

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Μ. ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ  
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ  
ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ  
ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ  
ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ  
ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ  
ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ  
1980



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000349683



ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Μ. ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ  
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ  
ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ  
ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ  
ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ  
ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ  
ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ  
1980



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ

ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ  
ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΜΟΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ  
ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Ἡ ἔγκρισις διδακτορικῆς διατριβῆς ὑπὸ τῆς φυσικομαθημα-  
τικῆς σχολῆς τοῦ Πανεπιστημίου Ἰωαννίνων δέν ὑποδηλοῦ ἀποδο-  
χὴ τῶν γνώμων τοῦ συγγραφέως.

N. 5343/1932, ἀρθ. 202 2



ΑΥΤΟΓΡΑΦΟ  
1932



ᾠ Αφιερώνεται  
εἰς δασκάλας μου  
Μαρία καὶ Κική  
ᾠ Αποστολάκη



Ἡ διατριβή αὐτή ἐκπονήθηκε κάτω ἀπό τήν ἀμεση παρακολούθηση καί ἐποπτεία τοῦ Καθηγητή Β.Μ. Καπούλα, πού μοῦ πρόσφερε ἐμπειρη καθοδήγηση καί συγκινητική συμπαράσταση στήν ἀντιμέτωπιση κάθε μορφῆς ἀντιξοότητος. Ἐτσι, ἡ ἐκφραση ἑνός μεγάλου "εὐχαριστῶ" ἀπό τή θέση αὐτή εἶναι, πιστεύω, ἐλάχιστο χρέος μου.

Δέν εἶναι λιγότερο τό χρέος μου γιά τόν Καθηγητή Δ.Σ. Γαλανό, Διευθυντή τοῦ Ἐργαστηρίου Χημείας Τροφίμων τοῦ Πανεπιστημίου Ἀθηνῶν, πού λιγότερο ἀμεσα, ἀλλά ἐξ ἴσου συγκινητικά μοῦ πρόσφερε ὅλες τίς δυνατότητες, τίς ἀπαραίτητες γιά τήν ἐκπόνηση τῆς διατριβῆς μου.

Εὐχαριστῶ ἐπίσης τούς φίλους μου Ἐπιμελητές τοῦ παραπάνω ἔργαστηρίου Κ.Α. Δημόπουλο καί Ν. Γαλανοπούλου γιά τήν πολύτιμη βοήθειά τους.

Τόν συνάδελφο καί φίλο Κ.Α. Μασσαβέτα, χημικό-μηχανικό καί μαθηματικό, βοηθό τῆς Ἐδρας Φυσικοχημείας τοῦ Ε.Μ.Π. εὐχαριστῶ γιά τή βοήθειά του στή μαθηματική ἐπεξεργασία πολλῶν ἀπό τά πειραματικά δεδομένα τῆς διατριβῆς μου.

Τέλος, ὀφείλω νά εὐχαριστήσω ἀνώνυμα ὅλους τούς ἀμισθοὺς ἐπιστημονικοὺς συνεργάτες-μαθητές τοῦ Καθηγητή Β.Μ. Καπούλα, πού συντέλεσαν στήν ἐκτέλεση τῶν πειραμάτων μου καί στόν ὅλο προβληματισμό μου κατά τή διάρκεια τῆς δουλειᾶς μου.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.	
1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9	
2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10	
'Ισοένζυμα Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης	12	
Κινητική Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης	25	
3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41	
Σύνδεση μικρών όποκαταστατών	44	
Παραγωγή έξειώσεων	49	
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	63	
Πειράματα μέ όθαλικό όξυ	67	
Πειράματα μέ μυρμηκικό όξυ	69	
Πειράματα μέ $HgCl_2$	70	
Καμπύλες πειραμάτων	73	
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76	
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ		
Παράρτημα 1 , Λύση τής όμογραφικής έξειώσης	18	100
Παράρτημα 1α, 'Αντικατάσταση τής έξειώσης	19	
στήν έξειώση	15	102
Παράρτημα 2 , Τά νέα Μοριακά είδη καί οι		
σχέσεις, πού τά περιγράφουν		103
Παράρτημα 3 , 'Η λύση τής έξειώσης	21	106
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ		110
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		113



## 1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ἡ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση εἶναι ἓνα ἔνζυμο ἄλλοστερικό τόσο πολυσυζητημένο, ὅσο καί "ἄγνωστο", ἀλλά καί σταθερό στίς πειραματικές ταλαιπωρεῖες.

Ἡ κινητική τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης, ὅπως καί ὄλων τῶν ἄλλων ἄλλοστερικῶν ἔνζυμων, σέ συστήματα ἀναστολῆς, περιγραφόταν ὡς τώρα μέ τίς κλασσικές σχέσεις Michaelis-Menten καί Hill καί τίς σχέσεις, πού ἔχουν παραχθεῖ γιά τίς "συνεργατικές ἐπιδράσεις" μικρῶν ὑποκαταστατῶν σέ ὀλιγομερεῖς πρωτεΐνες ἀπό τοὺς Kirtley καί Koshland (μέ βάση τό ἄλλοστερικό πρότυπο τῶν Koshland-Nemethy-Filmer).

Οἱ σχέσεις αὐτές, πού ἀναφέρονται πιο πάνω, σχεδιάζονται συνήθως σάν ὑπερβολές, ἀλλά μέ ἀρκετή φαντασία καί ἀσάφεια ὡς πρὸς τὰ πειραματικά σημεῖα τους κάθε φορά.

Στήν ἐργασία αὐτή προσπάθησα νά συστηματοποιήσω πειράματα μέ ἀναστολεῖς τό ὀξαλικό καί τό μυρμηκικό ὀξύ, σέ ἔνζυμικά συστήματα Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης.

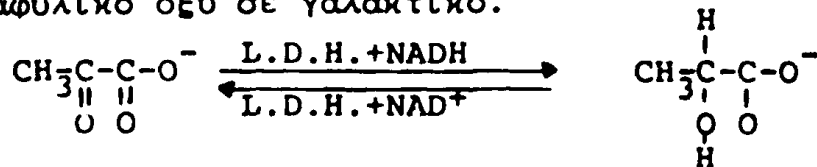
Τὰ πειράματα αὐτά εἶχαν ἐπιτυχία καί ἔδειξαν, γιά πρώτη φορά, τήν αἰτία αὐτῆς τῆς ἀσάφειας, πού μέχρι τώρα παρατηρούσαμε σέ διάφορα ἄλλοστερικά ἔνζυμα. Ἐδωσαν μιὰ νέα μορφή στίς πειραματικές καμπύλες. Γιά πρώτη φορά, ἐπίσης, ἐπιχειρήθηκε νά ἐξηγηθεῖ τό φαινόμενο αὐτό μέ τή λύση τῶν ἐξισώσεων-σχέσεων, πού προτείνουν οἱ Kirtley καί Koshland γιά τίς περιπτώσεις "συνεργατικῶν ἐπιδράσεων" σέ ὀλιγομερεῖς πρωτεΐνες. Οἱ σχέσεις αὐτές, ὅταν λύθηκαν σάν κλασσικές μαθηματικές σχέσεις (μέ κάποιες παραδοχές πού ἀπορρέουν ἀπό τή φυσική σημασία τῶν παραμέτρων) μᾶς ἐπαλήθευσαν ἀπό θεωρητική σκοπιά-τὰ πειράματα, ἀλλά ἔδειξαν κάτι ἀκόμα σπουδαιότερο. Ὅτι ἡ νέα αὐτή μορφή τῶν καμπυλῶν ἀναστολῆς μπορεῖ νά χρησιμεύσει γιά μετρήσεις τῶν ἐπί μέρους "μικροσκοπικῶν σταθερῶν" διαστάσεως, ταχύτητας, κ.ἄ., τῶν διάφορων ἔνζυμικῶν ὑπομονάδων, κάτι πού δέν μπορεῖ νά γίνει μέ τίς μέθοδες πού ὑπάρχουν καί τή μορφή τῶν καμπυλῶν ὅπως μέχρι τώρα σχεδίαζόταν.





## 2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τό ένζυμο Γαλακτική 'Αφυδρογονάση (L.D.H.) άπαντά σέ δλους τούς ζωϊκούς ιστούς, όπου κατά προτίμηση, μετατρέπει τό πυροσταφυλικό όξύ σέ γαλακτικό.



'Η Γαλακτική 'Αφυδρογονάση παίζει σημαντικό ρόλο στήν άναερόβια γλυκόλυση<sup>1</sup>. 'Η δομή του μόριου της Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης είναι τεταρτοταγής. 'Αποτελείται από τέσσαρες (4) υπομονάδες. Περιλαμβάνει, όμως δύο είδη υπομονάδων μέ διαφορετικό ίσοηλεκτρικό σημείο, πού στήν έλεύθερη μορφή τους δέν παρουσιάζουν ένζυματική δράση. Οι υπομονάδες αυτές συμβολίζονται συνήθως σαν Η και Μ, γιατί η πρώτη υπερέχει ποσοτικά σέ Γαλακτική 'Αφυδρογονάση, πού προέρχεται από καρδιά (Heart) και η δεύτερη από ένζυμο, πού προέρχεται από άλλους μύες (Muscle).

'Ισοένζυμα της Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης άπαντούν στή φύση πέντε, όσοι είναι δηλαδή οι δυνατοί συνδυασμοί των Η και Μ (H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, HM<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>) και μάλιστα η άναλογία κάθε ίσοένζυμου σέ ένα ιστό είναι όση άκριβώς προκύπτει, ύπολογιστικά, μέ τό νόμο των πιθανοτήτων (τυχαία κατανομή), μέ βάση την όλική συγκέντρωση των Η και Μ στόν ιστό αυτό.

Οι Appella και Markert βρήκαν ότι μερικά ίσοένζυμα κρυστάλλων Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης, από μύες καρδιάς βοδιού είναι δυνατό νά διασταθούν σέ τέσσαρες άνενεργές υπομονάδες ίσου μοριακού βάρους. 'Η κατεργασία έγινε μέ 1,25M ύδατικό διάλυμα ύδροχλωρικής γουανιδίνης και 0,1M ύδατικό διάλυμα Β-μερκαπτοαιθανόλης<sup>2</sup>. Όμως δέν μπόρεσαν νά τίς διαχωρίσουν σέ (δύο) τάξεις μέ βάση τό φορτίο τους.

'Εχει, ώστόσο άναφερθεί η ταυτοποίηση ενός άλλου ίσοένζυμου, πού βρέθηκε στα σπερματοζώαρια και τούς όρχεις άνθρώπου



καί λαγοῦ<sup>3-4</sup>.

Τό παραπάνω γεγονός, σέ συνδυασμό μέ τό διαχωρισμό τῶν ἄλλων πέντε ἰσοένζυμων σέ πολυάριθμες ζῶνες, κατά τήν ἠλεκτροφόρηση<sup>5-6</sup>, δείχνει ὅτι ἡ μοριακή φύση τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης εἶναι, ἴσως, περισσότερο πολύπλοκη ἀπό ὅτι προηγούμενα νομίζαμε.

Ἔχει προταθεῖ ὅτι τό νέο αὐτό ἰσοένζυμο ἀπό τά σπερματοζῶαρια καί τούς ὄρχεις, εἶναι ἓνα τετραμερές, πού ἀποτελεῖται ἀπό ὅμοιες νέες ὑπομονάδες Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης, τίς Χ ὑπομονάδες ὅπως ἀναφέρονται. Ἡ σύνθεσή τους ἔχει ρυθμιστεῖ ἀπό ἓνα τρίτο γονίδιο διαφορετικό ἀπό αὐτά, πού ἔχουν ρυθμίσει τή σύνθεση τῶν ὑπομονάδων Η καί Μ<sup>7</sup>.

Οἱ ἐνζυματικές ιδιότητες τοῦ καθαροῦ Χ<sub>4</sub> ἰσοένζυμου ἀπό ἄνθρωπο ἢ λαγό φαίνονται στό πίνακα Ι μαζύ μέ τίς ιδιότητες τῶν Μ<sub>4</sub> καί Η<sub>4</sub> ἰσοένζυμων, ἀπό τίς ἴδιες πηγές.

Τά ἀποτελέσματα δείχνουν ὅτι τό Χ<sub>4</sub> ἰσοένζυμο, ἀπό λαγό ἔχει ἐνζυματικές ιδιότητες ὅμοιες μέ αὐτές τοῦ Η<sub>4</sub> ἰσοένζυμου, ἀπό λαγό.

Τά ἰσοένζυμα Χ<sub>4</sub> καί Η<sub>4</sub>, ἀπό λαγό, ἔχουν μέγιστη ἐνεργότητα μέ διάλυμα 15,0mM L-γαλακτικοῦ, ἐνῶ τά ἀντίστοιχα ἰσοένζυμα ἀπό ἄνθρωπο, ἔχουν μέγιστη ἐνεργότητα μέ διάλυμα 25,0mM L-γαλακτικοῦ.

Γιά τό πίνακα Ι, τά διαλύματα-κατά τήν ἀντίδραση-περιεῖχαν τίς ἀναγκαῖες ποσότητες ὑποστρώματος  $6,6 \times 10^{-2}$  M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH = 7,4 καί ἀπό 0,33mM NADH ἢ  $553 \times 10^{-2}$  mM NAD<sup>+</sup> (ἐξαρτᾶται ἀπό τό ὑπόστρωμα πού χρησιμοποιεῖται).

Τά διαγράμματα 1,2,3, πού ἀκολουθοῦν τό πίνακα Ι, μάς δίνουν περισσότερο παραστατικά τήν εἰκόνα τῆς ὁμοιότητος ἢ τῆς κάποιας μικρῆς διαφορᾶς τοῦ Χ<sub>4</sub> ἰσοένζυμου (ἀπό ἄνθρωπο ἢ λαγό σέ διάφορες ἀντιδράσεις) ἀπό τά Η<sub>4</sub> καί Μ<sub>4</sub> ἰσοένζυμα.



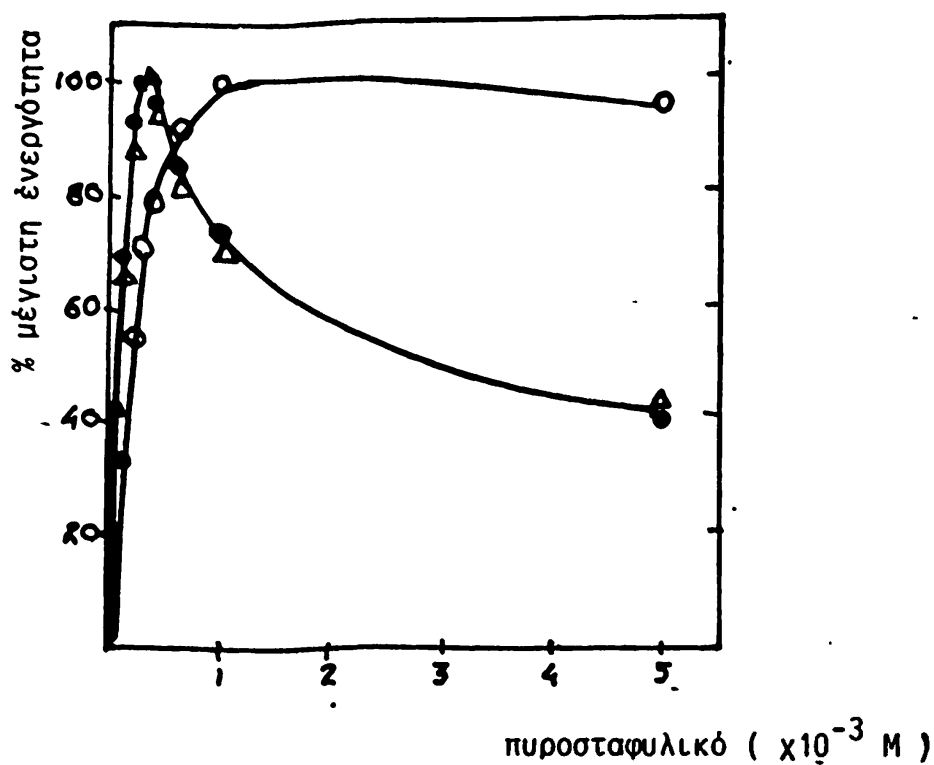
Π Ι Ν Α Κ Α Σ     Ι

ΜΕΡΙΚΕΣ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ  $X_4$ ,  $H_4$ ,  $M_4$ , ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ  
ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΛΑΓΟ

Ιδιότητα	Ισοένζυμα λαγού			Ισοένζυμα ανθρώπου	
	$X_4$ mM	$H_4$ mM	$M_4$ mM	$X_4$ mM	$M_4$ mM
1. Ελάχιστη συγκέντρωση του υποστρώματος.					
α) L-γαλακτικού	15,00	15,00	150,0	25,000	25,000
β) Πυροσταφυλικού	0,30	0,30	1,0	0,300	0,300
γ) α-κετοβουτυρικού	4,00	4,00	-	2,000	3,500
δ) L-α-υδροξυβουτυρικού	125,00	125,0	-	7,500	75,000
ε) Γλυκοξυλικού	5,00	5,00	-	-	5,000
ς) α-ισοκετοβαλερικού	7,50	-	-	-	7,500
	βραδεία				βραδεία
ζ) L-α-υδροξυ-κ-βαλερικού	δεν γίνεται αντίδραση	-	-	250,000	-
				βραδεία	
2. Τιμές της $K_m$ .					
α) Πυροσταφυλικού	0,10	0,10	0,35	0,017	0,012
β) L-γαλακτικού	1,60	1,50	23,00	0,660	0,950
γ) α-κετοβουτυρικού	0,42	0,45	-	0,760	0,830
δ) L-α-υδροξυβουτυρικού	10,00	10,00	-	-	-
3. Λόγος των ενεργοτήτων της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης στην ελάχιστη συγκέντρωση υποστρώματος.					
α) α-κετοβουτυρικού ως προς πυροσταφυλικό	0,91	0,78	-	1,440	0,840
β) L-α-υδροξυβουτυρικού ως προς L-γαλακτικό	0,47	0,33	-	-	-



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (1)

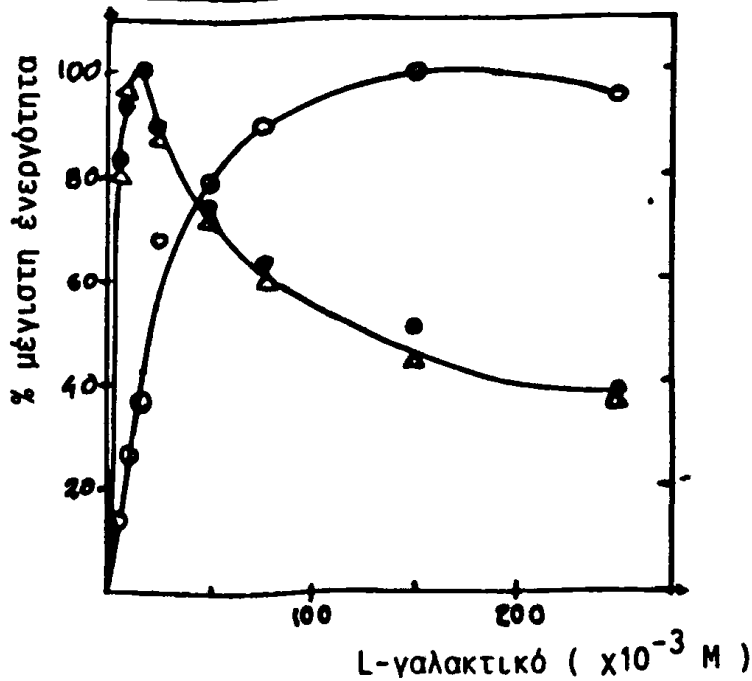


Επίδραση της συγκέντρωσης πυροσταφυλικού (υπόστρωμα) σε ισοένζυμα X<sub>4</sub>, H<sub>4</sub>, M<sub>4</sub> από λαγό. Οι αρχικές ταχύτητες (ένεργότητες) αντίδρασης παίρνονται σαν τό % της μέγιστης ταχύτητας.

