τόσο των βακτηριακών όσο και των ευκαρυωτικών γονιδίων περιλαμβάνουν τη θέση έναρξης, από όπου αρχίζει η μεταγραφή. Η περιοχή αυτή περιέχει θέσεις απαραίτητες για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Ελέγχοντας την ταχύτητα σύνδεσης της RNA πολυμεράσης, το κύτταρο ελέγχει την ποσότητα του mRNA που παράγεται και μέσω αυτού την ποσότητα του ενζύμου που συντίθεται
  - Τα γονίδια διαθέτουν ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA (DNA regulatory sequences) που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των γονιδίων. Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες του DNA αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες γνωστές ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες των γονιδίων οι οποίες προσδένονται στο DNA.
  - Η σύνδεση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών μπορεί να επάγει την μεταγραφή (θετικός έλεγχος) ή να την καταστείλει (αρνητικός έλεγχος). Κατ' επέκταση υπάρχουν αντίστοιχα οι κατασταλτικές και οι ενεργοποιητικές πρωτεΐνες.





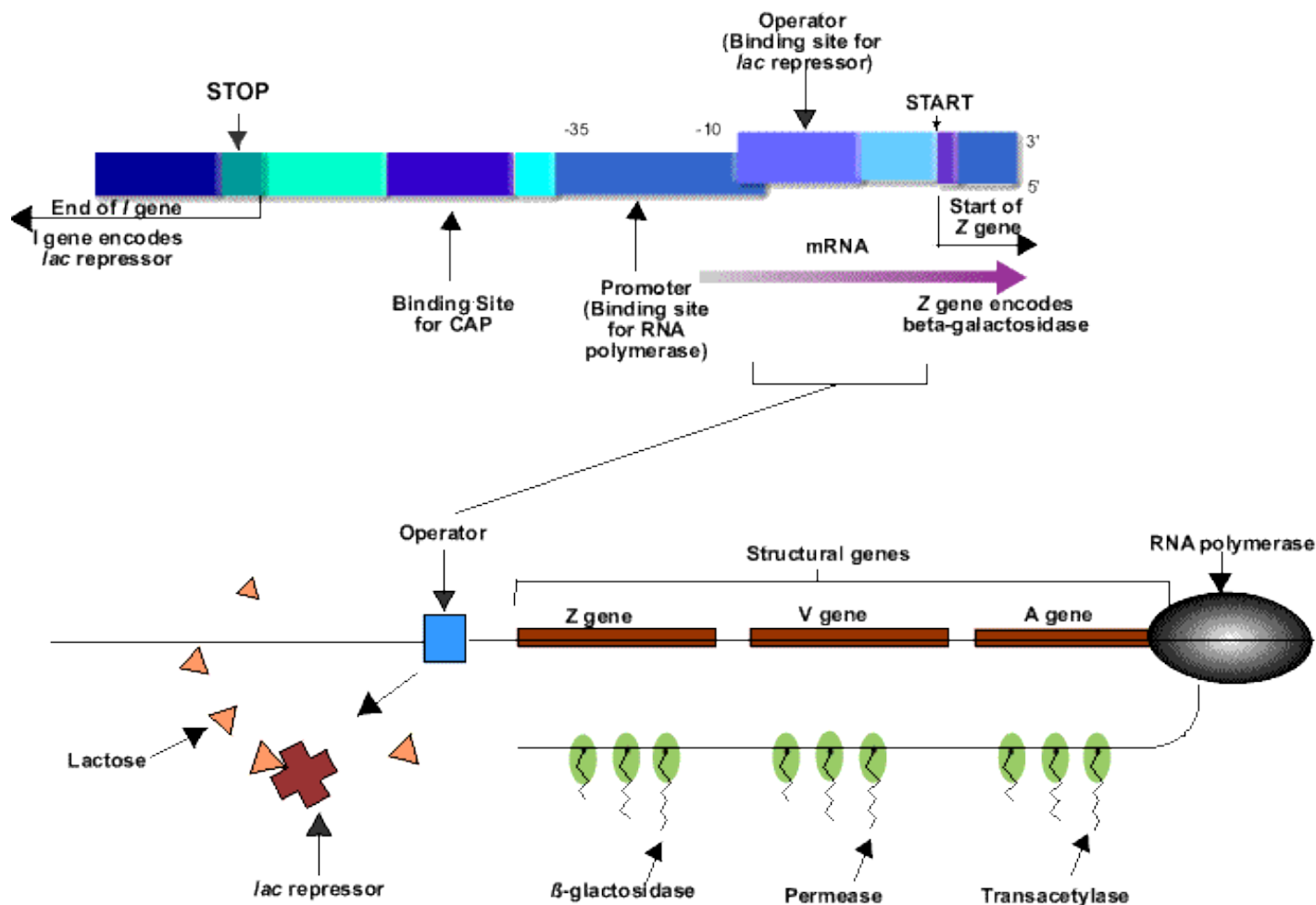
# Οπερόνιο (Operon)

- Αναφέρεται σε συσσωματώματα γονιδίων που διατάσσονται διαδοχικά και ελέγχονται από μια κοινή περιοχή ελέγχου
  - Το mRNA που προέρχεται από ένα οπερόνιο περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες των δομικών γονιδίων που περιέχονται στο οπερόνιο
  - Τα οπερόνια είναι κοινά στα βακτήρια αλλά δεν υπάρχουν στους ευκαριωτικούς στους οποίους τα γονίδια ρυθμίζονται ανεξάρτητα
- Ένα από τα πλέον χαρακτηρισμένα οπερόνια είναι το ***lac*** οπερόνιο, το οποίο φέρει τα δομικά γονίδια για την αξιοποίηση της λακτόζης ως πηγή άνθρακα. Εάν στο μέσο ανάπτυξης αντί για γλυκόζη παρασχεθεί λακτόζη, τότε αξιοποιείται από τα κύτταρα ως πηγή άνθρακα, ενώ ανιχνεύονται μεγάλες ποσότητες από τρία νέα ένζυμα που παράγονται ως απάντηση στην μεταβολή του περιβάλλοντος
  - Μια β-γαλακτοσιδάση που υδρολύει τη λακτόζη σε D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη,
  - μια περμεάση που καταλύει τη μεταφορά της λακτόζης μέσα στο κύτταρο όπου μετατρέπεται σε αλλολακτόζη και μια
  - τρανσακετυλάση που ο ρόλος της δεν είναι ακόμη κατανοητός