Τά σημεία με (•) για τό X<sub>4</sub> ισοένζυμο  
 " " " (Δ) " " H<sub>4</sub> "  
 " " " (Ο) " " M<sub>4</sub> "

Συγκέντρωση NADH = 0,333mM, Buffer φωσφορικών PH=7,4  
 και συγκέντρωσης 6,6x10<sup>-4</sup> M.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ (2)

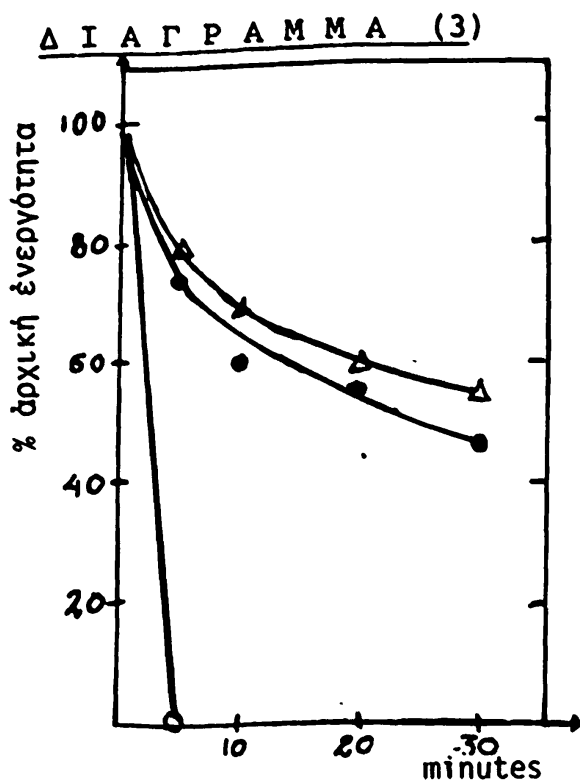


Έπίδραση της συγκέντρωσης L-γαλακτικού (υπόστρωμα) σε ισοένζυμα X<sub>4</sub>, H<sub>4</sub>, M<sub>4</sub> από λαγό.Οι άρχικες ταχύτητες (ένεργότητες) αντίδρασης παίρνονται σαν τό % της μέγιστης ταχύτητας.

Τά σημεία με (●) για τό X<sub>4</sub> ισοένζυμο  
 " " " (Δ) " " H<sub>4</sub> "  
 " " " (○) " " M<sub>4</sub> "

Συγκέντρωση NAD<sup>+</sup> = 5,53mM, Buffer φωσφορικών PH = 7,4  
 και συγκέντρωσης 6,6 × 10<sup>-2</sup> M.





Σταθερότητα ως προς τη θερμοκρασία των ισοένζυμων X<sub>4</sub> , H<sub>4</sub> , M<sub>4</sub> Γαλακτικής Αφυδρογονάσης από λαγό. Η ενεργότητα του ένζυμου παίρνεται σαν τό % της αρχικής ενεργότητας, ως προς τό χρόνο (σε λεπτά),

για τό X<sub>4</sub> (ισοένζυμο (•))

" " H<sub>4</sub> " (Δ)

" " M<sub>4</sub> " (Ο)

Η συγκέντρωση του NAD<sup>+</sup> είναι 5,53mM, Buffer φωσφορικών pH = 7,4 και συγκέντρωσης 6,6x10<sup>-2</sup>M.

Η ενεργότητα για τά ισοένζυμα X<sub>4</sub> και H<sub>4</sub> υπολογίστηκε μέ 15,0mM L-γαλακτικού ενώ για τό M<sub>4</sub> μέ 250mM L-γαλακτικού.

Γιά τή Γαλακτική 'Αφυδρογονάση από μύες, πρώτος έχει αναφέρει ο Meyerhof<sup>8</sup> καί στή συνέχεια οί Szent-Györgyi<sup>9-10</sup>, Von Euler, Green καί οί συνεργάτες τους.

Τό κρυσταλλικό ένζυμο τής Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης, απομονώθηκε πρώτα από τόν Straub<sup>11</sup> από καρδιά βοδιού. 'Από τήν ίδια πηγή, έγινε απομόνωση του ένζυμου από τόν Neilands<sup>12</sup> μέ αρκετά βελτιωμένο τρόπο.

Τό κρυσταλλικό ένζυμο έδειξε μιά μόνο στοιβάδα στήν υπερφυγόκεντρο, αλλά καί ή ηλεκτροφόρηση καί ή έξαλάτωση, έδειξαν τή παρουσία καταλυτικά ένεργών συστατικών.<sup>13-14</sup> Τά κλάσματα διαχωρίστηκαν μέ ηλεκτροφόρηση καί χαρακτηρίστηκαν σάν Α καί C αντίστοιχα πρός τά ηλεκτρόδια ανόδου καί καθόδου του στοιχείου διαχωρισμού.

Τό κλάσμα Α (τό μεγαλύτερο συστατικό) είναι περίπου τό 75% τής όλικής πρωτεΐνης. Τά συστατικά Α καί C τής Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης δέν διαχωρίζονται μέ ανακρυστάλλωση. Τό συστατικό Α μετά από ανακρυστάλλωση από θειικό άμμώνιο συμπεριφέρεται στό ηλεκτροφορητικό στοιχείο σάν άπλό συστατικό.

Ο Meister<sup>15</sup> έχει αναφέρει ότι ή σταθερά καθίζησης  $S_{20}$  για τό συστατικό Α ήταν  $6,8 \times 10^{-13}$  sec καί για τό συστατικό C  $6,36 \times 10^{-13}$  sec. Ο Neilands αναφέρει ότι ή  $S_{20}$  είναι  $7,0 \times 10^{-13}$  sec για τά δύο συστατικά για τίς διεργασίες, πού αναφέρονται στή προηγούμενη παράγραφο.

Η σταθερά έλεύθερης διάχυσης  $D_{20}$  βρέθηκε  $5,3 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec για τό συστατικό Α. Μέ βάση τά δεδομένα αυτά τό μοριακό βάρος τής Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης από καρδιά βοδιού υπολογίστηκε ότι είναι τής τάξης  $135000 \pm 15000$ .

Ο συντελεστής απόσβεσης τής Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης για μήκος κύματος 280mμ, βρέθηκε ότι είναι ίσος μέ 149 για συγκέντρωση ένζυμου 1mg/ml καί για κυψελίδα πάχους 1cm. Οί Hakala - Schwert<sup>16</sup> έχουν αναφέρει τιμή 1,30 για παρασκεύασμα, πού πίστευαν ότι περιέχει τό 1/3 του ένεργου ένζυμου.



Τό ένζυμο Γαλακτική 'Αφυδρογονάση είναι σταθερό στό pH καί τίς θερμοκρασίες,πού χρησιμοποιήθηκαν γιά τήν άπομόνωσή του από διάφορες πηγές. 'Υπῆρξε ὅμως βαθμωτή μείωση τῆς ένεργότητάς του σέ τιμές pH μεγαλύτερες τῆς 8,5 καί μικρότερες τῆς 5,0<sup>17</sup>.

Προσδιορισμός τῶν άμινοξέων τῆς Γαλακτικῆς 'Αφυδρογονάσης έχει γίνει μέ ὀξινη ὑδρόλυση τοῦ ένζυμου (άπό συκώτι άρουραίου) καί παρουσιάζεται στό πίνακα II.

'Η άνάλυση έγινε μέ μέθοδες μικροβιολογικές. 'Η θρυπτοφάνη ὑπολογίστηκε μέ βάση τά δεδομένα,πού προκύψανε από τήν άπορρόφηση τῆς ὀλικῆς πρωτεΐνης μετά από σχετική διόρθωση τῆς περιεχόμενης Τυροσύνης.

Τά άμινοξέα,πού βρέθηκαν, ὑπολογίστηκαν σάν τό 93,5% τῆς συνολικῆς πρωτεΐνης καί παριστάνουν τουλάχιστον 1065 άμινοξέα γιά κάθε μόριο ένζυμου. Γιά 'Αλανίνη καί 'Υδροξυπρολίνη δέν έγινε άνάλυση. Τό άθροισμα τῶν áτόμων áζώτου τῶν άμινοξέων γιά κάθε μόριο ένζυμου ὑπολογίστηκε ὅτι είναι 1323. Αὐτή ἡ τιμή μπορεῖ νά συγκριθεῖ μέ αὐτή τῶν 1332 áτόμων áζώτου, γιά κάθε μόριο ένζυμου, ὅπως προσδιορίζεται χωριστά μέ άνάλυση κατά Kjeldahl. Τό πιό καταπληκτικό άποτέλεσμα τῆς άνάλυσης τῶν άμινοξέων τῆς Γαλακτικῆς 'Αφυδρογονάσης ἦταν ἡ ὑψηλή περιεκτικότητα σέ Βαλίνη καί 'Ισολευκίνη.

Γιά τίς τιμές,πού δίνονται στό πίνακα II, πρέπει νά ποῦμε ὅτι ὑπόκεινται στό σφάλματα τῆς μικροβιολογικῆς άνάλυσης.





Π Ι Ν Α Κ Α Σ    Ι Ι

Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΜΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΥΚΩΤΙ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Αμινοξύ	Γραμμάρια τών άμινοξέων ανά 100g πρωτεΐνης	Γραμμάρια τών άμινοξέων ανά MOLE πρωτεΐνης
Λευκίνη	11,6	129
Βαλίνη	10,7	136
Ίσολευκίνη	7,4	82
Γλυκίνη	4,3	95
Αλανίνη	*	*
Σερίνη	6,2	90
Θρεονίνη	2,7	34
Μεθειονίνη	2,1	20
Κυστεΐνη-Κυστίνη	1,3	16
Φαινυλαλανίνη	2,7	23
Τυροσίνη	2,5	19
Θρυπτοφάνη	3,3	22
Προλίνη	5,1	66
Υδροξυπρολίνη	*	*
Λυσίνη	8,8	87
Αργινίνη	4,8	39
Ίστιδίνη	1,7	16
Άσπαρτικό όξύ	10,3	113
Γλουταμινικό όξύ	8,0	78
<b>ΟΛΙΚΟ</b>	<b>93,5</b>	<b>1065</b>



Ἡ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση καταλύει τή μετατροπή τοῦ γαλακτικοῦ ὀξέος σέ πυροσταφυλικό ὀξύ, μέ  $\text{NAD}^+$  σάν συνένζυμο καί ἀντίστροφα, τοῦ πυροσταφυλικοῦ ὀξέος σέ γαλακτικό ὀξύ μέ  $\text{NADH}$  σάν συνένζυμο.

Ὁ Rossmann καί οἱ συνεργάτες του ἔχουν ἀναφέρει μιὰ δομή  $2,8 \text{ \AA}$  γιά τό  $M_4$  ἰσοένζυμο ἀπό καρχαρία, καθὼς καί δομή χαμηλῆς διαχωριστικῆς ἱκανότητος γιά τό σύμπλοκο Γαλακτική Ἀφυδρογονάση- $\text{NAD}^+$ -πυροσταφυλικό ὀξύ.<sup>18-19</sup>

Αὐτός εἶναι ὁ πρῶτος προσδιορισμός δομῆς γιά ἔνζυμο, πού ἔχει περισσότερες ἀπὸ μιὰ ὑπομονάδες, καταλύει μιὰ ἀντίδραση ὀξειδοαναγωγική καί ἀπαιτεῖ σάν συνένζυμο πυριδινο-νουκλεοτίδιο. Τό ἀποένζυμο καί τό τριτοταγές σύμπλοκο ἔχουν ὑψηλή συμμετρία.

Τρεῖς διπλοὶ ἄξονες διασταυρῶνονται στό κέντρο τοῦ τετραμεροῦς. Τό δυαδικό ὀλοένζυμο ἔχει χαμηλότερη συμμετρία καί ἓνα ἄξονα<sup>20</sup>.

Ὁ πίνακας III δίνει τό σύνολο τῶν κύριων χαρακτηριστικῶν τῆς δομῆς τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης. Τό ἀποένζυμο ἔχει τό 35%, περίπου, τῆς ἀλυσίδας του σέ μορφή α-ἑλικας, 10%-15% σέ παράλληλη καί ἀντιπαράλληλη β-δομή καί τό 5% σέ μορφή  $3_{10}$  ἑλικας.

Ἐκτός τῶν 20 ἀμινοξέων (ἄκρο μέ τήν ἐλεύθερη ἀμινομάδα τοῦ πολυπεπτίδιου) ἡ ὑπομονάδα ἔχει σχῆμα σφαιρικό. Εἶναι δυνατό νά τή δοῦμε καί σάν δύο μισά, πού διαχωρίζονται ἀπὸ μιὰ ἀρκετά σημαντική "σχισμή" μέ τρεῖς ἀλυσίδες συνδεμένες σέ αὐτά. Τό ἀριστερό τμήμα ἀποτελεῖται ἀπὸ τό ἄκρο τῆς ἐλεύθερης ἀμινομάδας τοῦ πολυπεπτίδιου, κύρια, μέ τά 130 ἀμινοξέα καί ἔχει τή μεγαλύτερη ἀναλογία τῆς κανονικῆς δευτεροταγοῦς μορφῆς. περιέχει τέσσαρες α-ἑλικες (42 ἀμινοξέα) καί μιὰ προέκταση ἀπὸ ἓνα παράλληλο πτυχωτό φύλλο (23 ἀμινοξέα).

Τό σημεῖο, πού ἡ ἀδενίγη τοῦ συνένζυμου προσκολλᾶται στήν ὑπομονάδα τοῦ ἔνζυμου, βρίσκεται μέσα σ' αὐτό τό τμήμα τῆς ὑπομονάδας. Τό σημεῖο ὅπου τό νικοτιναμίδιο τοῦ συνένζυμου προσκολλᾶται στήν ὑπομονάδα τοῦ ἔνζυμου, βρίσκεται πάνω στό πτυχωτό φύλλο.



Τό δεξιό μισό, μέ τή λιγώτερο φανερή δευτεροταγή δομή, περιέχει τό ούσιώδες πεπτίδιο τής θειόλης, πού συνορεύει επίσης μέ τό πτυχωτό φύλλο. Τά άμινοξέα από 199 ως 209 σχηματίζουν φτερόσχημο χαρακτηριστικό τμήμα, πού είναι ένα τμήμα του σύνορου του δεξιού μισού μέ τό διαλύτη.

Στό εμπρός τμήμα τής ύπομονάδας τά δύο μισά συνδέονται μέ μιá δχι τέλεια αντιπαράλληλη πτυχωτή ταινία, πού σχηματίζει επίσης ένα σύνορο τής ύπομονάδας.

Τά άμινοξέα από 289 ως 300 τής έλικας θ διαφέρουν έλαφρά από τήν υπόλοιπη ύπομονάδα. Είναι καντά στό τέρμα, τό τελευταίο άτομο άνθρακα (τής έλεύθερης καρβοξυλομάδας). Τά υπόλοιπα άμινοξέα είναι μιá έκτεταμένη πυκνή άλυσίδα, πού στό τέλος της είναι ή φαινυλαλανίνη.

Υπάρχει κάποια άμφιβολία για τό πόσο συνδυάζεται ή πυκνότητα των άμινοξέων από 1 ως 20 μέ τό σώμα του μόριου. Η πιό προφανής μορφή έχει τό πλευρό της μέ τήν έλεύθερη άμινομάδα του πολυπεπτίδιου σαν βραχίονα, πού έκτείνεται και έξω από τό κλοιό μιáς γειτονικής άμινομάδας. Άλλες ύπομονάδες έχουν έπαφή μέ τίς έλικες Α, Β, Γ, τήν αντιπαράλληλη ταινία και τά άμινοξέα από 160 ως 170, διά μέσου των φτερόσχημων τμημάτων. Ούσιώδες άμινοξύ είναι ή Κυστεΐνη (195).

Τό τριτοταγές σύμπλοκο Γαλακτική Άφυδρογονάση-πυροσταφυλικό -NAD<sup>+</sup>, όταν έξετάζεται από κρυσταλλογράφο δέν παρουσιάζεται τέλειο, διότι οι ύποκαταστάτες παράγουν και ύποστρώματα. Τά ύποστρώματα πιστεύεται ότι μοιάζουν σαν τά τριτοταγή σύμπλοκα πού λαβαίνουν μέρος στην αντίδραση.

Τό νουκλεοτίδιο συνδέεται, όμοια, στό όλοένζυμο και τό τριτοταγές σύμπλοκο.<sup>21-22</sup> Η διαμόρφωση του ένωμένου συνένζυμου είναι περίπου σαν ένα V και οι βάσεις διαχωρίζονται από τή πρωτεϊνική άλυσίδα, πού υπάρχει μεταξύ τους. Τό μισό από τό νοκοτιναμίδιο βρίσκεται μάζε στό πτυχωτό φύλλο και είναι δυνατό νά συμβαίνει άνταλλαγή ήλεκτρονικής πυκνότητας μέ τό πυροσταφυλικό. Ο κρίκος από 86 ως 109 αναδιπλώνεται και κλείνει τό πτυχωτό φύλλο του σύμπλοκου. Μετακινείται 12Å από τή



## Π Ι Ν Α Κ Α Σ Ι Ι Ι

## ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Αμινοξέα	Δευτεροταγής δομή	Σχόλια-Παρατηρήσεις
1 6	α-έλικα Α	Αμφιβολία για το άκρο της ελεύθερης αμινομάδας του πολυπεπτιδίου.
20 22 26	Παράλληλο πτυχωτό φύλλο, πρώτη διέλευση	
32 40	α-έλικα Β	
45 48	Παράλληλο πτυχωτό φύλλο, δεύτερη διέλευση	
55 61	α-έλικα Γ	
70 72	Παράλληλο πτυχωτό φύλλο, τρίτη διέλευση	
79 86	Παράλληλο πτυχωτό φύλλο, τέταρτη διέλευση	Αναδίπλωση, που είσιχωρεί στη τριτοταγή δομή του όχι τέλεια τριτοταγούς σύμπλοκου.
95 106	α-έλικα Δ	
109 118	α-έλικα Ε	
121 123	Παράλληλο πτυχωτό φύλλο, πέμπτη διέλευση	
144 153		Ουσιώδες πεπτιδίο της θειόλης.
155 156	α-έλικα Ζ	
194 205		Φτερόσχημο τμήμα.
229 242	α-έλικα Η	
245 261	Αντιπαράλληλη ταινία, πρώτο σύνορο (άκρο)	
262 276	Αντιπαράλληλη ταινία, δεύτερο σύνορο (άκρο)	
277 283	Αντιπαράλληλη ταινία, τρίτο σύνορο (άκρο)	
289 300	α-έλικα Θ	
311		Τό άκρο της ελεύθερης καρβοξυλομάδας του αμινοξέος της Φαινυλαλανίνης.



θέση του στο άποένζυμο. Συνδιασμένα με την αλλαγή αυτή είναι:

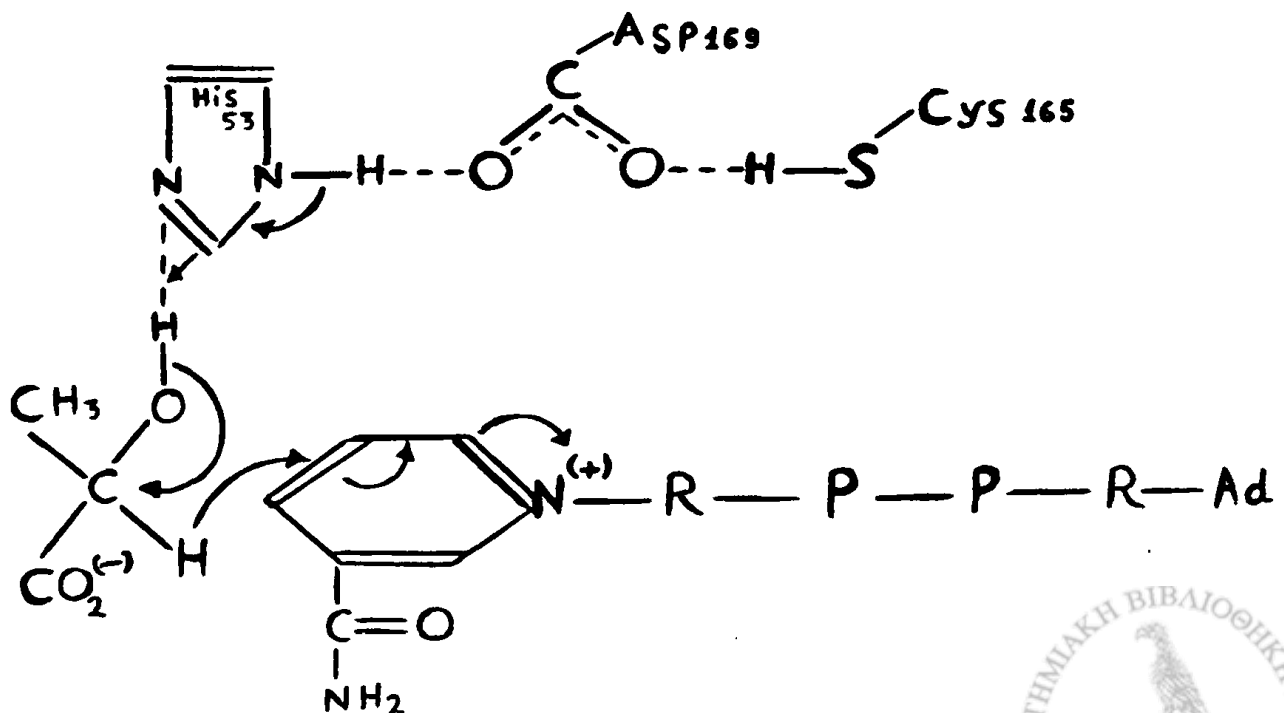
- α) Μία άναγωγή του ύψους του μόριου κατά 6Å
- β) 68 άναγωγή στον όγκο της μονάδας
- γ) Μετακίνηση κατά 3Å της έλικας θ.

Αύτες οι ένδοϋπομοναδικές διαμορφωτικές αλλαγές είναι ή πιο έκπληκτική παρατήρηση, σε συνδυασμό με την όλη συμπεριφορά του ένζυμου της Γαλακτικής Άφυδρογονάσης.

Άκόμη ένα σπουδαίο γεγονός είναι οι μετρήσεις ταχένων αντιδράσεων, πού έχουν δείξει ότι οι αλλαγές διαμορφώσεων μπορεί νά είναι οι βραδείες αντιδράσεις, πού τελικά ρυθμίζουν τη κινητική συμπεριφορά των αντιδράσεων της Γαλακτικής Άφυδρογονάσης.<sup>23-24-25</sup>

Η επίδραση, πού παράγεται με πρότυπο διάφραγμα, όταν έμβαπτίζονται κρύσταλλοι άποένζυμου σε διαλύματα άναλόγων του συνένζυμου, έδειξε ότι τό AMP είναι ό μικρότερος ύποκαταστάτης, πού προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση. Τό νικοτιναμίδιο συνενουόται χωρίς αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης. Τό μονονουκλεοτίδιο του νοκοτιναμίδιου και τό κεντρικό στοιχείο Ριβόζης-Φωσφορικού δέν συνενουόται.

Ο Rossmann και οι συνεργάτες του πρότειναν τόν άκόλουθο μηχανισμό για τη μεταλλαγή κατά τη σύνδεση.



Ο κεντρικός παράγοντας είναι η κατάλυση γενικής βάσης από την  $\text{His}_{53}$ , που εμφανίζεται να είναι μέρος ενός δύκτιου υδρογονικών δεσμών.

Εκτός από την ενεργή περιοχή, που επίσης έχει την ουσιώδη κυστεΐνη και  $\text{Asp}_{169}$ , δέ γνωρίζουμε αντιδράσεις οποιουδήποτε μοντέλου, που να φέρουν τό μηχανισμό, που προτείνεται παραπάνω. Έδω έχει σημειωθεί<sup>26</sup> ένα θεωρητικό αλλά παράτολμο ανάλογο μεταξύ της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης και της Αφυδρογονάσης της Φωσφορικής Τριόζης.

Έχει αναφερθεί από τό Straub ότι η Γαλακτική Αφυδρογονάση, από καρδιά βοδιού, κρυσταλλούται με δύο μορφές καταλυτικά ενεργών συστατικών, που μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση.

Η Γαλακτική Αφυδρογονάση όξειδώνει τό Γαλακτικό όξύ. Δέν έχει όμως παρατηρηθεί ενεργότητα με τό Δεγαλακτικό όξύ.

Η γενική αντίδραση :

Γαλακτικό όξύ +  $\text{NAD}^+$   $\rightleftharpoons$  Πυροσταφυλικό όξύ +  $\text{NADH} + \text{H}^+$   
 ίσχύει και η μέση τιμή της σταθεράς ίσορροπίας της είναι :

$$K = \frac{\text{Πυροσταφυλικό} \times \text{NADH} \times \text{H}^+}{\text{Γαλακτικό} \times \text{NAD}^+}$$

Με χαμηλές συγκεντρώσεις ένζυμου ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$  ως  $10 \times 10^{-7} \text{M}$ ) βρέθηκε ότι η σταθερά  $K$  έχει τιμή  $0,33 \times 10^{-11}$  και σε περιοχή  $\text{pH}$  από 7,0 ως 10,0. Η τιμή αυτή πολλαπλασιάζεται με 50 ή με 36 σε  $\text{pH}=7,0$  και 8,0 αντίστοιχα, όταν η συγκέντρωση του ένζυμου αύξάνει και γίνεται μεγαλύτερη από τή συγκέντρωση του  $\text{NADH}$ .

Τό πυροσταφυλικό όξύ είναι τό υπόστρωμα, που εύκολα ανάγεται. Σύμφωνα με τό Meister τό ένζυμο ανάγει επίσης α-κετο και α,γ-δικετονοξέα. Όστόσο τά α-κετοϊσοκαπροϊκό, όξαλοξεικό, α-κετογλουταρικό, β-κετονοξέα και δ-κετονοξέα ανάγονται με μηδενικές ταχύτητες σχεδόν, ή δέν ανάγονται καθόλου. Άλλες άνενεργές ένώσεις είναι ή άκεταλδεϋδη, ή άκετόνη, ή μεθυλοαιθυλοκετόνη και ή 3,6-διμεθυλο-2,5-ρ-διοξανοδιόνη.



Άραιά διαλύματα του κρυσταλλικού ένζυμου παραμένουν, διατηρώντας όλη τους την ενεργότητα, για μερικές ημέρες σε διάλυμα 0,1M ρυθμιστικό φωσφορικών, pH = 7,0 και σε θερμοκρασία δωματίου.

Ένώ πρωτόνια συμμετέχουν στη καταλυτική αντίδραση, η ενεργότητα του ένζυμου εξαρτάται από πολύ ύψηλές και πολύ χαμηλές τιμές pH.

Τό ένζυμο Γαλακτική Άφυδρογονάση, δείχνει τεράστια σταθερότητα ως προς κοινούς αναστολείς. Ο Neilands έδειξε<sup>27</sup> ότι 30 λεπτά έκκόλαψη με p-Chloromercuric benzoate οδηγείται σε πλήρη απενεργοποίηση. Η ενεργότητα όμως επανέρχεται με Κυστεΐνη. Σε συγκριτικά όμοιες συνθήκες άλλα σουλφυδρύλο-αντιδραστήρια, όπως τα o-Iodosobenzoate, Iodoacetate και N-Ethylmaleimide δέν αντιδρούν. Τό ιώδιο και οι άνόργανες ένώσεις του υδράργυρου και σε άραιά άκόμη διαλύματα, είναι ίσχυροί αναστολείς<sup>28</sup>.

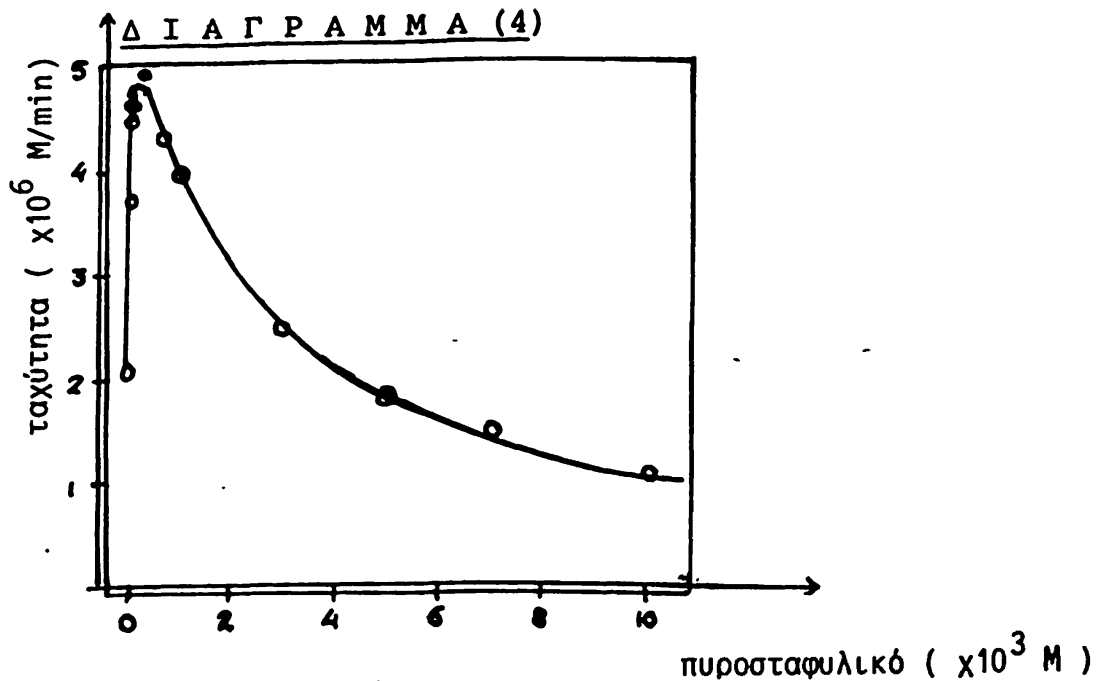
Η περιοχή συγκεντρώσεων, πού μπορούν να γίνουν κανονικοί κινητικοί προσδιορισμοί είναι περιορισμένη, διότι οι προσδιορισμοί αυτοί γίνονται με αντιδραστήρια, πού οι συγκεντρώσεις τους είναι άρκετά ύψηλές ως προς τή σταθερά Michaelis. Πάρα πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις αντιδρώντων οδηγούν σε άναστολή ύποστρώματος (Substrate Inhibition).

Τό διάγραμμα 4 δίνει τή μορφή τής καμπύλης για άναστολή ύποστρώματος με ύπόστρωμα πυροσταφυλικό<sup>29</sup>. Η καμπύλη ύπολογίστηκε από τήν έξίσωση των Lineweaver-Burk<sup>30</sup>, για άναστολή ύποστρώματος, με τιμές  $1,8 \times 10^{-5}$  για τή Km για τό πυροσταφυλικό,  $2,5 \times 10^{-3}$  για τή σταθερά διάστασης για τό ένωμένο μόριο του πυροσταφυλικού και  $6,0 \times 10^{-6}$  Mol/min για τή μέγιστη ταχύτητα.

Τά σημεία είναι πειραματικά. Η συγκέντρωση του NADH ήταν  $1,29 \times 10^{-5}$  M, τής Γαλακτικής Άφυδρογονάσης, κατά προσέγγιση 0,02γ/ml και η θερμοκρασία του πειράματος 27,5 °C.

Ο προσδιορισμός έλαβε χώρα σε 0,05M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH = 6,8.





Ἀναστολή τῆς ἀναγωγῆς τοῦ πυροσταφυλικοῦ (ἀντίδραση, πού καταλύεται ἀπό Γαλακτική Ἀφυδρογονάση) γιὰ ὑψηλές συγκεντρώσεις πυροσταφυλικοῦ

Τά δεδομένα τοῦ παραπάνω πειράματος, κατά τό συγγραφέα, ἀκολουθοῦν τήν ἐξίσωση:

$$\frac{V_{\max}}{v} = 1 + \frac{K_A}{A} + \frac{K_B}{B} + \frac{K_{AB}}{AB} \quad (1)$$

ὅπου :  $v$  ἀρχική ταχύτητα ἀντίδρασης

$V_{\max}$  μέγιστη ταχύτητα ἀντίδρασης, ὅταν τά ὑποστρώματα  $A$  καί  $B$  παρίστανται σέ ὑψηλές συγκεντρώσεις, σχετικά, πρὸς τίς ἀντίστοιχες σταθερές  $K_A$ ,  $K_B$  γι' αὐτά. Ἡ  $K_{AB}$  εἶναι μιὰ σύμπλοκη σταθερά.