# Οπερόνιο (Operon)

*lac* Operon Model





# Έλεγχος της μετάφρασης

- Η μετάφραση του γενετικού μηνύματος (η διαδικασία σύνθεσης πρωτεϊνών), είναι ένας μηχανισμός πολύ πιο πολύπλοκος από εκείνον της μεταγραφής, η οποία χρειάζεται μόλις ένα ένζυμο, μια περιοχή του DNA και τους τριφωσφορικούς εστέρες των τεσσάρων ριβονουκλεοζιτών
- Η σύνθεση μιας πρωτεΐνης απαιτεί
  - 20 αμινοξέα,
  - Το mRNA
  - Ριβοσωμάτια που στους προκαρυωτικούς οργανισμούς το καθένα περιέχει περί τις 50 πρωτεΐνες και 3 μόρια RNA
  - 30 διαφορετικά μόρια tRNA
  - 10 βοηθητικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες
  - Μεγάλα ποσοστά ενέργειας με τη μορφή ATP και GTP
- Σε γενικές γραμμές ο έλεγχος της μετάφρασης λαμβάνει χώρα σε τρία επίπεδα τα οποία σχετίζονται
  - 1) Με τη ρύθμιση του RNA
  - 2) Με την πιθανότητα έναρξης της μετάφρασης
  - 3) Με τη συνολική ταχύτητα της πρωτεϊνικής σύνθεσης



# Γενικευμένος έλεγχος - ρύθμιση σε επίπεδο κυττάρου

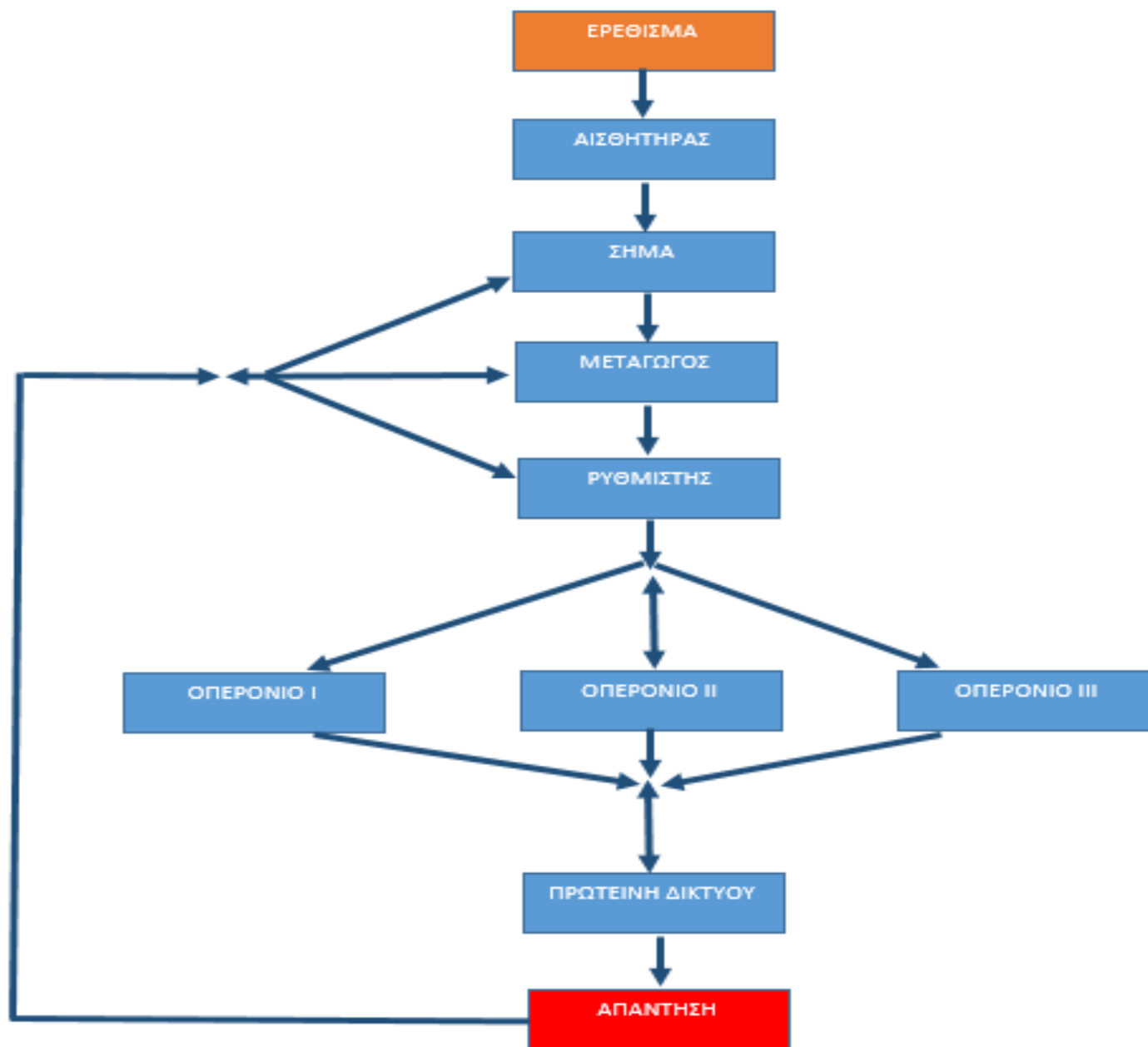
- Αποτελεί την έμφυτη ικανότητα του κυττάρου να χρησιμοποιεί ρυθμιστικά σήματα για τον έλεγχο επιμέρους λειτουργιών του που οδηγούν σε μια συντονισμένη απάντηση σε μεταβολές του περιβάλλοντος, όπως:
  - Μεταβολή στο μέσο ανάπτυξης
  - Μεταβολή στην πηγή άνθρακα
  - Θερμοκρασιακό σοκ
  - Έλλειψη πηγών άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου
  - Μετάβαση από αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον
- Το Ρυθμιστικό δίκτυο περιλαμβάνει πλήθος οπερονίων και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων με τις θέσεις τους να είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα.
- Με τον όρο ρεγουλόνια (**regulons**) αναφέρονται τα δίκτυα από οπερόνια τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο μια κοινής ρυθμιστικής πρωτεΐνης