Σέ περιπτώσεις όπου δέν υφίσταται αναγκαστική σειρά συνδέσεων τών υποστρωμάτων, ή  $K_{AB}$  είναι ή σταθερά διάστασης γιά τό τριτοταγές σύμπλοκο E-A-B σέ έλεύθερο ένζυμο E, έλεύθερο υπόστρωμα A και έλεύθερο υπόστρωμα B. Παρ' όλα αυτά όμως, είναι γνωστό από μερικούς έρευνητές ότι ή φύση τών  $K_A$ ,  $K_B$  σταθερών, έξαρτάται από τό προτεινόμενο μηχανισμό γιά τήν αντίδραση.

Σέ μιά τυπική περίπτωση οί κινητικές σταθερές υπολογίστηκαν από τά δεδομένα τών Lineweaver-Burk γιά διαγράμματα αντίστροφων τών άρχικων ταχυτήτων ως πρός τίς αντίστροφες συγκεντρώσεις του πυροσταφυλικού και γιά όρισμένα σταθερά επίπεδα συγκεντρώσεων του NADH.

Γιά κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων NADH τά δεδομένα περιγράφουν μιά γραμμή, πού συναντά τόν άξονα  $1/V$  ( $1/P \approx 0$ ) στή τιμή  $1/V_{max} \cdot (1 + K_R/R)$  και έχει μιά κλίση  $1/V_{max} \cdot (K_P + K_{RP}/R)$ . Άν όλα αυτά τά σημεία, γιά όλες τίς γραμμές (εύθειες-καμπύλες, τών διαγραμμάτων), μπουν σέ άξονες ως πρός τίς αντίστοιχες αντίστροφες τιμές τών συγκεντρώσεων του NADH, οί παραγόμενες γραμμικές άπεικονίσεις συναντουν τό κατακόρυφο άξονα ( $1/R = 0$ ) στή τιμή  $1/V_{max}$  μέ κλίση  $K_R/V_{max}$ . Προσδιορισμοί τής άρχικης ταχύτητας αντίδρασης, όπου ή συγκέντρωση του NADH ποικίλει σέ όρισμένα σταθερά επίπεδα τής συγκέντρωσης του πυροσταφυλικού, μπουν νά χρησιμοποιηθουν γιά τό προσδιορισμό τής  $K_P$  και  $V_{max}$ .

Γιά συντομία τά: πυροσταφυλικό, γαλακτικό,  $NAD^+$ ,  $NADH$  γράφονται σάν P, L, O, R αντίστοιχα. Οί  $K_P$ ,  $K_L$ ,  $K_O$ ,  $K_R$ , είναι οί αντίστοιχες σταθερές Michaelis. Οί  $K_{RP}$  και  $K_{OL}$  οί σύμπλοκες σταθερές γιά τίς αντιδράσεις ίσορροπίας από τή πλευρά του πυροσταφυλικού και του γαλακτικού αντίστοιχα.

Τυπικές άπεικονίσεις (καμπύλες) από πειραματικά δεδομένα φαίνονται στά διαγράμματα (5) και (6).<sup>29</sup>

Τά διαγράμματα αυτά άπεικονίζουν τίς μεταβολές τής άρχικης αντίστροφης ταχύτητας αντίδρασης, πού έκφράζεται σάν  $V_{max}/v$ , ως πρός τήν αντίστροφη συγκέντρωση του υποστρώματος ή συνυποστρώματος, πού έκφράζεται σάν τό λόγο τής σταθεράς



Michaelis για τό υπόστρωμα ή συνυπόστρωμα (πού παίρνει μέρος στην αντίδραση), ως προς τή συγκέντρωση του. Οι αριθμοί πάνω από τις γραμμές, στα διαγράμματα, δείχνουν τό λόγο τής σταθεράς Michaelis ως προς τή συγκέντρωση του υποστρώματος ή συνυποστρώματος, πού έχει κρατηθεί σταθερή. Οι γραμμές έχουν υπολογιστεί από τήν εξίσωση (1) χρησιμοποιώντας τιμές, πού έχουν δοθεί από πίνακες.

Έπειδή μιá αλλαγή στό σημείο, πού μιá εύθεια τών διαγραμμάτων 5α ή 6α, τέμνει τόν άξονα  $V_{max}/v$  προϋποθέτει αντίστοιχη αλλαγή στή κλίση τής αντίστοιχης εύθειας τών διαγραμμάτων 5β ή 6β, οι άπεικονίσεις πρέπει νά γίνονται διπλές (5α-5β, 6α-6β) σάν μιá πιό σωστή άναπαράσταση τών γραμμών αύτων, πού έχουν γίνει μέ βάση τά έκτιθέμενα πειραματικά σημεία.

Γιά τά διαγράμματα 5 (5α-5β), ή αντίδραση έγινε από τή πλευρά του γαλακτικού προς τό πυροσταφυλικό, σέ θερμοκρασία 29°C. Η τιμή τής  $V_{max}$  ήταν  $1,40 \times 10^{-6} \text{ Mol/min}$  και ή συγκέντρωση τής Γαλακτικής Άφυδρογονάσης περίπου  $1,40 \times 10^{-2} \text{ γ/ml}$ .

Γιά τό διάγραμμα 6 (6α-6β), ή αντίδραση έγινε από τή πλευρά του πυροσταφυλικού προς τό γαλακτικό, σέ θερμοκρασία 11,5°C. Η τιμή τής  $V_{max}$  ήταν  $7,14 \times 10^{-7} \text{ Mol/min}$  και ή συγκέντρωση τής Γαλακτικής Άφυδρογονάσης, περίπου  $1 \times 10^{-2} \text{ γ/ml}$ .

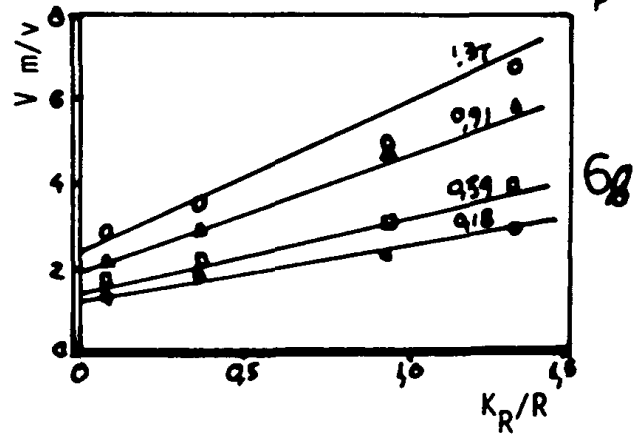
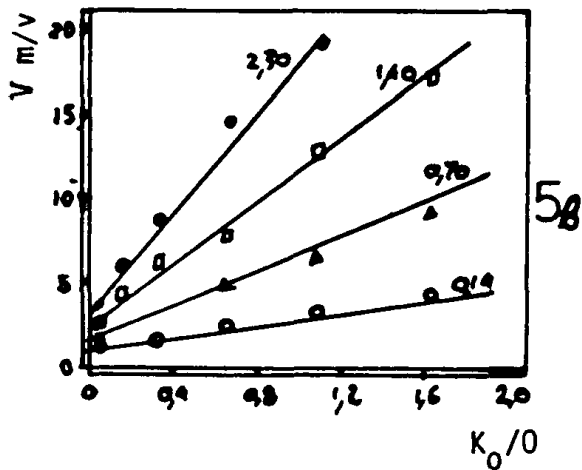
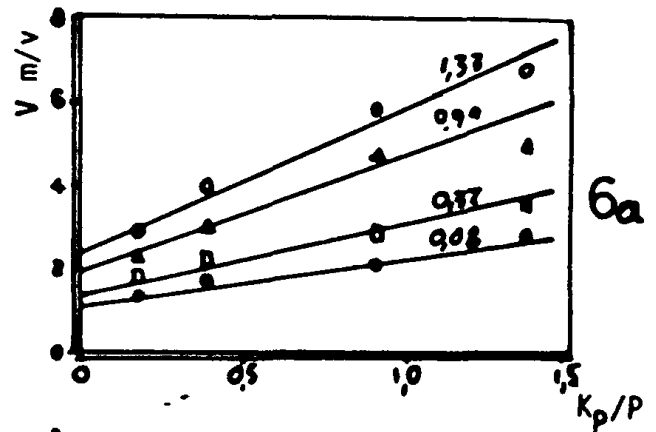
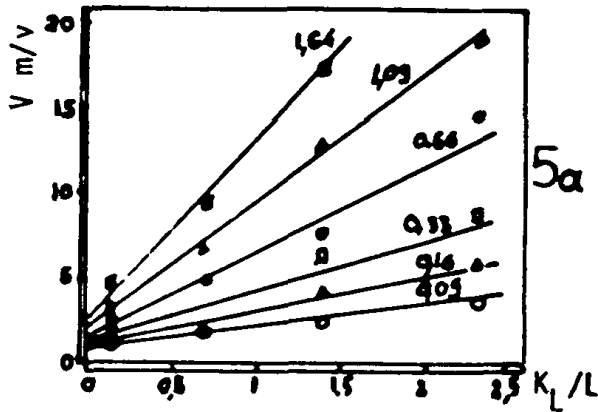
Οι αριθμοί πάνω από τις γραμμές στα διαγράμματα 5 και 6 δείχνουν τό λόγο τής σταθεράς Michaelis προς τή συγκέντρωση τών αντιδρώντων, πού ή συγκέντρωσή τους διατηρείται σταθερή. Οι γραμμές υπολογίστηκαν από τήν εξίσωση (1). Άντικαθιστώντας στήν εξίσωση (1) τις συγκεντρώσεις τών αντιδρώντων δημιουργούμε τήν εξίσωση (2) :

$$(2) \quad \frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{K_P}{P} + \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R \cdot P}$$

Η σύμπλοκη σταθερά  $K_{RP}$  προσδιορίστηκε από τήν εξίσωση (2).



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α Τ Α ( 5 ) , ( 6 )

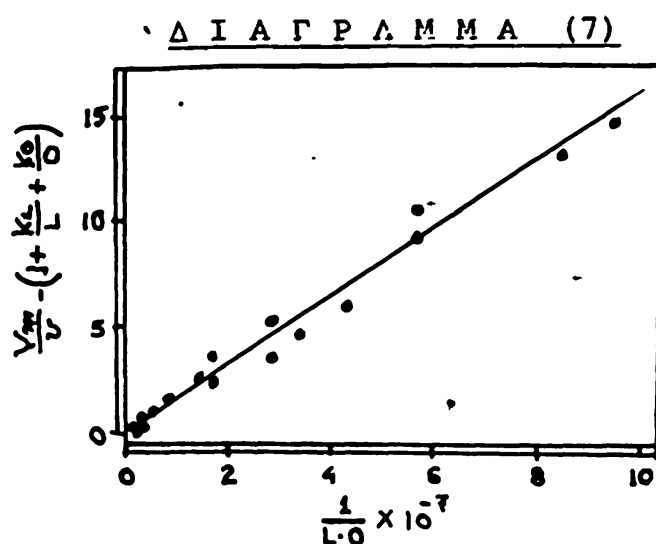


Γραφικές απεικονύσεις με βάση την εξίσωση 1 των πειραματικών δεδομένων, για την αντίδραση από τη πλευρά του γαλακτικού προς το κυροσταφυλικό (διάγραμμα 5) και από τη πλευρά του κυροσταφυλικού προς το γαλακτικό (διάγραμμα 6).



$$\frac{V_{\max}}{v} - \left( 1 + \frac{K_P}{P} + \frac{K_R}{R} \right) = \frac{K_{PR}}{P \cdot R} \quad (3)$$

Έτσι, έπειδή όλοι οι όροι στην άριστερή πλευρά της εξίσωσης (2) μπορούν να προσδιοριστούν, μιά άπεικόνιση του άριστερου μέλους της ως προς  $\frac{1}{P \cdot R}$  θα δώσει μιά εύθεια γραμμή μέ κλίση  $K_{PR}$ . Στο διάγραμμα (7) φαίνεται τό παραπάνω για τήν αντίδραση από τή πλευρά του γαλακτικού προς τό πυροσταφυλικό. Τά δεδομένα έχουν παρθει από τό διάγραμμα (5).



Γραφική άπεικόνιση της εξίσωσης 3, για τήν αντίδραση από τή πλευρά του γαλακτικού προς τό πυροσταφυλικό.

Όστόσο μερικοί έρευνητές έχουν υπολογίσει ότι μιά αντίστροφη αντίδραση, πού καταλύεται από ένζυμα, περικλείοντας δύο τύπους υποστρωμάτων και δύο τύπους συνένζυμων, θα δώσει μιά αύξηση στις καμπύλες των διαγραμμάτων κατά Lineweaver - Burk αν τό σύστημα περιγραφεί μέ τή μέθοδο της προσέγγισης της στάσιμης κατάστασης και αν δέν υπάρχει αναγκαστική τάξη σύνδεσης για τά αντιδρώντα.

Υπολογισμένες καμπύλες για μιά ποικιλία υποθετικών αναλογιών σταθερών ταχύτητας δείχνουν ότι ή καμπυλότητα είναι συνήθως, τόσο μικρή πού δέν μπορεί νά διερευνηθεί πειραματικά.

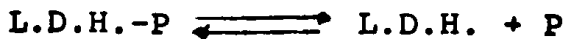
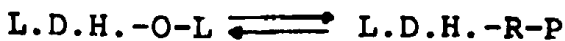
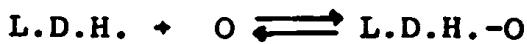


Από αυτό συνάγεται ότι η πιο καλή δοκιμή, για να προσρμοστεί στα πειραματικά δεδομένα της εξίσωσης (1), είναι η απόδειξη ότι μια συνεπής τιμή της  $K_{AB}$  βρίσκεται πάνω από μια εύρεια περιοχή αλλαγών του  $AB$ .

Η τιμή της  $K_{OL}$  υπολογίζεται, με όμοιο τρόπο, από τη πλευρά του γαλακτικού, για την αντίστροφη αντίδραση. Επειδή οι τιμές που έχουν βρεθεί για τις  $K_{PR}$  και  $K_{OL}$  εξαρτώνται από τις τιμές άλλων κινητικών σταθερών, είναι φανερό ότι σφάλματα υπολογισμού τείνουν να συσσωρευτούν στις τιμές όλων των σύμπλοκων σταθερών.

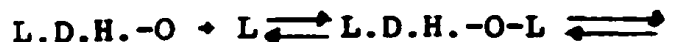
Έχουν παρατηρηθεί, γενικά,<sup>31</sup> δύο πορείες πιθανές για να εξηγήσουν τη καταλυτική μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό και αντίστροφα, με ένζυμο τη Γαλακτική Αφυδρογονάση.

Πορεία (α)



κ.τ.λ.

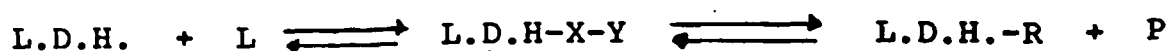
Πορεία (β)



όπου, όπως προηγουμένως έχει σημειωθεί,  $O$ ,  $P$ ,  $L$ ,  $R$  και  $L.D.H.$  είναι αντίστοιχα τα  $NAD^+$ ,  $NADH$ , Γαλακτικό, Πυροσταφυλικό και Γαλακτική Αφυδρογονάση.

Κινητικές μετρήσεις, όμως, για δλόκληρη την αντίδραση δέν έδωσαν πληροφορίες για τα σύμπλοκα  $L.D.H.-O-L$  είτε  $L.D.H.-R-P$  αλλά για ένα σύμπλοκο άγνωστης σύνταξης τό  $L.D.H.-X-Y$  που φαίνεται να προέρχεται από τη παρακάτω πορεία, που προτάθηκε γι' αυτό τό λόγο.



Πορεία (γ)

Ο Alberty<sup>32</sup> έχει δείξει ότι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης για τη κατεύθυνση από το πυροσταφυλικό προς το γαλακτικό είναι:

$$(3) \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_O}{O} + \frac{K_L}{L} + \frac{K_{OL}}{O \cdot L}}$$

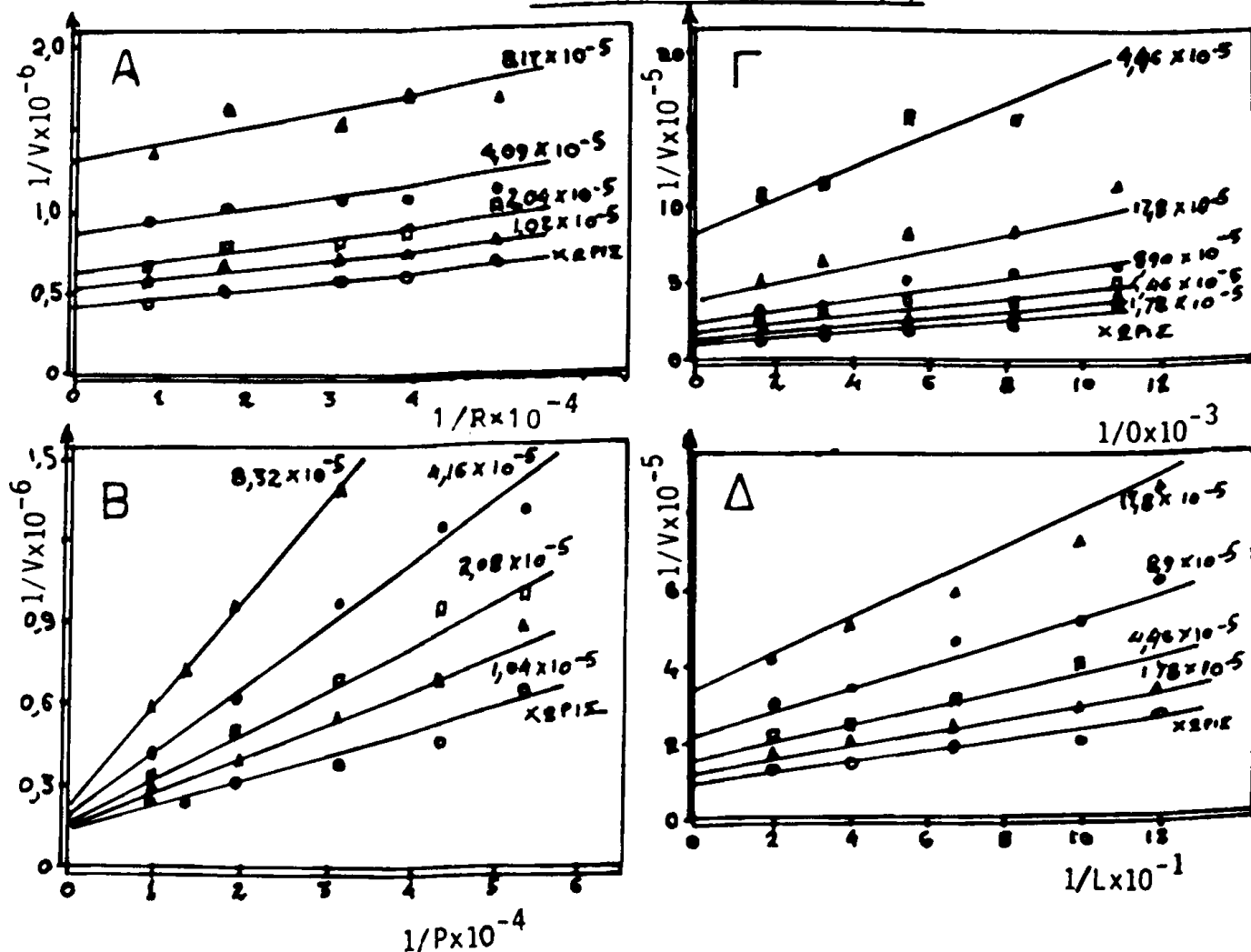
Η εξίσωση (3) δεν είναι άλλη από την εξίσωση (1). Οι  $K_O$ ,  $K_L$  είναι οι σταθερές Michaelis για τα  $\text{NAD}^+$  και  $\text{NADH}$  αντίστοιχα και  $O$ ,  $L$ , οι αρχικές συγκεντρώσεις των  $\text{NAD}^+$  και  $\text{NADH}$ .

Η  $K_{OL}$  είναι επίσης μία σταθερά, που έχει την ίδια υπολογιστική σημασία, για το γινόμενο των συγκεντρώσεων  $O$  και  $L$ , όπως θα είχε μία κανονική σταθερά Michaelis για απλές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Οι όρισμοί αυτοί έχουν δοθεί από τον ίδιο τον Alberty.

Οι Novoa, Winer, Glaid, Schwert εργάστηκαν<sup>33</sup> με βάση τις άμεσα παραπάνω διατυπωμένες κινητικές πορείες και με πρότυπο την εξίσωση που προτάθηκε από τον Alberty, χρησιμοποιώντας όξαλικό και όξαμικό όξεα (όξαλικό  $\text{Na}$ -άλας με  $\text{Na}$  του μονοαμίδιου του όξαμικού όξεος) σαν αναστολείς στη πορεία μετατροπής :

$$\text{Γαλακτικό} + \text{NAD}^+ + \text{L.D.H.} \rightleftharpoons \text{Πυροσταφυλικό} + \text{NADH} + \text{L.D.H.}$$


## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ (8)



Διάγραμμα 8 (Α,Β): ή αντίδραση γίνεται από τή πλευρά του πυροσταφυλικού προς τό γαλακτικό.

Διάγραμμα 8 (Γ,Δ): ή αντίδραση γίνεται από τή πλευρά του γαλακτικού προς τό πυροσταφυλική.

Οι καμπύλες του διαγράμματος (8) κατά Lineweaver-Burk, δείχνουν τήν επίδραση της προσθήκης όξαμικού, σάν αναστολέα, στην άρχική ταχύτητα της αντίδρασης όταν:

- (Α) ή συγκέντρωση του NADH (R) μεταβάλλεται καί του πυροσταφυλικού παραμένει σταθερή,
- (Β) ή συγκέντρωση του πυροσταφυλικού (P) μεταβάλλεται καί NADH παραμένει σταθερή,
- (Γ) ή συγκέντρωση του  $\text{NAD}^+$  (O) μεταβάλλεται καί του γαλακτικού παραμένει σταθερή,



(Δ) ἡ συγκέντρωση τοῦ γαλακτικοῦ (L) μεταβάλλεται καί τοῦ  $\text{NAD}^+$  παραμένει σταθερή.

Οἱ συγκεντρώσεις τοῦ ὀξαμικοῦ, στή κάθε ἀντίδραση, φαίνονται πάνω στίς εὐθεῖες τῶν ἐπί μέρους διαγραμμάτων τοῦ διαγράμματος (8). Τά σημεῖα εἶναι πειραματικά καί οἱ μετρήσεις ἔγιναν σέ ρυθμιστικό διάλυμα 0,2 M ἰονικῆς ἰσχύος ἀπό Tris-Tris-HCl-KCl σέ  $\text{pH} = 6,4$  καί σέ θερμοκρασία  $28^\circ\text{C}$ .

Οἱ γραμμές ὑπολογίστηκαν ἀπό τίς ἐξισώσεις (4) καί (5), πού θά δοῦμε παρακάτω καί οἱ σταθερές ἀπό τό πίνακα IV. Ὅλες οἱ συγκεντρώσεις ἐκφράζονται σέ  $\text{Mol/L}$  καί οἱ ταχύτητες σέ  $\text{Mol/L}\cdot\text{min}$ .

Τό διάγραμμα (8B) τῆς  $1/V$  ὡς πρός  $1/P$ , μέ σταθερή τή συγκέντρωση τοῦ  $\text{NADH}$  καί μεταβλητή τή συγκέντρωση τοῦ ὀξαμικοῦ (ἀναστολέα), δείχνει ὅτι οἱ κλίσεις τῶν γραμμῶν αὐξάνουν πολύ πιό γρήγορα μέ τήν αὐξηση τῆς συγκέντρωσης τοῦ ὀξαμικοῦ, ἀπ' ὅτι αὐξάνουν οἱ τιμές τῆς  $1/V$  στά σημεῖα ὅπου οἱ γραμμές τέμνουν τόν ἄξονα  $1/V$ . Γιά μετρήσεις σέ μεγαλύτερες τιμές  $\text{pH}$ , ἡ ἀλλαγὴ στίς τιμές τῆς  $1/V$ , στά σημεῖα πού οἱ γραμμές τέμνουν τόν ἄξονα  $1/V$ , εἶναι μηδαμινή. Αὐτή ἡ παρατήρηση ἐξηγεῖται εὐκόλα ἀν ὑποθέσουμε ὅτι ἡ δρᾶση τοῦ ὀξαμικοῦ, σάν ἀναστολέα, εἶναι ἀνταγωνιστική ὡς πρός τό πυροσταφυλικό.

Τό διάγραμμα (8A) δείχνει ὅτι τό ὀξαμικό εἶναι ἐντελῶς μὴ ἀνταγωνιστικός ἀναστολέας ὡς πρός τό  $\text{NADH}$ .

Τά διαγράμματα (8Γ) καί (8Δ) περιλαμβάνουν μετρήσεις σέ ὑψηλότερες συγκεντρώσεις ὀξαμικοῦ, ἀπό αὐτές πού χρησιμοποιήθηκαν στά διαγράμματα (8A) καί (8B).

Εἶναι, πρακτικά, ὅμοια μέ αὐτά καί οἱ διαφορές τους εἶναι δύο:

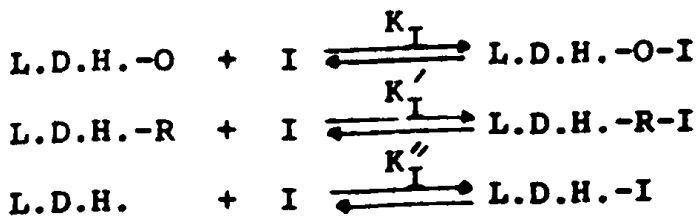
α) ὅτι τά (8Γ) καί (8Δ) μελετοῦν τήν ἀντίδραση ἀπό τή πλευρά τοῦ γαλακτικοῦ πρός τό πυροσταφυλικό καί

β) ὅτι σέ ὑψηλότερες συγκεντρώσεις ὀξαμικοῦ ὑπάρχει αὐξηση στίς κλίσεις τῶν γραμμῶν.

Ὅλες οἱ παραπάνω δρᾶσεις τοῦ ὀξαμικοῦ, σάν ἀναστολέα, περιγράφονται μέ τίς ἐξισώσεις τῆς πορείας (γ) καί (δ) - ἡ πορεία (δ) εἶναι συνέχεια τῆς πορείας (γ) - καί μέ βάση τήν ἐξίσωση (1).





Πορεία (δ)

όπου I ο αναστολέας (Inhibitor).

Ο υπολογισμός της αρχικής ταχύτητας της ολικής αντίδρασης, για τη φορά από τα αριστερά προς τα δεξιά, υπολογίστηκε από τις εξισώσεις της πορείας (γ) και (δ) με βάση τη μέθοδο της προσέγγισης της στάσιμης κατάστασης. Οι εξισώσεις, που πάρθηκαν είναι οι παρακάτω, από τη πλευρά του γαλακτικού προς το πυροσταφυλικό:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_O}{O} + \frac{K_L}{L} + \frac{K_{OL}}{O \times L} + \frac{K_5 \times I}{(K_5 + K_7) \times K'_I} + \frac{K_O \times I}{K''_I \times O} + \frac{K_L \times I}{K'_I \times L} + \frac{K_{OL} \times I}{K''_I \times O \times L}} \quad (4)$$

και για την αντίστροφη φορά της αντίδρασης:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_R}{R} + \frac{K_P}{P} + \frac{K_{RP}}{R \times P} + \frac{K_4 \times I}{(K_2 + K_4) \times K_I} + \frac{K_R \times I}{K''_I \times R} + \frac{K_P \times I}{K'_I \times P} + \frac{K_{RP} \times I}{K''_I \times R \times P}} \quad (5)$$

όπου :

I είναι η συγκέντρωση του αναστολέα (όξαμικού)

$K_I$ ,  $K'_I$ ,  $K''_I$ , είναι οι σταθερές της διάστασης των σύμπλοκων

L.D.H.-O-I, L.D.H.-R-I, L.D.H.-I αντίστοιχα.

Τό ένζυμο της Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης, που χρησιμοποιείται σε αυτά τα πειράματα είναι από καρδιά βοδιού ( $H_4$ ).

Για την αναστολή της δράσης του ένζυμου της Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης, από καρδιά βοδιού, με αναστολέα τό όξαλικό όξύ,

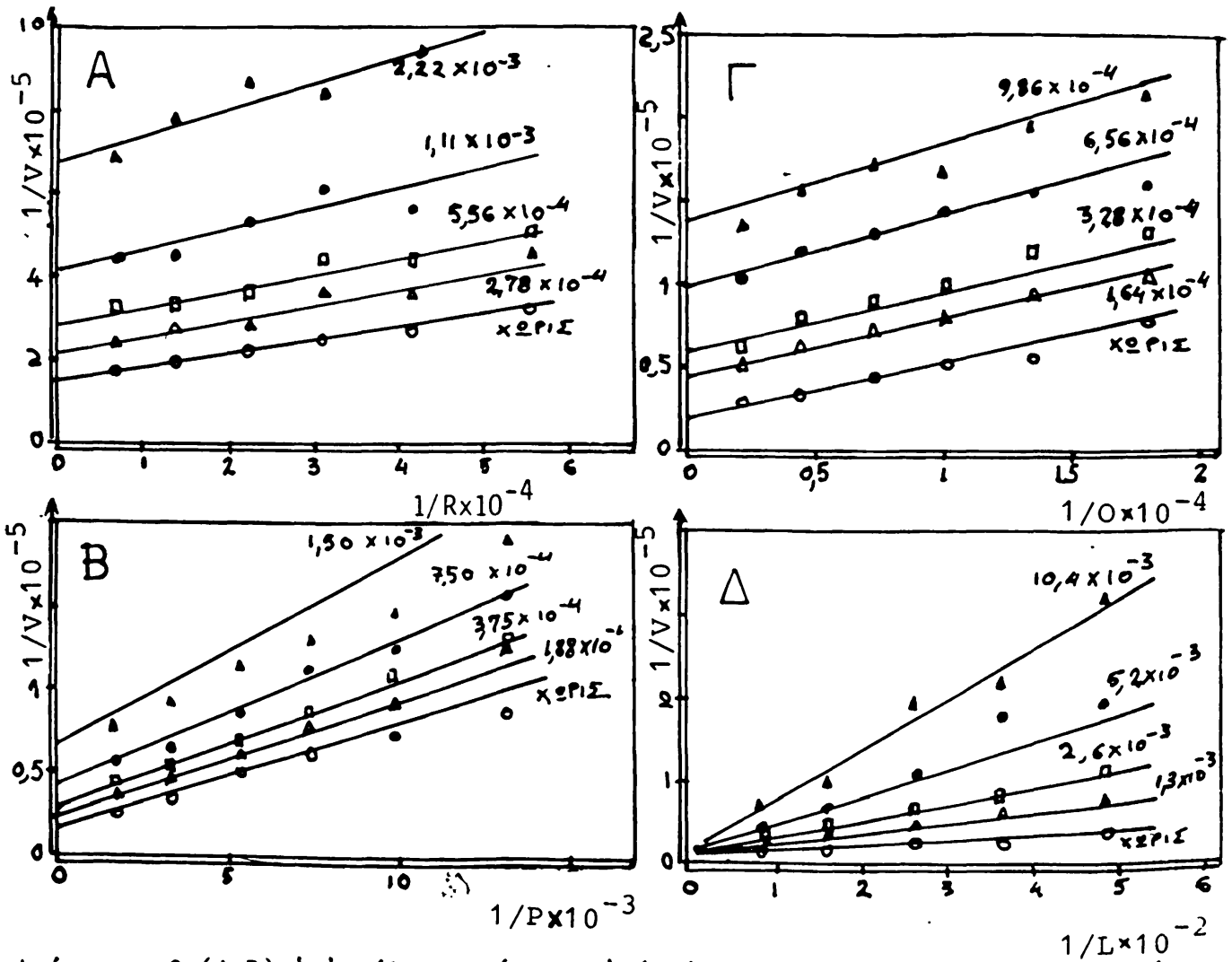


(χρησιμοποιήθηκε όξαιικό Na), έχουμε αντίστοιχα τό διάγραμμα (9) καί τό Πίνακα  $V^{33}$ .

Τό διάγραμμα (9) είναι παρόμοιο μέ τό (8) καί έξετάζει τίς ίδιες άκριβώς περιπτώσεις όταν ή δράση τοῦ ένζυμου άναστέλλεται από τό όξαιικό.

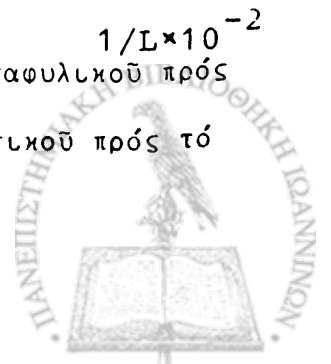
Τά σημεία είναι πειραματικά καί οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,2 M ίονικής ισχύος από Tris-Tris-HCl-KCl, σε  $pH = 8,05$  καί θερμοκρασία  $28^{\circ}C$ . Οι γραμμές υπολογίστηκαν από τίς έξισώσεις (4) καί (5) μέ τίς τιμές πού δίνονται στό Πίνακα V.

Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (9)



Διάγραμμα 9 (A,B): ή αντίδραση γίνεται από τή πλευρά τοῦ πυροσταφυλικοῦ πρὸς τό γαλακτικό.

Διάγραμμα 9 (Γ,Δ): ή αντίδραση γίνεται από τή πλευρά τοῦ γαλακτικοῦ πρὸς τό πυροσταφυλικό.



\*Απλή παρατήρηση και σύγκριση τών διαγραμμάτων (8B) - (9B) και (8Δ)-(9Δ), δείχνει την ανταγωνιστική αναστολή του όξαιμικού και του όξαιλικού ως προς τά υποστρώματα πυροσταφυλικό και γαλακτικό.