# Ολοκληρωμένος έλεγχος

- Το σήμα αποτελεί απάντηση στις περιβαλλοντικές συνθήκες και ελέγχει άμεσα ή έμμεσα (μέσω ενός ή περισσότερων μεταγωγέων) τη σύνθεση ενός ρυθμιστικού μορίου (ρυθμιστή). Με τη σειρά του ο ρυθμιστής ελέγχει την ταχύτητα της πρωτεϊνικής σύνθεσης οδηγώντας στη σύνθεση πρωτεϊνών που προάγουν την ανάπτυξη ή διασφαλίζουν την επιβίωση του κυττάρου. Ο επανατροφοδοτικός έλεγχος επιτρέπει στο σύστημα να επιστρέψει σε μια νέα κατάσταση ισορροπίας
- Σε ένα ολοκληρωμένο ρυθμιστικό δίκτυο (**ρεγκουλόνιο**), **οπερόνια** που εμφανίζονται διάσπαρτα στο βακτηριακό γονιδίωμα και βρίσκονται υπό τον κοινό έλεγχο μιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης δρουν έτσι ώστε να επιτρέπουν στο κύτταρο να αντιδρά και να προσαρμόζεται στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και αλλαγές
- Καθότι ακόμα και στο μικρότερο ερέθισμα πολλά ρεγκουλόνια δρουν ταυτόχρονα, έτσι αυτά σχηματίζουν ένα **στιμουλόνιο** το οποίο είναι το συνολικό δίκτυο ρουγκουλονίων που δρουν ως απάντηση σε ένα ερέθισμα

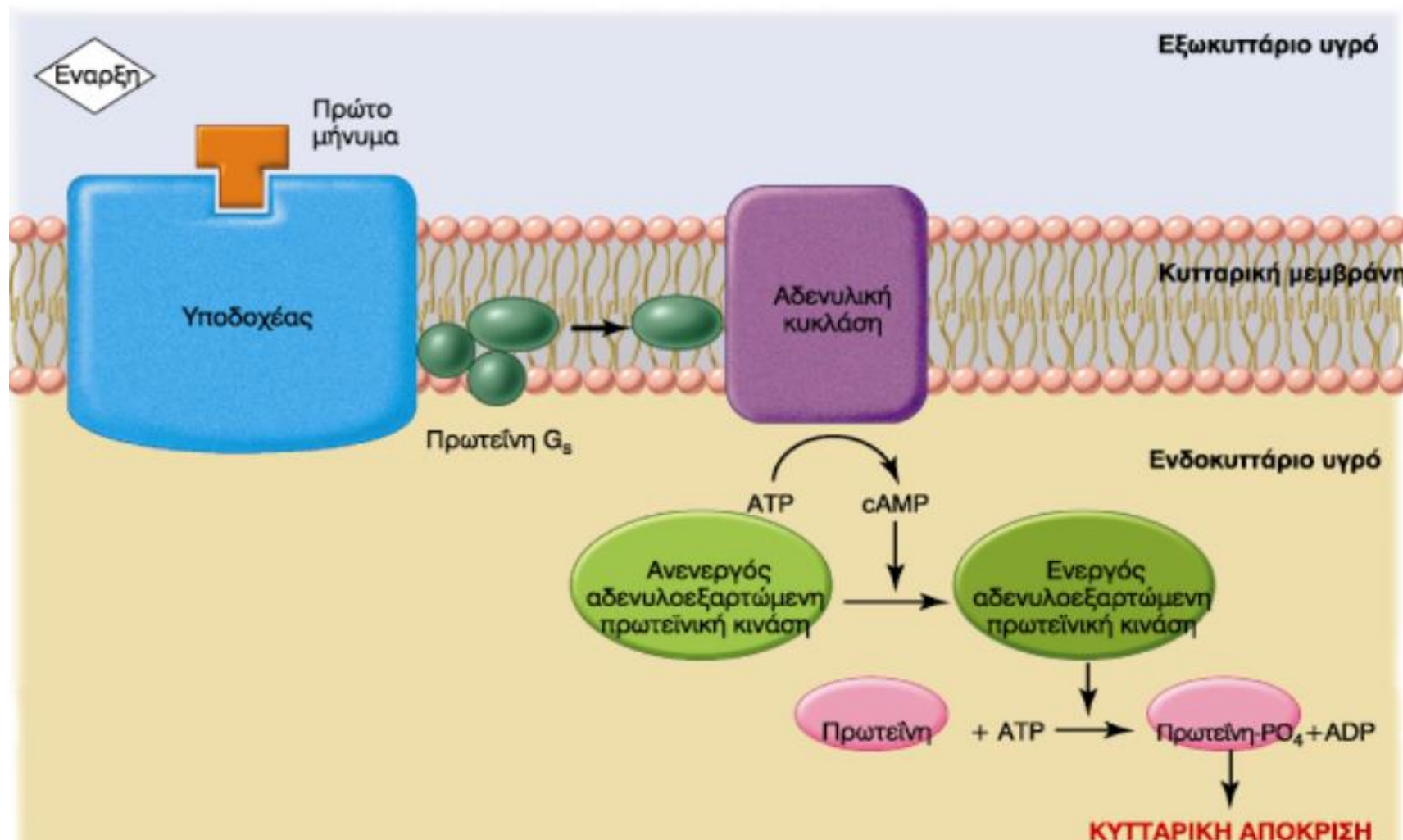






# Μετάδοση σήματος

- Βασικό χαρακτηριστικό των πολυγονιδιακών συστημάτων είναι η ικανότητα τους να διαχειρίζονται πληροφορίες
  - η λειτουργία αυτή επιτελείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών.
  - Η μεταγωγή του σήματος επιτυγχάνεται μέσω της επικοινωνίας μεταξύ ζευγών που ανήκουν σε δυο ομάδες πρωτεϊνών.
  - Αποτελούνται από μια πρωτεΐνη αισθητήρα (sensor protein) η οποία έχει την ικανότητα να ανιχνεύει το σήμα και να το μεταβιβάζει στην άλλη πρωτεΐνη του ζεύγους που είναι η ρυθμιστική πρωτεΐνη (protein regulator)
  - Η ρυθμιστική πρωτεΐνη επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την έναρξη της μεταγραφής σε ένα σύνολο οπερονίων.
  - Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το τμήμα της πρωτεΐνης αισθητήρα εκτείνεται περίπου στα 250 αμινοξέα στο C άκρο, ενώ για τη ρυθμιστική πρωτεΐνη εκτείνεται περίπου έως τα 120 αμινοξέα στο N άκρο