\*Αν υποθέσουμε ότι η ολική αντίδραση περιγράφεται από τις πορεΐες (γ) και (δ) (μηχανισμός της αντίδρασης), συμπεραίνουμε ότι τά σύμπλοκα L.D.H.-R-I και L.D.H.-O-I σχηματίζονται πραγματικά. Και αν, έξειδικεύοντας τό θέμα, υποθέσουμε ότι στή παρούσα περίπτωση ή μόνη δράση ενός αναστολέα είναι ο σχηματισμός ενός σύμπλοκου της μορφής :

ENZΥΜΟ - ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ - ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ,  
οι έξειώσεις , τότε, (4) και (5) γράφονται :

$$(6) \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_O}{O} + \frac{K_L}{L} + \frac{K_{OL}}{O \times L} + \frac{K_L \times I}{K_I \times L}}$$

$$(7) \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_R}{R} + \frac{K_P}{P} + \frac{K_{RP}}{R \times P} + \frac{K_4 \times I}{(K_2 + K_4) \times K_I}}$$



## Π Ι Ν Α Κ Α Σ Ι V

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ  
ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ (8)

Σταθερές και μεταβλητές ποσότητες	Τιμές τών ποσοτήτων και αρχικές συγκεντρώσεις τών μεταβλητῶν σε διάφορα pH		
	pH=6,40 MOL	pH=8,45 MOL	pH=9,75 MOL
$K_O$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
$K_L$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
$K_{OL}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$
O	$2,84 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,78 \cdot 10^{-4}$
L	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$2,19 \cdot 10^{-2}$
$K_R$	$1,45 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
$K_P$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-3}$
$K_{RP}$	$3,5 \cdot 10^{-10}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{-8}$
R	$8,86 \cdot 10^{-5}$	$9,63 \cdot 10^{-5}$	$9,08 \cdot 10^{-5}$
P	$6,13 \cdot 10^{-5}$	$5,85 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$
$K_I$ (LDH-O-I $\rightleftharpoons$ LDH-O + I)	$6,9 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
$K'_I$ (LDH-R-I $\rightleftharpoons$ LDH-R + I)	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
$K''_I$ (LDH-I $\rightleftharpoons$ LDH + I)	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$7,8 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
$\frac{K_2 + K_4}{K_4}$	1,8	1,6	1,0
$\frac{K_5 + K_7}{K_5}$	2,15	3,4	2,9



Π Ι Ν Α Κ Α Σ    V

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ  
ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ (9)

Σταθερές και μεταβλητές ποσότητες	Τιμές των ποσοτήτων και άρχικες συγκεντρώσεις των μεταβλητών σε διάφορα pH		
	pH=6,05 MOL	pH=8,05 MOL	pH=9,12 MOL
$K_O$	-	$6,5 \cdot 10^{-5}$	-
$K_L$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$
$K_{OL}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
O	$6,67 \cdot 10^{-4}$	$3,84 \cdot 10^{-4}$	$7,31 \cdot 10^{-4}$
L	-	$6,03 \cdot 10^{-3}$	-
$K_R$	-	$2,3 \cdot 10^{-5}$	-
$K_P$	-	$5,5 \cdot 10^{-4}$	-
$K_{RP}$	-	$2,0 \cdot 10^{-9}$	-
R	-	$9,20 \cdot 10^{-5}$	-
P	-	$6,08 \cdot 10^{-4}$	-
$K_I$ (LDH-O-I $\rightleftharpoons$ LDH-O + I)	$9,2 \cdot 10^{-6}$	$8,4 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$
$K'_I$ (LDH-R-I $\rightleftharpoons$ LDH-R + I)	-	$1,9 \cdot 10^{-3}$	-
$K''_I$ (LDH-I $\rightleftharpoons$ LDH + I)	-	$2,4 \cdot 10^{-3}$	-
$\frac{K_2 + K_4}{K_4}$	-	4,6	-



Έπειδή η ίσορροπία της όλικης αντίδρασης πυροσταφυλικού και γαλακτικού με τη παρουσία της Γαλακτικής Άφυδρογονάσης, είναι προς όφελος του γαλακτικού, η ενεργότητα του ένζυμου μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, μετρώντας την αρχική ταχύτητα σχηματισμού του NADH κάτω από σταθερές συνθήκες.

Στην εξίσωση (8)  $\frac{d[\text{NADH}]}{dt} = K \times E$  ανά ml. E ανά ml δηλώνει την ενεργότητα του ένζυμου (τή συγκέντρωσή του) σε αθέραϊρες μονάδες. Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί της Γαλακτικής Άφυδρογονάσης γίνονται σε κυψελίδες από χαλαζία σπεκτροφωτομέτρου UV με διάφορες μέθοδες.

Δύο τρόποι για τό προσδιορισμό της ενεργότητας της Γαλακτικής Άφυδρογονάσης.

Πρώτος τρόπος: Διάλυμα DL-γαλακτικού Na 0,11 M (ύδατικό)  
 " NAD<sup>+</sup> 1,50 × 10<sup>-4</sup> (ύδατικό)  
 " ρυθμιστικό 0,03 M από διαίθυλο-  
 βαρβιτουρικό Na pH = 8,5 (ύδατικό)

Ό τελικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης, στη κυψελίδα, είναι 3,6 ml και η θερμοκρασία 25<sup>ο</sup> C. Η μέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 340 nm ως εξής:

Σέ διαλείματα δευτερολέπτων μετρείται η αύξηση, κατά 0,005 της όπτικής πυκνότητας του μίγματος της αντίδρασης και η ταχύτητα, 0,005/Δt είναι περίπου σταθερή κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων λεπτών της αντίδρασης. Αν η τιμή της K, από την εξίσωση (8) ληφθεϊ 10<sup>-3</sup>, η έκφραση για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ένζυμου γίνεται E ανά ml = 10<sup>3</sup> × 0,005/Δt = 5/Δt.

Μέ τις συνθήκες του παραδείγματος αυτού, μιά μονάδα Γαλακτικής Άφυδριγονάσης όρίζεται σαν τό ποσό του ένζυμου ανά ml, πού μεταβάλλει την όπτική πυκνότητα κατά 0,005 σε χρονική διάρκεια 5 δευτερολέπτων.

Δεύτερος τρόπος: Ύδατικό διάλυμα DLγαλακτικού Na 0,5M, pH = 10  
 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-NaOH pH=10  
 0,1 " " φωσφορικών pH = 7  
 Ύδατικό διάλυμα NAD<sup>+</sup> 2 × 10<sup>-2</sup> M, pH = 6



Διαλύεται η Γαλακτική 'Αφυδρογονάση στο ρυθμιστικό διάλυμα τῶν φωσφορικών, ἔτσι ὥστε νά παραχθεῖ διάλυμα 0,05  $\mu\text{Mol/ml}$  περίπου. Ἡ μέτρηση γίνεται μέ φασματοφωτόμετρο UV σέ μήκος κύματος 340 nm καί σέ θερμοκρασία 25°C.

Στή κυψελίδα τοῦ φασματοφωτόμετρου προστίθενται μέ τή παρακάτω σειρά :

1,8 ml ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης

0,1 ml ἀπό τό διάλυμα τοῦ DLγαλακτικοῦ νατρίου

0,1 ml " " " " NAD<sup>+</sup>

Ἄναμιγνύεται καλά τό μίγμα, μέ γυάλινη ράβδο, καί τοποθεῖται ἡ κυψελίδα στό φασματοφωτόμετρο. Τό διάλυμα τοῦ ἔνζυμου (0,02 ml) προστίθεται σάν μιά σταγόνα στή ἄκρη τῆς ράβδου καί ἀναμιγνύεται γρήγορα τό μίγμα. Μετράται ἡ ὀπτική πυκνότητα, σέ μήκος κύματος 340 nm καί καταγράφεται σάν συνάρτηση τοῦ χρόνου.

Οἱ γνώσεις αὐτές γιά τή Γαλακτική 'Αφυδρογονάση, μέχρις ἐδῶ, δέν μποροῦν νά χαρακτηρισθοῦν σάν πλήρεις. Μέ τό ἔνζυμο αὐτό γίνονται πολλές ἐργασίες, πού τείνουν νά δώσουν τή πλήρη εἰκόνα του.



### 3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΣΥΝΔΕΣΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΣΕ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Ἡ σύνδεση ὑποκαταστάτη σέ πρωτεΐνη, πού νά ἀποτελεῖται ἀπό περισσότερες τῆς μίας ὑπομονάδες, ἔδειχνε νά ἀκολουθεῖ μιὰ "σιγμοϊδή" καμπύλη διαφορετική ἀπό τή Michaelis-Menten.

Οἱ πάρα πολλές παρατηρήσεις τέτοιων φαινομένων σέ ἐνζυμικά καί ρυθμιστικά συστήματα ἔδειξαν ὅτι δέν εἶναι δυνατό νά πρόκειται γιά μεμονωμένα περιστατικά, ἀλλά γιά πιο γενική περίπτωση<sup>34</sup>.

Ἔχουν ὀνομαστεῖ "συνεργατικές συνδέσεις" οἱ συνδέσεις μικρῶν ὑποκαταστατῶν σέ πρωτεΐνες μέ περισσότερες τῆς μίας ὑπομονάδες. Σ' αὐτές τίς "συνδέσεις" συμπεριλαμβάνονται καί ἀλληλοεπιδράσεις ὑποστρωμάτων, τροποποιητῶν, (ἀναστολέων-ἐνεργοποιητῶν) καί οἱ ἐπιδράσεις τους στή μορφή καί τή ταχύτητα σύνδεσης τους.

Ἔχουν προταθεῖ ποικίλοι μηχανισμοί γιά νά ἐξηγήσουν καί νά ὑπολογίσουν τέτοιες ἐπιδράσεις. Καί ἔχουν προταθεῖ, κύρια, δύο μοντέλα, πού συσχετίζουν τή συνεργατικότητα στή σύνδεση μέ τή μορφή τῆς πρωτεΐνης.

1. Τό πρότυπο τῶν Monod, Wyman, Changeux<sup>35</sup>, πού βασίζεται σέ μιὰ θεμελιώδη ὑπόθεση μιᾶς ἀπαραίτητης συμμετρίας στίς πρωτεΐνες καί ὁδηγεῖ στή παραδοχή<sup>36</sup>:

α) Ὅτι ὅλες οἱ ὑπομονάδες, σέ μιὰ ὀρισμένη πρωτεΐνη, ὑπάρχουν στήν ἴδια "διαμορφωμένη" κατάσταση σέ ὀρισμένη χρονική στιγμή. Παραδέχεται διαμορφωτικές ἀλλαγές τῶν ὑπομονάδων. Καί τέτοιες ὀνομάζονται οἱ ἀλλαγές στό σύνολο τῶν ἰδιοτήτων, πού χαρακτηρίζουν ἓνα μόριο π.χ. δομή, μήκος, ἔλικο, θέση ἐνεργοῦ κέντρου.

β) Ὅτι ὑπάρχει ἰσορροπία μεταξύ δύο τουλάχιστον διαφορετικῶν καταστάσεων (R καί T καταστάσεις)

γ) Ὅτι κάθε ὑποκαταστάτης συνδέεται μέ προτίμηση σέ μιὰ μόνο ἀπό τίς δύο διαμορφωμερεῖς καταστάσεις.





2) Τό πρότυπο τών Koshland, Nemethy, Filmer<sup>37</sup> βασίζεται στη θεμελιώδη παραδοχή ότι είναι δυνατό νά υπάρχουν υβριδισμένες διαμορφωμερείς καταστάσεις της πρωτεΐνης, δηλαδή μιά υπομονάδα μπορεί νά αλλάζει διαμόρφωση χωρίς αυτό νά προϋποθέτει μιά ισοδύναμη αλλαγή σέ όλες τίς άλλες υπομονάδες καί οδηγεί στη παραδοχή ότι:

α) Κάθε υπομονάδα της πρωτεΐνης είναι δυνατό νά υπάρχει σέ δύο τουλάχιστον διαμορφωμερείς καταστάσεις.

β) Μιά αλλαγή στη διαμόρφωση μιάς υπομονάδας μπορεί νά αλλάζει τή σχετική σταθερότητα τών διαμορφώσεων τών γειτονικών υπομονάδων μέσα από ένδοϋπομοναδικές επιδράσεις.

γ) Ο υποκαταστάτης προτιμά νά συνδέεται σέ ένα από τά διαμορφωμερή κάθε υπομονάδας.

Αποκλειστική σύνδεση σέ ένα διαμορφωμερές δέν είναι αναγκαία απαίτηση γιά κανένα πρότυπο, όμως σύνδεση μέ προτίμηση απαιτείται καί γιά τά δύο.

Τό "γενικευμένο πρότυπο" τών Koshland, Nemethy, Filmer προϋποθέτει μιά συνεχόμενη αλλαγή στη διαμόρφωση τών υπομονάδων τών πρωτεΐνων. Τό ίδιο συμβαίνει καί στη περίπτωση, πού δύο υποκαταστάτες επιδρούν σέ μιά πρωτεΐνη (ένεργοποιητής-υπόστρωμα, αναστολέας-υπόστρωμα, δύο υποστρώματα) μέ φαινόμενα συνεργατικής σύνδεσης.

Γιά νά παρουσιαστεί ή κινητική συνέπεια του πρότυπου αυτού έξετάζεται ή περίπτωση μιάς τετραμεροϋς πρωτεΐνης, μέ όμοιες υπομονάδες. Οί υπομονάδες υποτίθεται πώς έχουν σχήμα σφαίρας ή κυλινδρικό καί είναι τοποθετημένες σέ τετραγωνική διάταξη. Όλες οι αντιδράσεις πρίν από αυτή πού σχηματίζονται τά τελικά προϊόντα, είναι ταχεΐες καί αντιστρεπτές.

Τά άποτελέσματα τέτοιων συλλογισμών, σέ πειραματική κλίμακα έδειξαν ότι:

α) Τό γενικευμένο πρότυπο τών Koshland, Nemethy, Filmer είναι ικανό νά έξηγήσει μιά εύρεία ποικιλία κινητικών δεδομένων μέ ένεργοποιητές αναστολείς καί συνεργατικές επιδράσεις.

β) Οί πειραματικές παράμετροι  $V_{max}$ ,  $S_{0,5}$ ,  $R_s$  ( $V_{max}$  ή μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης του ένζυμικού συστήματος,



$R_s$  ο συντελεστής Hill, ή σημασία του  $S_{0,5}$  στο διάγραμμα 10) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δώσουν πολλούς και διάφορους μεταξύ τους μηχανισμούς.

γ) Το γενικευμένο πρότυπο είναι πιο γενικό αλλά και πιο πολύπλοκο από το συμμετρικό πρότυπο των Monod, Wyman, Changeux.

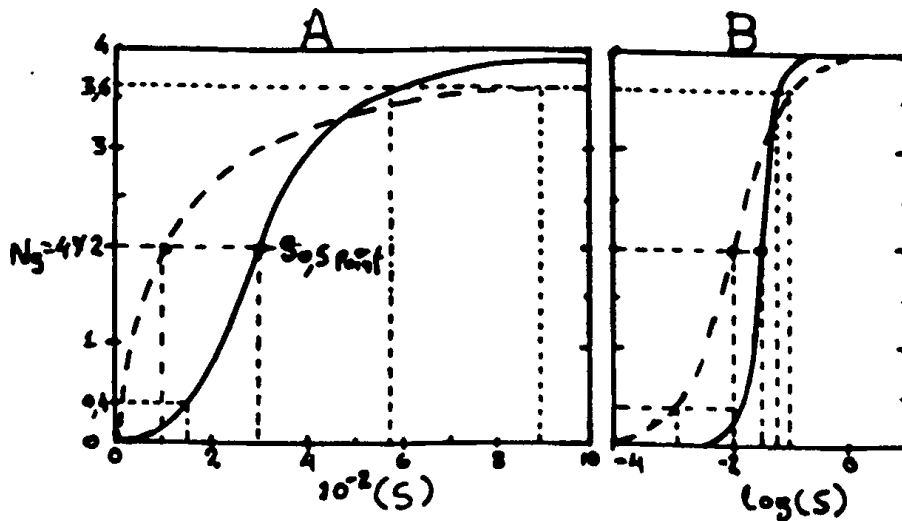
Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες και έχουν αναλυθεί πολλοί μηχανισμοί για να προσδιορίσουν τις παράμετρος  $V_{max}$ ,  $S_{0,5}$ ,  $R_s$  και να οδηγήσουν στη διάκριση μεταξύ μηχανισμών. Σε μία τέτοια προσπάθεια βρέθηκε ότι η εφαρμογή αυτών των παραμέτρων οδηγούσε σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο διάκρισης μηχανισμών. Σχέτιζαν τη τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης με τις συνεργατικές επιδράσεις, που απόρρεαν από τη κινητική συμπεριφορά της.

Για να αλληλοσχετίσουμε τις αλλαγές στη δομή μιας πρωτεΐνης, όταν υπεισέρχονται πολλαπλοί υποκαταστάτες, θα πρέπει να υποθέσουμε ότι η άμεση πειραματική κατάσταση αντιστοιχεί στη συστηματική μεταβολή δύο μόνο υποκαταστατών, όταν οι άλλοι παραμένουν σταθεροί. Από τη μελέτη των κατάλληλων παραμέτρων των δύο αυτών υποκαταστατών μπορούμε να πάρουμε συμπεράσματα για τις διαμορφωτικές αλλαγές, που συμβαίνουν στη διάρκεια της αντίδρασης για τη σύνδεσή τους. Έχουμε, λοιπόν, να συμπεράνουμε για τις διαμορφωτικές σχέσεις, σε ένα σύστημα με πολλούς υποκαταστάτες, με συστηματική μελέτη δύο υποκαταστατών, σε ένα χρόνο όπου τηρούμε όλες τις άλλες συνθήκες σταθερές. Οι υποκαταστάτες, που θα προσδιοριστούν είναι υποστρώματα, αναστολείς ή ενεργοποιητές. Κατασκευάζουμε λοιπόν πρότυπα τέτοια ώστε να προσδιορίζονται όλοι οι λογικοί συνδιασμοί σύνδεσης υποκαταστατών μέσα σε ένα εξειδικευμένο σύστημα.

Τέστ "διαγνωστικά", παράγονται από θεωρητικές διεργασίες και εφαρμόζονται πειραματικά για να προσδιορίσουμε το πώς μπορούν να μας οδηγήσουν σε κάποιο μηχανισμό, οι παράμετροι, που παρατηρούνται, εξετάζονται και μετρούνται.



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α ( 1 0 )



Σύγκριση μιᾶς σιγμοειδούς καμπύλης κορεσμοῦ μέ μιᾶ Michaelis-Menten αμπύλη κορεσμοῦ. Ἡ διακεκομμένη γραμμὴ δηλώνει τὴ καμπύλη κορεσμοῦ Michaelis-Menten.