## Σχηματική πορεία από το εξωκυττάριο σήμα στη κυτταρική απόκριση

**Εξωκυττάριο σήμα**  
Νευροδιαβιβαστής,  
Ορμόνη\*, Φωτόνιο,  
Μηχανικό ερέθισμα



**Μεμβρανικός Υποδοχέας**  
Υποδοχείς 7TM,  
Κινάσες τυροσίνης  
Δίαυλοι ιόντων



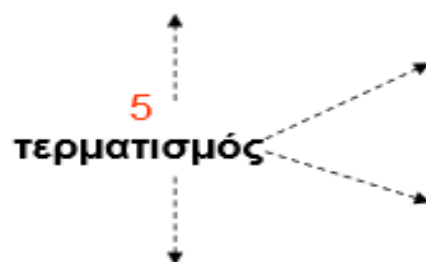
**Διαβίβαση και  
ενίσχυση**



**Μεταγωγή**  
Ενεργοποίηση πρωτεϊνικών  
κινασών (PKA, PKC),  
Μεταγραφικών παραγόντων



**Κυτταρική απόκριση**  
Αλλαγή στη γονιδιακή  
έκφραση, στη κυτταρική  
δομή και μεταβολική  
συμπεριφορά



Τριμερείς πρωτεΐνες **G**,  
μικρές **G** πρωτεΐνες

Κυκλάση,  
φωσφοδιεστεράση  
νουκλεοτιδίων  
**cAMP, cGMP**

Φωσφολιπάση **C**  
σύνθεση **IP + DAG**

\*Παρακρινής, ενδοκρινής.  
Κυτταρική επαφή, σύναψη



# Έλεγχος των μεταβολικών δικτύων

- Σε ένα μεταβολικό μονοπάτι, το οποίο περιέχει περισσότερα από ένα ένζυμα, η ροή προσδιορίζεται από την κινητική και τον έλεγχο του κάθε ενζύμου που συμμετέχει σε αυτό
  - Σε ορισμένα μεταβολικά μονοπάτια η μεταβολική ροή ρυθμίζεται από τη συνολική ποσότητα ενός ενζύμου η οποία μπορεί να είναι τόσο χαμηλή ώστε να περιγράφεται ως ρυθμο-καθοριστικό βήμα (rate controlling step)
  - Σε άλλες περιπτώσεις η μεταβολική ροή ελέγχεται από περισσότερα ένζυμα και οι ταχύτητες των αντιδράσεων δεν είναι άμεσα συνδεδεμένες μεταξύ τους με συνέπεια κάποιες αντιδράσεις να αναστέλλονται λόγο μη ύπαρξης κατάλληλου υποστρώματος ή έλλειψη κάποιου συμπαραγόντα. Σε τέτοια μονοπάτια τα ένζυμα είναι γνωστά ως ρυθμιστικά (regulatory enzymes) καθότι η καταλυτική τους δράση δεν είναι η μονή τους λειτουργία αφού είναι ικανά να προκαλέσουν σημαντική ρύθμιση της πορείας και των ροών.



# Ρυθμιστικά ένζυμα

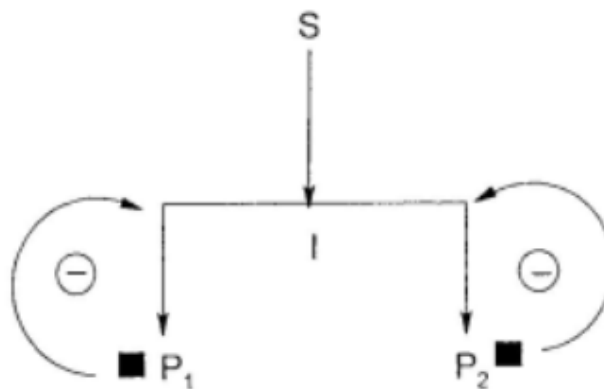
- Δυο σημαντικά κριτήρια χαρακτηρίζουν τα ένζυμα αυτά:
  - Α) καταλύουν μη αντιστρεπτές αντιδράσεις. Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν μικρή δραστηριότητα και έτσι μπορούν να περιορίσουν τη ροή μέσα στη μεταβολική οδό. Αντίθετα, τα ένζυμα που καταλύουν αντιστρεπτές αντιδράσεις θα πρέπει να βρίσκονται σε περίσσεια έτσι ώστε η μεταβολή της συγκέντρωσης τους να μη μεταβάλει σημαντικά τη μεταβολική οδό.
  - Β) θα πρέπει να διαθέτει ρυθμιστικές ιδιότητες όπως είναι τα αλλοστερικά κέντρα.
- Η σχέση που συνδέει τη μεταβολική ροή  $J$  με την ποσότητα ενός ενζύμου  $c_e$  στη μεταβολική οδό στις περισσότερες περιπτώσεις δίνεται από τη σχέση

$$J = \frac{J_{\max} c_e}{c_e + K}$$

- Όπου  $J$  η παρατηρούμενη ροή,  $J_{\max}$  η μέγιστη ροή (η οποία αντιστοιχεί σε άπειρη ποσότητα ενζύμου),  $c_e$  η μετρήσιμη ποσότητα ενζύμου και  $K$  η σταθερά η οποία αντιστοιχεί στην τιμή  $c_e$  όταν  $J = J_{\max}/2$

# Ταξινόμηση σημείων διακλάδωσης (κομβικά σημεία)

- Σε πολλές βιολογικές διεργασίες η απόδοση σε κάποιο προϊόν εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Αν και η συνολική δραστηριότητα των ενζύμων στα σημεία διακλάδωσης ενός μεταβολικού δρόμου καθορίζει την παραγωγικότητα της διαδικασίας, **η απόδοση είναι συνάρτηση του λόγου των ροών στα σημεία διακλάδωσης** (κομβικά σημεία)
- Η απόδοση του προϊόντος  $P_1$  εξαρτάται από το λόγο των ροών στο κομβικό σημείο  $I$  και όχι από τη δραστηριότητα του  $I$  προς τη διακλάδωση που οδηγεί στο  $P_1$



- Η μεταβολική μηχανική αποσκοπεί στην τροποποίηση της κατανομής των ροών γύρω από ένα κομβικό σημείο με στόχο την αύξηση της απόδοσης προς το επιθυμητό προϊόν



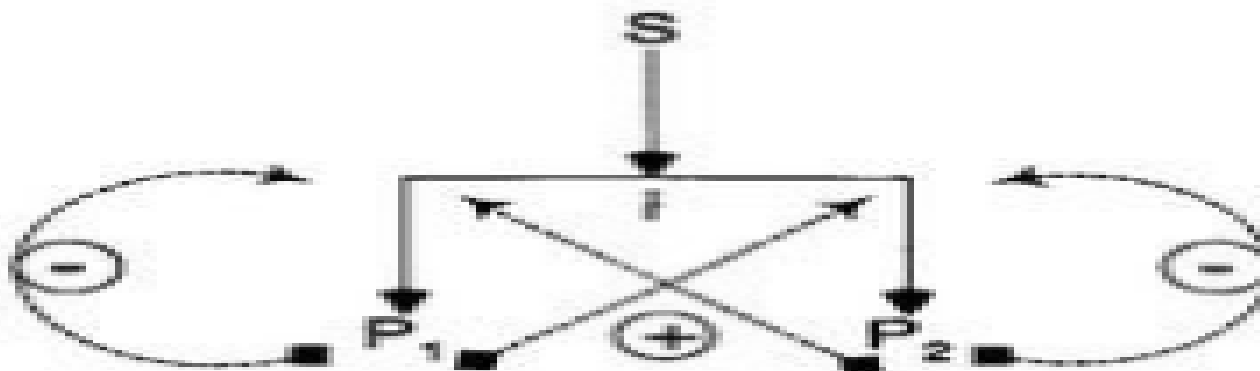


# Δομή μεταβολικού ελέγχου

- Αν και η δομή του μεταβολικού ελέγχου που ρυθμίζει τη ροή στους διάφορους οργανισμούς ποικίλει, μπορεί εντούτοις να ομαδοποιηθεί σε τρεις γενικές κατηγορίες.
  - Τους ευκάμπτους κόμβους (flexible nodes) στους κόμβους αυτούς η κατανομή της ροής τροποποιείται ανάλογα με τις απαιτήσεις του μεταβολισμού του κυττάρου. Οι κομβοί αυτοί χαρακτηρίζονται από ένζυμα που συναγωνίζονται για τα υποστρώματα τα οποία επιδεικνύουν συγγένεια. Οι κόμβοι αυτοί δεν επιδεικνύουν ευαισθησία σε ρύθμιση
  - Τους μερικώς άκαμπτους κόμβους (weakly rigid nodes) η κατανομή της ροής στους κόμβους αυτούς είναι μετατοπισμένη προς τον ένα κλάδο. Το ένζυμο του κλάδου αυτού χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδική δραστηριότητα ή/και μεγάλη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Οι κόμβοι αυτοί είναι μερικώς ευαίσθητοι σε ρύθμιση.
  - Τους άκαμπτους κόμβους (rigid nodes). Οι κόμβοι αυτοί εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία σε ρύθμιση. Η κατανομή της ροής ελέγχεται ισχυρά σε έναν ή περισσότερους κλάδους του κόμβου. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με συνδυασμό του επανατροφοδοτικού ελέγχου και της ενεργοποίησης των ενζύμων του ανταγωνιστικού κλάδου.



- Σε έναν εύκαμπτο κόμβο, ο δείκτης ροής εξαρτάται αποκλειστικά από τις κυτταρικές απαιτήσεις για τα δύο προϊόντα P1 και P2.
- Ένας μερικός άκαμπτος κόμβος είναι παρόμοιος με έναν εύκαμπτο κόμβο με τη διαφορά ότι μια ροή του μπορεί να εμφανίζει σημαντική κυριαρχία έναντι της άλλης (ων) λόγω της μεγαλύτερης συνάφειας με τα αντίστοιχα ένζυμα και τη μεγαλύτερη συνολική δραστικότητα έναντι της πρώτης ροής. Σε αυτήν την περίπτωση, η πλήρης καταστολή του πρώτου κλάδου δεν θα έχει σημαντική επίδραση επί της συνολικής ροής.
- Ένας ισχυρά άκαμπτος κόμβος ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ενεργοποίηση του τελικού προϊόντος ή την αναστολή, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Σε αυτό το παράδειγμα, κάθε μεταβολικό προϊόν δρα ως ενεργοποιητής του ανταγωνιστικού κλάδου, καθώς επίσης και ως αναστολέας του δικού του σχηματισμού. Ένας άκαμπτος κόμβος μπορεί να έχει μια περιοριστική δράση στην απόδοση προϊόντος, και η απορρύθμιση του μπορεί να είναι πιο περίπλοκη από ό, τι η ενζυμική εξασθένηση.