Καί στά δύο τμήματα τοῦ διαγράμματος (10) τά ἐκτετακτοῦ κορεσμοῦ (γιά  $N = 0,4, 2,0$  καί  $3,6$  ἀντίστοιχῶν κρός  $10, 50, 90$ , ἐπί τοῦ  $\%$  κορεσμοῦ ἀντίστοιχα) χρησιμοποιοῦνται γιά νά δηλώσουν τίς χαρακτηριστικές παράμετρος καί τίς ἀντίστοιχες συγκεντρώσεις κάθε μιᾶς.

Σέ ὅλες τίς διεργασίες θά πρέπει νά ὑποτεθεῖ ὅτι οἱ ὑπομονάδες τῶν πρωτεϊνῶν ὑπάρχουν σέ δύο τουλάχιστον διαμορφωμερεῖς καταστάσεις (δύο διαμορφωμερη) A καί B καί ὅτι τό διαμορφωμερές B συνδέεται μέ τόν ὑποκαταστάτη X σέ ποσά σημαντικά. Εὐκόλα συμπεραίνουμε ὅτι συμβαίνουν ἀλληλοεπιδράσεις τοῦ τύπου :  $E + X \rightleftharpoons EX$  (8) (E συμβολίζεται τό ἔνζυμο) καί ἀποδεικνύεται ὅτι ἐφαρμόζονται κατ'εὐθείαν σέ ἐνώσεις, πού συνδέονται ἀλλά δέν ἀντιδροῦν, ὅπως τό ὀξυγόνο ( $O_2$ ) στήν Αἰμογλοβίνη ἢ οἱ ἀναστολεῖς σέ ἐνζυμικά συστήματα. Θά πρέπει, ἐπίσης, νά ἐφαρμόζονται καί σέ σύμπλοκα τοῦ τύπου ENZYMO - ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ὅταν τό ποσό τοῦ EX σύμπλοκου σχετίζεται κατ'εὐθείαν μέ μιᾶ μετρούμενη ἰδιότητα ὅπως λ.χ. ἡ ἐνεργότητα.

Παράδειγμα ἓνα ἐνζυμικό σύστημα ὅπου τό EX σύμπλοκο, ὅταν διασπᾶται μέ τέτοιο τρόπο, ὥστε ἡ ἐνεργότητα του νά εἶναι



ανάλογη προς τό ποσό του (του συμπλόκου  $EX$ ), θά πρέπει νά δώσει μιά ενεργό καμπύλη τής συγκέντρωσης του υποστρώματος παρόμοια μέ τή καμπύλη κορεσμοῦ.

Ἡ σταθερά σύνδεσης (ὑποκαταστάτη  $X$ )  $K_X$ , ἀναπαριστᾷ τήν οὐσιαστική σχέση του γιά μιά μόνο ὑπομονάδα καί ὁρίζεται ἀπό τήν ἐξίσωση:

$$(9) \quad K_X = \frac{(BX)}{(B) \cdot (X)} \quad (\text{ἀπό τήν } B + X \rightleftharpoons BX)$$

Ἡ  $B$  εἶναι ἡ διαμορφωτική κατάσταση τής ὑπομονάδας, πού δέχεται τόν  $X$  ὑποκαταστάτη καί αὐτός τή μετατρέπει (τήν ὑπομονάδα) πάντα σέ  $B$  διαμορφωμέρες (γ' ἀπαίτηση τοῦ πρότυπου τῶν  $K.N.F.$ )

Ἡ σταθερά σχηματισμοῦ  $K_t$  ἀναπαριστᾷ τή σταθερά ἰσοροπίας γιά τή διαμορφωτική ἀλλαγὴ τής ὑπομονάδας μέ διαμόρφωση  $A$  σέ διαμόρφωση  $B$ , ὅπως δείχνει ἡ ἐξίσωση:

$$(10) \quad K_t = \frac{(B)}{(A)} \quad (\text{ἀπό τήν } A \rightleftharpoons B)$$

Αὐτή ἡ σταθερά δέν περιλαμβάνει τό ἀποτελεσμα τῶν ἀλλαγῶν, ἀπό τήν ἀλληλοεπίδραση τῶν ὑπομονάδων. Γιά νά ἀναπαραστήσουμε τήν ἀλληλοεπίδραση τῶν ὑπομονάδων σέ διαφορετικές δομές, θά χρησιμοποιηθοῦν οἱ σταθερές  $K_{AA}$ ,  $K_{AB}$ ,  $K_{BB}$  κ.τ.λ. θά ὑποθεθεῖ ὅτι  $K_{AA} = 1$  ἐπειδὴ ἡ ἐκλογή ἑνός ἄλλου ἀριθμοῦ θά μπορούσε νά ἔχει ἀντανάκλαση σέ μιά σχετική μετακίνηση ἀπό τή σταθερή κατάσταση, στίς σχέσεις τής ὑπομονάδας.

Οἱ  $K_{AB}$  καί  $K_{BB}$  ὁρίζονται ἀντίστοιχα ἀπό τίς ἐξισώσεις:

$$(11) \quad K_{AB} = \frac{(AB) \cdot (A)}{(AA) \cdot (B)} \quad (\text{ἀπό τήν } AA + B \rightleftharpoons AB + A)$$

$$(12) \quad K_{BB} = \frac{(BB) \cdot (A) \cdot (A)}{(AA) \cdot (B) \cdot (B)} \quad (\text{ἀπό τήν } AA + B + B \rightleftharpoons BB + A + A)$$

καί ὅπου ἡ  $AB$  ἀναφέρεται σέ ὑπομονάδες, πού ἀλληλοεπιδροῦν, ἐνῶ οἱ  $A$  καί  $B$  σέ ὑπομονάδες, πού δέν ἀλληλοεπιδροῦν.



Θά πρέπει νά σημειωθεῖ ὅτι οἱ παραπάνω ἐξισώσεις περιέχουν ἴσα στοιχειομετρικά ποσά ἀπό τίς  $A$  καί  $B$  σέ ἀριθμητή καί παρονομαστή καί ἔτσι ἡ σταθερά ἰσορροπίας σ'αυτές τίς ἐκφράσεις σχετίζει τίς ἀλλαγές τῶν δυνάμεων τῶν ἀλληλοεπιδράσεων μεταξὺ τῶν ὑπομονάδων καί δέν περιέχει τήν ἐνέργεια τῆς διαμορφωτικῆς ἀλλαγῆς αὐτή καθ'αὐτή.

Ἄπό αὐτό βλέπουμε ὅτι οἱ σταθερές αὐτές ἀναπαριστοῦν τήν αὐξημένη ( $K > 1$ ) ἢ μειωμένη ( $K < 1$ ) σταθεροποίηση μερικῶν διαμορφώσεων τῆς πρωτεΐνης, πού ἐξετάζουμε, μέ τίς ἀλληλοεπιδράσεις τῶν ὑπομονάδων.

Γιά παράδειγμα,  $K_{AB} > 1$  σημαίνει ὅτι ἡ ἀλληλοεπίδραση τῶν  $AB$  εἶναι πιά εὐνοημένη ἀπό τήν ἀλληλοεπίδραση τῶν  $AA$  καί τείνει νά σταθεροποιηθεῖ ἕνα  $AB$  ζευγος ἀντί ἕνα  $AA$ .

Στή παραγωγή τῶν ἐξισώσεων οἱ δύο ὑποκαταστάτες θά προσδιορίζονται σάν  $X$  καί  $L$  γιά καλύτερη μεταχείριση στίς διάφορες μαθηματικές σχέσεις. Οἱ  $X$  καί  $L$  μποροῦν νά προσδιοριστοῦν σάν ὑπόστρωμα-ἀναστολέας, ὑπόστρωμα-ἐνεργοποιητής, ἢ δύο ὑποστρώματα.

Γιά νά παραχθοῦν "συνεργατικά ἀποτελέσματα", ἕνας τουλάχιστον, ἀπό τοὺς δύο ὑποκαταστάτες θά πρέπει νά εἰσάγει μιά διαμορφωτικὴ ἀλλαγὴ, πού θά ἐπηρεάζει τίς ἐνδοῦπομοναδικές ἀλληλοεπιδράσεις.

Ἐχει ὑποτεθεῖ, παραπάνω, ὅτι ὁ ὑποκαταστάτης  $X$ , πού προϋποθέτει μιά διαμορφωτικὴ ἀλλαγὴ εἶναι δεσμευμένος σέ σημαντικά ποσά στή  $B$  διαμορφωμερὴ κατάσταση τῆς ὑπομονάδας ( γ' ἀπαίτηση τοῦ πρότυπου  $K.N.F.$  ). Αὐτό σημαίνει ὅτι ἡ σταθερὰ σύνδεσης  $K'_X = \frac{(AX)}{(A) \cdot (X)}$  εἶναι πολὺ πιά μικρὴ ἀπὸ τή

$$K_X = \frac{(BX)}{(B) \cdot (X)}$$

Κάθε ὑπομονάδα ὑποτίθεται ὅτι ἔχει μιά πλευρὰ σύνδεσης γιά τόν  $X$  καί μιά γιά τόν  $L$  ὑποκαταστάτη.

Ὅρίζουμε  $N_{Xt}$  τὸ ὄλικό ποσό τοῦ  $X$ , πού εἶναι δεσμευμένο ἀνά γραμμομόριο πρωτεΐνης,  $N_X$  τὸ ποσό, πού εἶναι



δεσμευμένο σε υπομονάδες που δέν περιέχουν  $L$  και  $N_{XL}$  τό ποσό του  $X$ , που είναι δεσμευμένο σε υπομονάδες που περιέχουν και  $L$ . Τά  $N_{Lt}$ ,  $N_L$ ,  $N_{LX}$ , όρίζονται ανάλογα μέ τά παραπάνω.

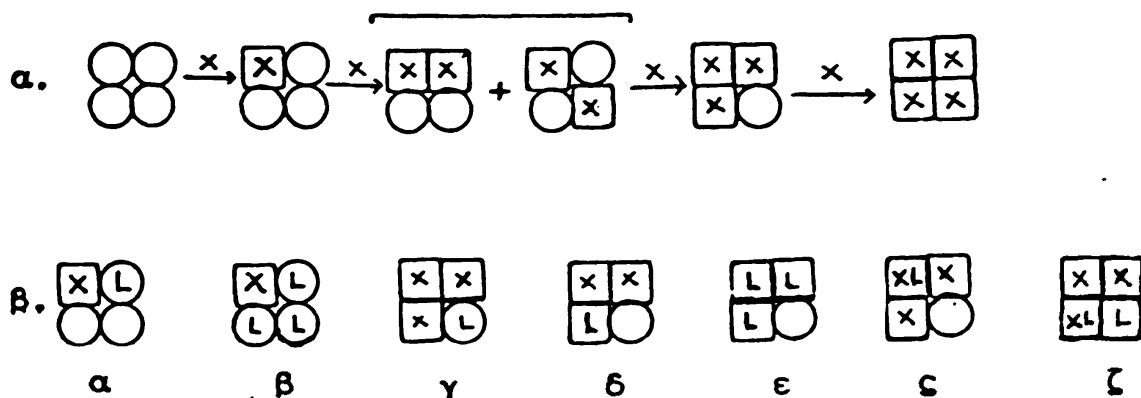
Γιά λεπτομερείς υπολογισμούς θά πρέπει νά γίνουν ώρισμένες υποθέσεις, που θά διευκολύνουν τούς συλλογισμούς, π.χ. νά υποθεθεϊ ότι ό όλικός αριθμός τών υπομονάδων είναι τέσσερεις και σε διάταξη "τετραγωνική" (έπίσης χρησιμοποιούνται οι όροι "τετραεδρική", "γραμμική", "συντονισμένη" ή "συνδυασμένη").

Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχει αποδειχθεϊ ότι συντίθεται από τέσσερεις ταυτόσημες ή περίπου ταυτόσημες υπομονάδες.

Συγκρίσεις μέ άλλες γεωμετρικές μορφές και αριθμούς υπομονάδων δίνουν ισχυρές ένδείξεις ότι τά ποιοτικά συμπεράσματα δέν έξαρτώνται από τήν είδική γεωμετρία ή έκλογή του αριθμού τών υπομονάδων. Ποσοτικές όμως συγκρίσεις θά απαιτήσουν μιά συλλογή από τίς μεταβλητές, που προαναφέρθηκαν.

Τό διάγραμμα (11) δείχνει τή πολυπλοκότητα, που αποκτάται μέ τό προστιθέμενο (δεύτερο) υποκαταστάτη και παρουσιάζει λίγα μόνο από τά είδη, που περιέχουν  $X$  και  $L$ .

#### Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (11)



Μερικά μοριακά είδη, που μπορούν νά παραχθούν όταν δύο υποκαταστάτες  $X$  και  $L$  συνδέονται σε μιά πρωτεΐνη, που αποτελείται από τέσσερες υπομονάδες.

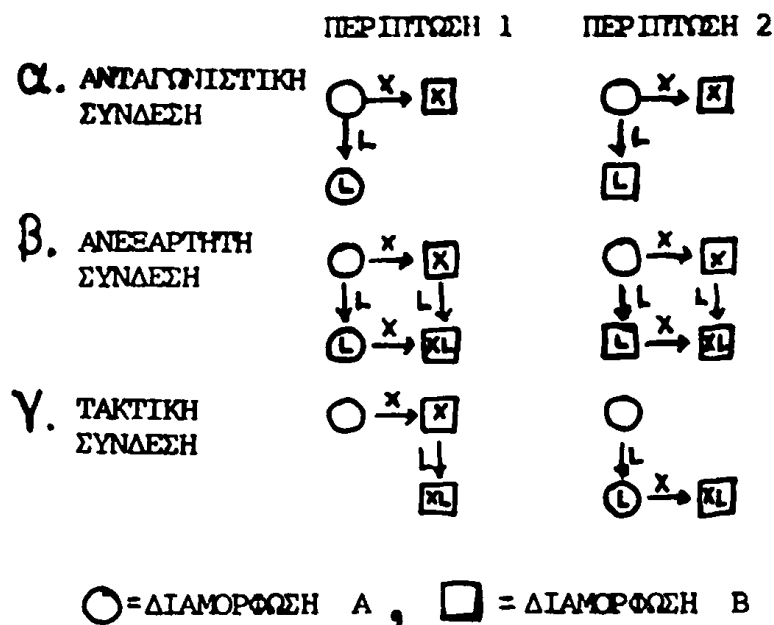


Έξ αιτίας της περιπλοκότητας, πού παρουσιάζεται από τό πρόσθετο υποκαταστάτη σέ μιá πρωτεΐνη πού έχει τέσσερεις υπομονάδες, γίνεται φανερό ότι είναι αναγκαίο ένα συστηματικό πλησίασμα στις πιθανές αλλαγές.

Αυτό θά γίνει προσδιορίζοντας όλους τούς προφανείς τρόπους δέσμευσης σέ μιá ανεξάρτητη υπομονάδα και μετά, προσδιορίζοντας τίς αλλαγές από τήν επίδραση της υπομονάδας αυτής στις γειτονικές υπομονάδες μιáς τετραμερούς πρωτεΐνης.

Οι προφανείς τρόποι δέσμευσης σέ μιá ανεξάρτητη υπομονάδα, δύο υποκαταστατών, φαίνονται στό διάγραμμα (12).

### Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (12)



Τρεις τύποι σύνδεσης δύο υποκαταστατών σέ μιá από τίς υπομονάδες μιáς τετραμερούς πρωτεΐνης.

Στό διάγραμμα (12) ή αλλαγή από μιá "κυκλική" μορφή σέ μιá "τετραγωνική" (δηλ. από Α σέ Β) χρησιμοποιείται για νά δηλώσει μόνο τίς διαμορφωτικές αλλαγές πού έπηρεάζουν τίς αλληλοεπιδράσεις τών υπομονάδων. Υπάρχουν και άλλες διαμορφωτικές (αλλαγές) επιδράσεις, πού έπηρεάζουν τήν ένεργότητα και μπορούν νά παρουσιαστούν και νά προσδιοριστούν άργότερα. Έδώ οι διαμορφωτικές επιδράσεις είναι προσδιορισμένες όσον άφορά τή συνεργατική σύνδεση.



Γιά μιá δεδομένη υπομονάδα, πού δεσμεύει τούς X καί L μαζί, τέσσερεις πιθανές διαμορφωτικές καταστάσεις μπορούν νά υπάρχουν:

- (Α) χωρίς τούς X καί L δεσμευμένους,
- (Β) μέ δεσμευμένο τόν X μόνο,
- (Γ) μέ δεσμευμένο τόν L μόνο,
- (Δ) μέ δεσμευμένους τούς X καί L μαζί.

Φαίνεται, λοιπόν, άμέσως ότι υπάρχουν πολυάριθμες άλληλοεπιδράσεις υπομονάδων, πού μπορούν νά δηλωθούν μέ τίς  $K_{AA}$ ,  $K_{AB}$ ,  $K_{BG}$ ,  $K_{GD}$ , κ.ο.κ. Αποφεύγουμε τέτοιες πολυπλοκότητες υποθέτοντας ότι μόνο δύο διαμορφωμερείς καταστάσεις είναι αναγκαίο νά προσδιοριστούν, όσον αφορά τό ένδιαφέρον πάνω σέ ένδοϋπομοναδικές άλληλοεπιδράσεις.

Από τά παραπάνω υποτίθεται ότι όταν σέ μιá υπομονάδα είναι δεσμευμένος ό X ( Β διαμόρφωση) οι ένδοϋπομοναδικές άλληλοεπιδράσεις δέν θά είναι οι ίδιες καί όταν ό L θά είναι δεσμευμένος, χωρίς ή μέ τόν X ( Γ διαμόρφωση) στην ίδια υπομονάδα.