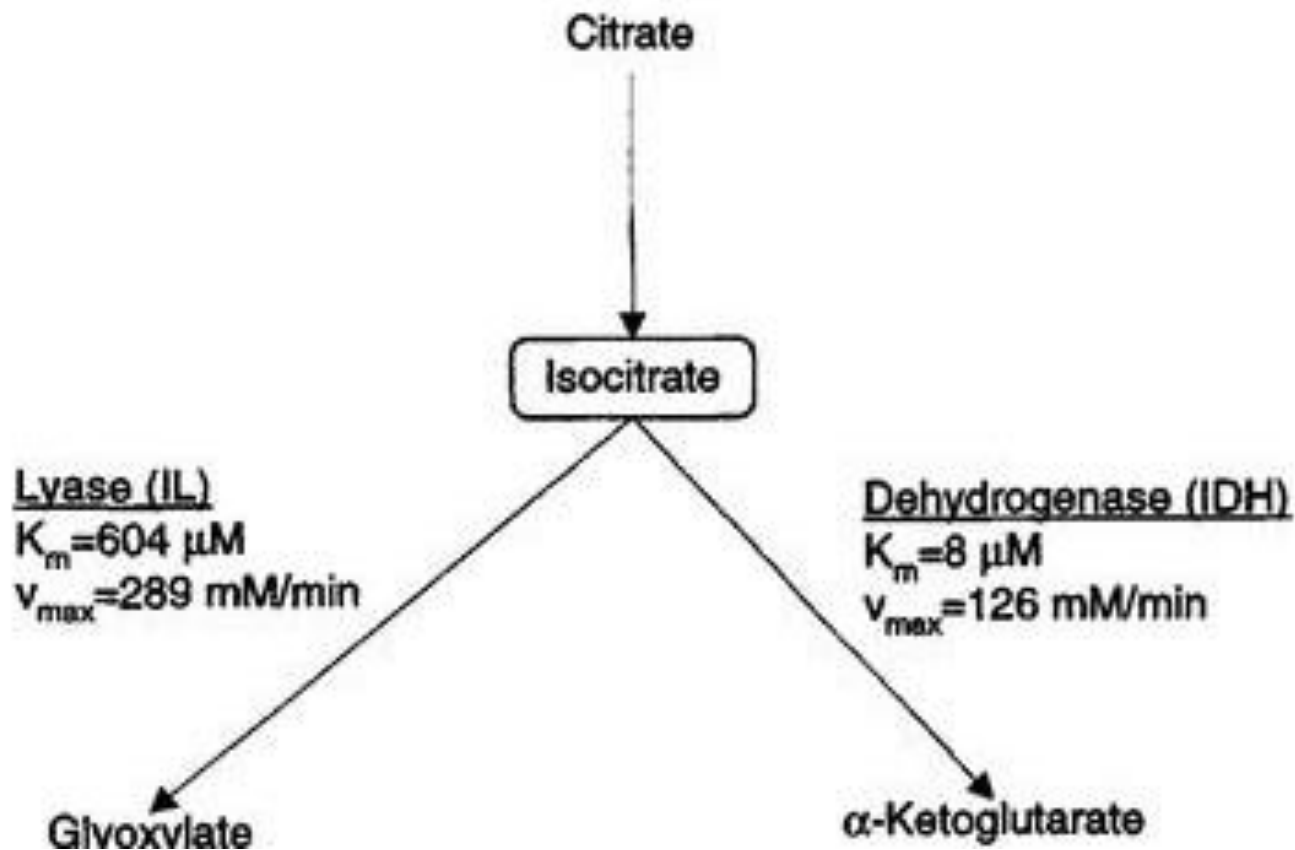




- Ας υποθέσουμε ότι ο επιθυμητός στόχος είναι να αυξηθεί η αναλογία ροής στο προϊόν **P1**, και, επιπλέον ότι η συγκέντρωση σταθερής κατάστασης (steady state) του **P1** είναι αρκετά υψηλή ώστε να παρεμποδίζει τη δική της σύνθεση με την απουσία του ενεργοποιητή, **P2**. Σε μια τέτοια περίπτωση, η αύξηση της αναλογίας προς το **P1** θα απαιτούσε την εξασθένηση της ροής προς **P2**. Ωστόσο, σε έναν έντονα άκαμπτο κόμβο μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να οδηγήσει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το P2, και, κατά συνέπεια, ο κλάδος **P1** θα χάσει τον ενεργοποιητή του. Εν ολίγοις, η εξασθένηση ενός κλάδου οδηγεί στην εξασθένηση του ανταγωνιστικού κλάδου (συνολική κατάρρευση).
- Ως αποτέλεσμα των πολύπλοκων και ποικίλων τρόπων ελέγχου του κυττάρου και την κινητική του ενζύμου, η εξασθένηση ενός κλάδου ενός ισχυρά άκαμπτου κόμβου μπορεί να οδηγήσει σε μερική εξασθένηση ενός ανταγωνιστικού κλάδου, έτσι ώστε να επιτευχθεί μικρή βελτίωση στην απόδοση του προϊόντος. Είναι επίσης πιθανό η εξασθένηση των ανεπιθύμητων οδών αντί της μείωσης ή ανακατεύθυνσης της ροής να προκαλέσει έκκριση ενδιάμεσων μεταβολιτών και να μεταβάλει έτσι το συνολικό μονοπάτι.
- Παρότι πιθανώς κάποιες μέθοδοι αρχιτεκτονικού ελέγχου θα μπορούσε να υποτεθεί ότι παράγουν άκαμπτους κόμβους, το βασικό στοιχείο για κάθε τέτοιο έλεγχο είναι η παρουσία ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης μεταξύ ανταγωνιστικών κλάδων (cross-talk), που θα έχουν την τάση να διατηρήσουν μια σταθερή ροή μεταξύ των μονοπατιών.



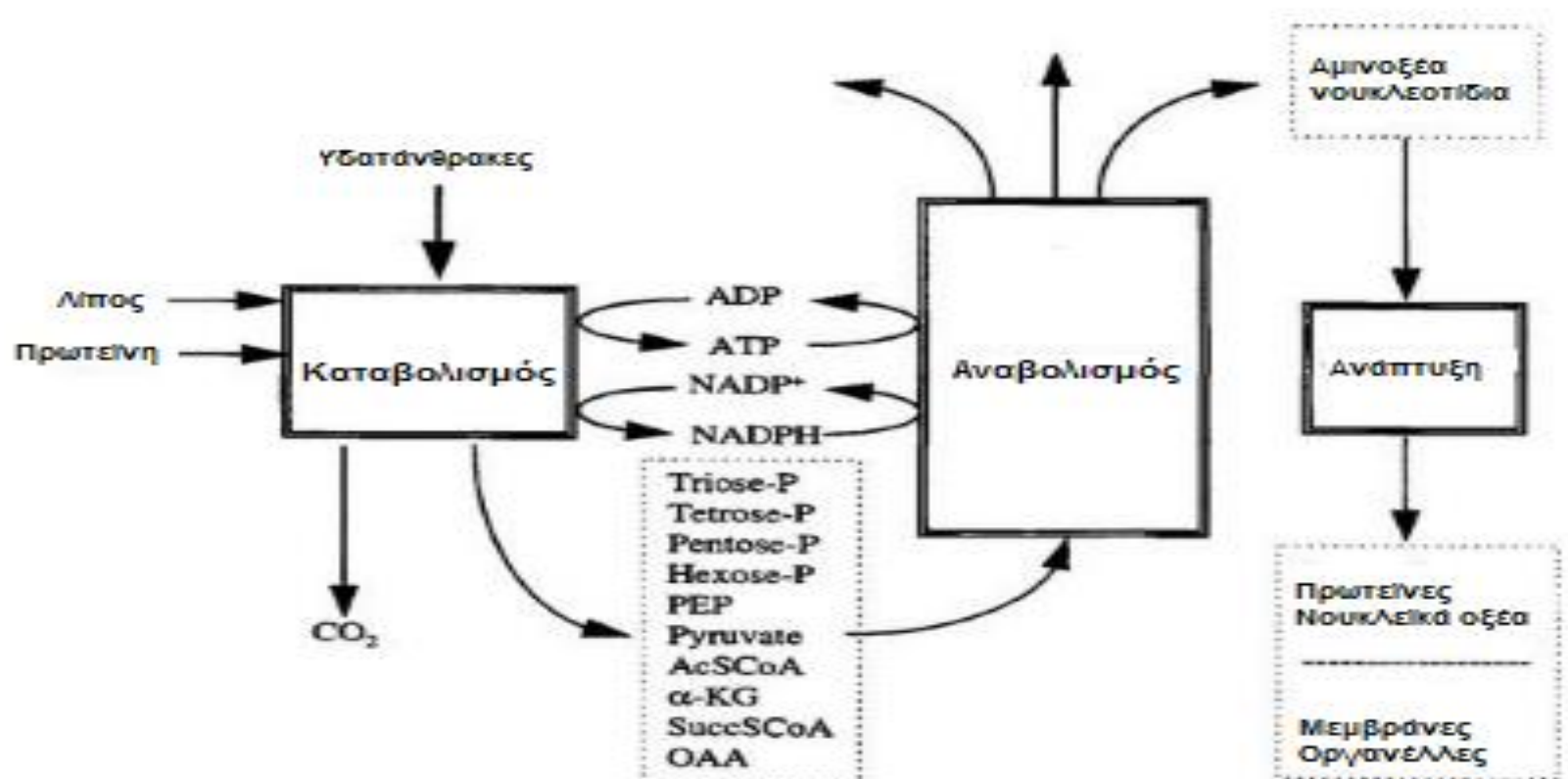
- Η ισοκιτρική λυάση (IL) επάγεται όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε οξικό, και εξυπηρετεί ένα σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση άνθρακα ο οποίος αλλιώς θα χανόταν ως διοξείδιο του άνθρακα με του κύκλου του κιτρικού οξέος
- Η ισοκιτρική δεϋδρογενάση (IDH), που αποτελεί ανταγωνιστικό ένζυμο, είναι κατά κύριο λόγο (περίπου 80%) σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση που την καθιστά ανενεργή. Όταν στα κύτταρα παρουσιαστεί μια πιο πλεονεκτική πηγή άνθρακα, όπως γλυκόζη, υπάρχει ταχεία αποφωσφορυλίωση της IDH, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της.
- Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του σημείου διακλάδωσης είναι η μεγάλη διαφορά στις αντίστοιχες τιμές  $K_m$ : (IL = 75 φορές μεγαλύτερη). Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις του ισοκιτρικού ( $\sim 160 \mu\text{M}$ ), η IDH είναι κορεσμένη από το υπόστρωμα.
- Ως αποτέλεσμα της κινητικής των δύο αυτών ενζύμων, η ροή είναι υπερευαίσθητη σε αλλαγές στις συγκεντρώσεις του ισοκιτρικού. Εισαγωγή γλυκόζης σε μια καλλιέργεια οξικοτρόφων προκαλεί τόσο την αύξηση του  $v_{max}$  του IDH καθώς και αντίστοιχη μείωση στη ροή άνθρακα μέσω της κιτρικής συνθεσάσης, με συνολικό αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυτταρικού επίπεδου του Ισοκιτρικού.





# Συζευγμένες αντιδράσεις και ο ρόλος των μεταβολικών νομισμάτων

- Οι βιοσυνθετικές αντιδράσεις βασίζονται στην παροχή του ATP. Στην περίπτωση όπου αυτό είναι χαμηλό η βιοσύνθεση υστερεί. Το ATP και τα συσχετιζόμενα μορίων, ADP και AMP, διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο μεταβολισμό του άνθρακα. Αυτές οι κεντρικές καταβολικές διαδικασίες (γλυκόλυση και κύκλος TCA) παρέχουν τα υλικά έναρξης για τη βιοσύνθεση. Αυτά τα μονοπάτια εξυπηρετούν επίσης μια βασική λειτουργία αναφορικά με την παροχή όχι μόνο των πρόδρομων μεταβολιτών αλλά ελεύθερης ενέργειας και συνενζύμων
- Αυτά τα μονοπάτια ονομάζονται αμφίβολα (amphibolic) για να υποδειχθεί ο διπλός ρόλος τους στον καταβολισμό και αναβολισμό.
- Ο έλεγχος αυτών των μονοπατιών θα πρέπει να αντικατοπτρίζει τη διττή λειτουργία τους, δηλαδή,
  - να εξασφαλιστεί η σωστή και συντονισμένη ροή του άνθρακα προς τις βιοσυνθετικές οδούς και
  - Προς τα ενεργειακά μονοπάτια





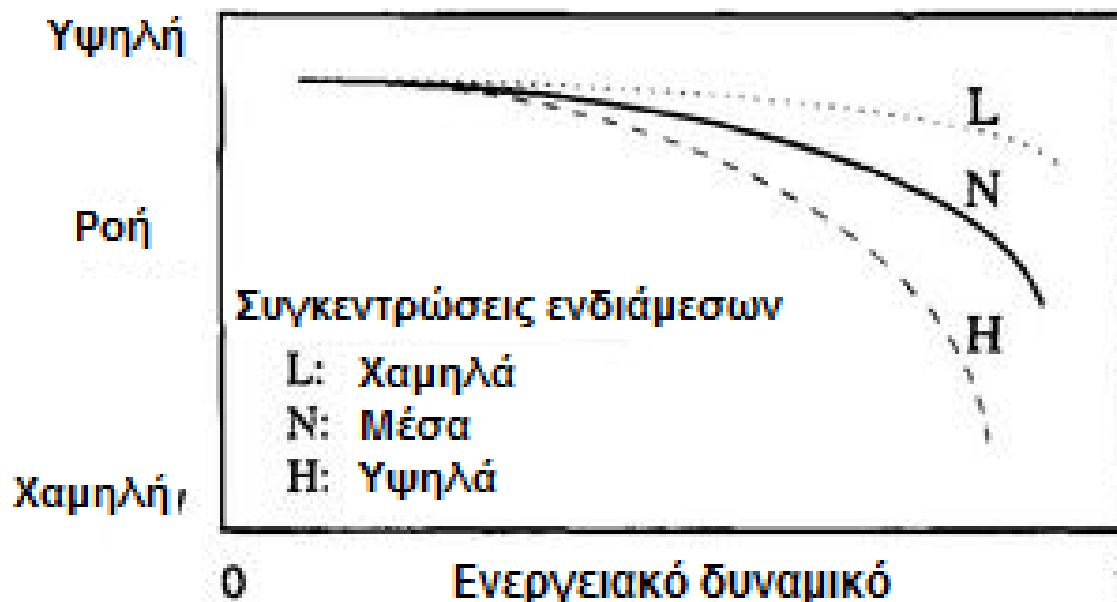
- Και στις δύο περιπτώσεις η αναστολή της αντίδρασης εξασκείται επί του ενζύμου (-ων) που καταλύει το πρώτο στάδιο της μονοπατιού. Εάν η γλυκόλυση ή ο κύκλος του κιτρικού ελέγχονταν μόνο με την αλλαγή του ενεργειακού δυναμικού, τότε η ροή μέσω αυτών των οδών θα μπορούσε να μειωθεί σημαντικά κάτω από συνθήκες άφθονης παροχής ενέργειας.
- Προκειμένου να ρυθμίσει ικανοποιητικά είναι απαραίτητη μια διαδικασία που να εξυπηρετεί ταυτόχρονα δύο λειτουργίες. Για το σκοπό αυτό έχει αναπτυχθεί ένας περίπλοκος μηχανισμός που απαιτεί δύο τύπους εισόδους:
  - Τη συγκέντρωση του επιπέδου των βιοσυνθετικών ενδιάμεσων
  - Ένδειξη του επιπέδου ενέργειας
- **Σήμα 1:** Το πρώτο σήμα βρίσκεται στο μονοπάτι του προϊόντος που τυπικά βρίσκεται σε αυστηρά αναβολική κατάσταση. Εν ολίγης είναι ένας απλός μηχανισμό ανάδρασης κατά τον οποίο το τελικό προϊόντος αναστέλλει το πρώτο βήμα της αντίδρασης
- **Σήμα 2:** Το δεύτερο σήμα είναι χαρακτηριστικό των αυστηρά καταβολών μονοπατιών και είναι η συγκέντρωση των ενδιάμεσων προϊόντων του ενεργειακού μεταβολικού κύκλου. (P<sub>i</sub>, AMP, ADP, NADPH, NADH)



- Στα αμφίβολα μονοπάτια χρησιμοποιούνται και οι δύο τύποι ελέγχου ροής (δηλαδή, της αναστολής από το τελικό προϊόν και τον έλεγχο της δραστηριότητας από τους μεταβολίτες που είναι δείκτες της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου). Όταν ένα από τα σήματα είναι χαμηλά η γλυκόλυση πρέπει να προχωρήσει, όταν και τα δυο βρίσκονται εντός του φυσιολογικού εύρους, η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα με σωστό ρυθμό κάτι που προκαλεί τη μείωση της ροής καθώς οι ανάγκες έχουν καλυφθεί
- Η εξισορρόπηση των ροών προς το σχηματισμού των πρόδρομων μεταβολιτών και προς τις βιοσυνθετικές ανάγκες περιλαμβάνει ένα εξαιρετικά περίπλοκο ρυθμιστικό μηχανισμό. Η ανάγκη συντονισμού εκτείνεται πέραν από τους μεταβολίτες που περιέχουν άνθρακα.
  - Αντιδράσεις πρέπει να παρέχουν ή να καταναλώνουν ενέργεια (NADH και NADPH) και δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αυτές οι ενώσεις είναι οι ίδιες αλλοστερικοί συντελεστές
- Η συνολική ρύθμιση της ροής με βάση το ενεργειακό δυναμικό υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{energy charge (EC)} = \frac{c_{ATP} + \frac{c_{ADP}}{2}}{c_{ATP} + c_{ADP} + c_{AMP}}$$





Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ενεργειακού φορτίου και τη συγκέντρωση των μεταβολικών ενδιάμεσων στη ρύθμιση των αμφίβολων οδών.



# Πολυλειτουργικά ένζυμα

- Πολυλειτουργικά είναι τα ένζυμα που διαθέτουν περισσότερα του ενός ενεργά κέντρα
  - έχουν την ικανότητα να καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις, με την ιδιότητα αυτή να είναι πιθανώς αποτέλεσμα σύντηξης γονιδίων.
  - Τα ένζυμα αυτά είναι σε θέση να καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις όχι , μόνο με διαφορετικά υποστρώματα αλλά και με τα ίδια. Παράδειγμα αποτελεί η ισοκιτρική αφυδρογονάση που μπορεί να οξειδώνει το ισοκιτρικό οξύ προς οξαλοηλεκτρικό αλλά και να αποκαρβοξυλιώνει το α-κετογλουταρικό
  - Πολυλειτουργικά ένζυμα όπως οι πολυκαταλυτικές πρωτεΐνες επιδεικνύουν εξειδίκευση για περισσότερους του ενός πεπτιδικού δεσμού
  - Άλλα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις με δυο διαφορετικά υποστρώματα, όπως η ασπαρτοκινάση η οποία φωσφορυλιώνει το L-ασπαραγινικό οξύ ενώ συγχρόνως μπορεί να οξειδώσει τη σερίνη με τη συμμετοχή του συνενζύμου NAD



# Μεταβολόνια

- Αναφέρεται σε μια ειδική περίπτωση διαμερισματοποίησης των ενζύμων. Στην ουσία πρόκειται:
  - Για σύμπλοκα μεταξύ των ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις και τα οποία εμπλέκονται σε μια συγκεκριμένη μεταβολική οδό η οποία λειτουργεί σε ένα μόνο κυτταρικό διαμέρισμα
  - Η σύνδεση των ενζύμων στο σύμπλοκο αυτό είναι πολύ χαλαρή
  - Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μεταβολόνια αποτελούν παράγοντες σε όλες σχεδόν τις μεταβολικές οδούς (γλυκόλυση, κύκλος κιτρικού οξέος, βιοσύνθεση)



# Ρόλος των πολυενζυμικών συμπλόκων και των μεταβολονίων

- Ο ρόλος των πολυενζυμικών συμπλόκων και των μεταβολονίων στη ρύθμιση των μεταβολικών λειτουργιών συνοψίζεται στα εξής:
  - Τα υποστρώματα διοχετεύονται απευθείας από το ένα ενεργό κέντρο στο άλλο χωρίς να απαιτείται πρώτα η απελευθέρωση στο περιβάλλον
  - Στην περίπτωση που τα ένζυμα ήταν ελεύθερα στο διάλυμα η εξισορρόπηση θα ήταν μια αργή διαδικασία. Αντίθετα με την παραγωγή συμπλόκων η διεργασία λαμβάνει χώρα ταχύτερα
  - Η απευθείας μεταφορά ενός προϊόντος σε ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας για το προϊόν σε περίπτωση που αυτό αποτελεί υπόστρωμα άλλων ενζύμων
  - Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων ενός μεταβολικού δρόμου έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη αλλοστερική ρύθμιση



***Thank you for your kind  
attention***



***[www.enve-lab.eu](http://www.enve-lab.eu)***

***A connectivity perspective to environmental health***