Αυτό σημαίνει ότι ή υπομονάδα της πρωτεΐνης, όταν περιέχει τόν L, δέν είναι στην ίδια ακριβώς όπως στην Α ή στη Β κατάσταση καί ότι ή διαμόρφωση πού παράγεται μέ τή νέα δέσμευση έκτείνει παρόμοιες καί όχι τίς ίδιες ακριβώς δυνάμεις δέσμευσης σέ γειτονικές υπομονάδες όπως οι παρόμοιες της διαμορφωτικές καταστάσεις ( Α ή Β ).

Αν συμβολίσουμε μέ U τό κλάσμα τών ενεργών κέντρων μιās πρωτεΐνης, πού είναι συνδεδεμένα, μέ i τόν αριθμό τών μορίων ένός  $\Phi$  υποκαταστάτη, πού είναι συνδεδεμένα σέ ένα ξεχωριστό μόριο πρωτεΐνης καί μέ  $N_{\Phi}$  τό μέσο όρο του αριθμού τών μορίων του  $\Phi$  υποκαταστάτη, πού είναι συνδεδεμένα ανά μόριο (ένζυμο) πρωτεΐνης, τότε ισχύει ή έξίσωση:

$$(13) \quad N_{\Phi} = n \times U = \frac{(\text{ένώμένος-δεσμευμένος } \Phi)}{(\text{όλική πρωτεΐνη-ένζυμο})} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} i \times (E \times \Phi)^i}{\sum_{i=0}^{i=n} (E \times \Phi)^i}$$





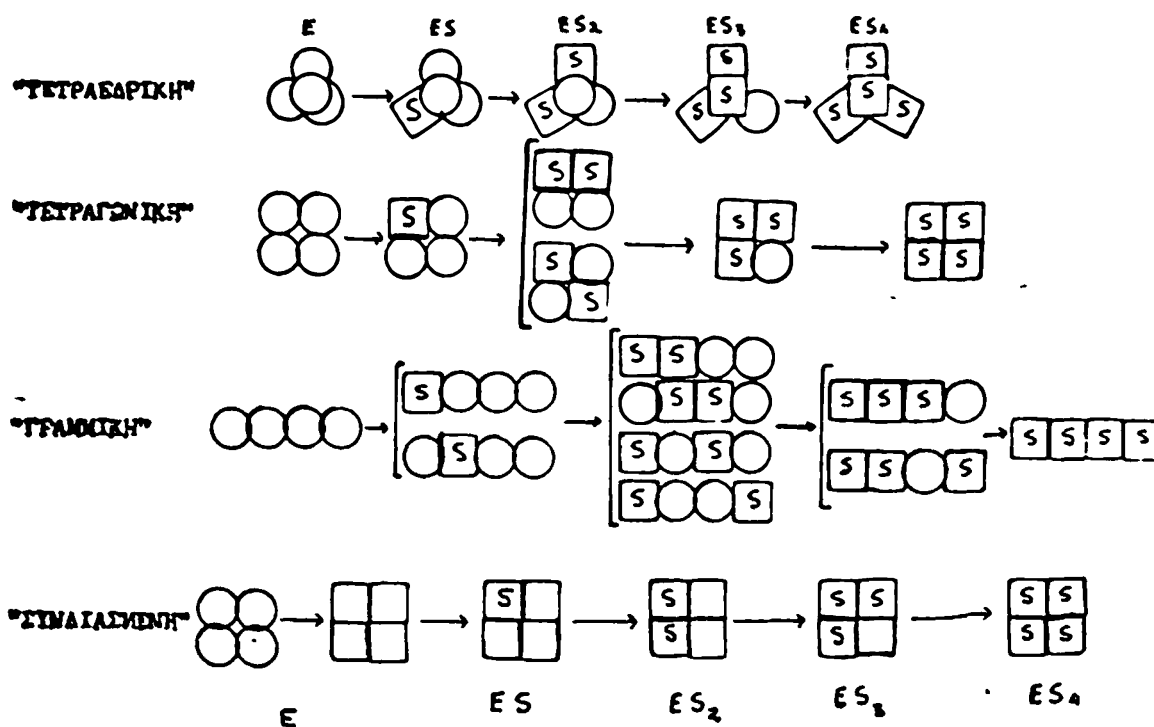
$\delta$ που  $n$  αναπαριστά τον αριθμό των υπομονάδων κάθε πρωτεΐνης  
 $U$  μεταβάλλεται από 0 ως 1  
 $N_{\oplus}$  μεταβάλλεται από 0 ως  $n$ , μπορεί να πάρει και τιμές  
 κλασματικές  
 $i$  μεταβάλλεται από 0 ως  $n$ , δέν μπορεί να πάρει τιμές  
 κλασματικές, αλλά μόνο  
 ακέραιες.

Οι όροι, που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των  
 δομών, "τετραεδρική", "τετραγωνική", "γραμμική", "συνδιασμένη"  
 και έχουν αναφερθεί πιο πάνω δηλώνουν επιτρεπόμενες ένδοϋπο-  
 μοναδικές αλληλοεπιδράσεις και δέν χρησιμοποιούνται για να  
 δηλώσουν, αναγκαία, τή πραγματική διευθέτηση των υπομονάδων  
 στο χώρο των τριών διαστάσεων. Για παράδειγμα στη "τετραεδρική"  
 περίπτωση υποτίθεται ότι κάθε υπομονάδα μπορεί να αλληλοεπιδρά  
 μέ κάθε μία από τις γειτονικές της άλλες τρεις υπομονάδες, όμως  
 αυτό θα μπορούσε να γίνει και στη περίπτωση της "τετραγωνικής"  
 αν ήταν επιτρεπόμενες οι διαγώνιες αλληλοεπιδράσεις των  
 υπομονάδων.

Στο διάγραμμα (13) αναπαριστώνται οι τέσσερες περιπτώ-  
 σεις, που αναφέρθηκαν πιο πάνω.



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (13)



Τέσσερες περιπτώσεις τετραμερῶν με ὅμοιες ὑπομονάδες.

Ἐξηγῶντας τό διάγραμμα (13) ἔχουμε νά ποῦμε ὅτι σ'αυτό παρουσιάζονται οἱ τέσσερεις σπουδαιότερες περιπτώσεις ἔνζυμων-πρωτεΐνων με τέσσερεις ὑπομονάδες ταυτόσημες μεταξύ τους.

Γιά τή "τετραεδρική" ἔχουμε πεῖ ἀρκετά. Γιά τή "τετραγωνική" περίπτωση προσθέτουμε ὅτι δέν ὑπάρχουν διαγώνιες ἀλληλοεπιδράσεις τῶν ὑπομονάδων. Στή "γραμμική" περίπτωση κάθε ὑπομονάδα ἐπιδρά μόνο με τή διπλανή της καί δέν ὑπάρχουν ἐπιδράσεις μεταξύ ἀκραιῶν ὑπομονάδων. Ἡ "συνδιασμένη" περίπτωση ἀναπαρίσταται σάν τή "τετραγωνική" ἀλλά ὅλες οἱ ὑπομονάδες ἀλλάζουν ταυτόχρονα διαμόρφωση με τήν εἰσοδο τοῦ πρώτου ὑποκαταστάτη σέ μιά ὑπομονάδα. Αὐτή ἡ τελευταία περίπτωση εἶναι καί ἡ ἀναπαράσταση τοῦ ἀλλοστερικοῦ πρότυπου τῶν Monod, Wyman, Changeux, πού καλεῖται "συμμετρικό". Φαίνεται λοιπόν ἐδῶ καθαρά ὅτι τό μοντέλο αὐτό εἶναι μιά εἰδική περίπτωση τοῦ μοντέλου τῶν Koshland, Nemethy, Filmer, πού ὀνομάζεται, γι'αυτό, "γενικευμένο".<sup>38</sup>



Προσδιορισμός και παραγωγή εξισώσεων σύνδεσης

Αν υποθέσουμε ότι δεν υπάρχουν αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, ο βαθμός πολυμερισμού των πρωτεϊνών είναι άσημαντος. Καί τότε οι καμπύλες κορεσμού ακολουθούν τη τυπική Michaelis-Menten εξίσωση<sup>39</sup> :

$$v = \frac{V_{\max} \cdot X}{K_m + X} \quad , \quad \frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{X}}$$

ή τη μορφή, που έχει προταθεί από τον Hill για πρωτεΐνες με περισσότερες από μία υπομονάδες:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_m}{X}\right)^n}$$

όπου  $n$  ο αριθμός των υπομονάδων της πρωτεΐνης.




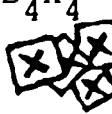
Αν λάβουμε υπόψη μας και τις αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, οι εξισώσεις των καμπυλών κορεσμού είναι περισσότερο πολύπλοκες.

Στό διάγραμμα (14) (α, β, γ, δ,) δίνονται σχηματικές παραστάσεις των διαμορφωτικών αλλαγών για τη περίπτωση των αλληλοεπιδράσεων, όταν γίνεται σύνδεση με ένα υποκαταστάτη  $X$ , που στη προκειμένη περίπτωση μετατρέπει τη διαμόρφωση της υπομονάδας από  $A$  σε  $B$ .





Εξετάζονται οι τέσσερες περιπτώσεις των διατάξεων, που έχουν συζητηθεί πιο πάνω.



## Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α 14 (α-β)

ΜΟΝΤΕΛΟ " ΤΕΤΡΑΕΔΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ " , 1 <sup>ος</sup> ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ X				
Μοριακά είδη	$A_3BX$ 	$A_2B_2X_2$ 	$AB_3X_3$ 	$B_4X_4$ 
Αριθμός τρόπων σύνδεσης ενός μόριου υποκαταστάτη X	4	6	4	1
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών A - B	3	4	3	0
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών B - B	0	1	3	6
α/α	1	2	3	4

(α)

ΜΟΝΤΕΛΟ " ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ " , 1 <sup>ος</sup> ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ X				
Μοριακά είδη	$A_3BX$ 	$A_2B_2X_2$ 	$AB_3X_3$ 	$B_4X_4$ 
Αριθμός τρόπων σύνδεσης ενός μόριου υποκαταστάτη X	4	4      2	4	1
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών A - B	2	2      4	2	0
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών B - B	0	1      0	2	4
α/α	1	2α    2β	3	4

(β)



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α 14 (γ-δ)

ΜΟΝΤΕΛΟ " ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ " , 1 <sup>ος</sup> ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ X						
Μοριακά είδη	A <sub>3</sub> BX	A <sub>3</sub> BX	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	AB <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	B <sub>4</sub> X <sub>4</sub>
Αριθμός τρόπων σύνδεσης ενός μόριου υποκαταστάτη X	2	2	2 2	1 1	2 2	1
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών A - B	1	2	1 3	2 2	1 2	0
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών B - B	0	0	1 0	1 0	2 1	3
α/α	1α	1β	2α 2β	2γ 2δ	3α 3β	4

(γ)

ΜΟΝΤΕΛΟ " ΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ " , 1 <sup>ος</sup> ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ X					
Μοριακά είδη	A <sub>3</sub> BX	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> X		AB <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	B <sub>4</sub> X <sub>4</sub>
Αριθμός τρόπων σύνδεσης ενός μόριου υποκαταστάτη X	4	6		4	1
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών A - B	0	0		0	0
Αριθμός αλληλεπιδράσεων ζευγών B - B	4	4		4	4
α/α	1	2		3	4

(δ)



“Ας φιάξουμε τούς όρους τής έξίσωσης (13) για τή περίπτωση τής “τετραγωνικής” διάταξης.

$$(14) \quad N_{Xt} = \frac{\vartheta_1 \cdot (X) + 2\vartheta_2 \cdot (X)^2 + 3\vartheta_3 \cdot (X)^3 + 4\vartheta_4 \cdot (X)^4}{\vartheta_0 + \vartheta_1 \cdot (X) + \vartheta_2 \cdot (X)^2 + \vartheta_3 \cdot (X)^3 + \vartheta_4 \cdot (X)^4} \quad \text{όπου:}$$

$$\vartheta_0 = 1 \quad , \quad \vartheta_1 = \frac{\theta_1}{(X) \cdot (A_4)} \quad , \quad \vartheta_2 = \frac{\theta_2}{(X)^2 \cdot (A_4)} \quad , \quad \vartheta_3 = \frac{\theta_3}{(X)^3 \cdot (A_4)}$$

$$\vartheta_4 = \frac{\theta_4}{(X)^4 \cdot (A_4)} \quad \text{καί} \quad \theta_1 = 4 \cdot (K_{AB})^2 \cdot (K_X) \cdot (K_t) \cdot (X) \cdot (A_4)$$

$$\theta_2 = 4 \cdot (K_{AB})^2 \cdot (K_{BB}) \cdot (K_X)^2 \cdot (K_t)^2 \cdot (X)^2 \cdot (A_4) + 2 \cdot (K_{AB})^4 \cdot (K_X)^2 \cdot (K_t)^2 \cdot (X)^2 \cdot (A_4)$$

$$\theta_3 = 4 \cdot (K_{AB})^2 \cdot (K_{BB})^2 \cdot (K_X)^3 \cdot (K_t)^3 \cdot (X)^3 \cdot (A_4)$$

$$\theta_4 = (K_{BB})^4 \cdot (K_X)^4 \cdot (K_t)^4 \cdot (X)^4 \cdot (A_4)$$

Έξηγώντας τά διαγράμματα (14), για τό τρόπο πού παράγονται οι σχέσεις  $\theta$  έχουμε νά πούμε τά παρακάτω:

Στή περίπτωση του διαγράμματος (14)β, πού ένα μόνο μόριο υποκαταστάτη έχει καταλάβει ένα μόριο ένζυμου (έχει καταλάβει μία υπομονάδα, πού τή μετέτρεψε σέ Β διαμορφωμερές), μπορούν νά υπάρχουν 4 τρόποι σύνδεσης, όπως φαίνεται σ' αυτό καθαρά. Συμβαίνουν, επίσης, 2 δυνατές αλληλοεπιδράσεις ζευγών Α-Β καί καμία μεταξύ ζευγών Β-Β διότι στή περίπτωση αυτή δέν υπάρχει παρά μόνο μία υπομονάδα μέ Β διαμόρφωση στό μόριο του ένζυμου. Στή περίπτωση πού δύο μόρια υποκαταστάτη είναι ανά μόριο ένζυμου μπορούν νά συμβαίνουν δύο είδων δομές καί έχουμε, γι' αυτό δύο είδων σχέσεις μέ προσθετικό τό τελικό αποτέλεσμα. Μέ τίς ίδιες σκέψεις παράγουμε τίς  $\theta$  σχέσεις για όλες τίς υπόλοιπες περιπτώσεις.



Για τή πλήρη κατανόηση του τρόπου, πού περιγράφεται πιο πάνω μπορούμε νά προσθέσουμε ότι οι  $\theta$  σχέσεις είναι γινόμενα παραγόντων μέ φυσική σημασία (π.χ. στή περίπτωση τής  $\theta_1$  ο αριθμητικός παράγοντας 4 διότι τέσσερεις δυνατοί τρόποι σύνδεσης υπάρχουν και άρα τέσσερες φορές τό ίδιο γινόμενο, ή  $(K_{AB})$  ύψωμένη στή  $2^2$  δύναμη διότι δύο φορές γίνεται ή αντίδραση αλληλοεπίδρασης υπομονάδων A-B, ή  $(K_X)$  στή  $1^2$  δύναμη διότι μία υπομονάδα έχει δεσμευτεί, ή  $(K_t)$  στή  $1^2$  δύναμη διότι γίνεται μία αντίδραση μετατροπής από B διαμόρφωση σέ A άφοϋ μία μόνο υπομονάδα είναι στή B διαμόρφωση, ο  $(X)$  διότι συμμετέχει στοιχειομετρικά στήν αντίδραση όπως και ο παράγοντας  $(A_4)$ , πού δέν είναι τίποτα άλλο από τό ένζυμο πού δέν έχει αντίδρασει.

Αντικαθιστώντας στή (14) τίς τιμές  $\theta_1, \theta_2, \theta_3, \theta_4, \theta_0, \theta_1, \theta_2, \theta_3, \theta_4$ , φιάχνουμε τήν έξίσωση (15).

Για συντομία καλοϋμε τή  $K_X K_t X = F$ . Τότε ή έξίσωση (15) γίνεται :

$$N_{Xt} = \frac{4K_{AB}^2 F + 4(K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}) F^2 + 12K_{AB}^2 K_{BB}^2 F^3 + 4K_{BB}^4 F^4}{1 + 4K_{AB}^2 F + (2K_{AB}^4 + 4K_{AB}^2 K_{BB}) F^2 + 4K_{AB}^2 K_{BB}^2 F^3 + K_{BB}^4 F^4}$$

Μέ τόν ίδιο, ακριβώς τρόπο σκέψης παράγονται άπλά οι έξισώσεις τής μορφής τών (13)-(14)-(15) (έξισώσεων) και για τίς άλλες τρεις περιπτώσεις "τετραγωνικής", "γραμμικής" και "συνδιασμένης", διατάξεων. Καταλήγουμε σέ έξισώσεις άνάλογες τής (15).



Άς εξετάσουμε τή περίπτωση, όπου έχουμε δέσμευση και δεύτερου υποκαταστάτη. Οδ εξισώσεις, τότε, γίνονται περιπλοκώτερες.

Ἡ γενική εξίσωση, ἡ αντίστοιχη πρὸς τὶς (13)-(14) εἶναι

ἡ (16) :

$$(16) \quad N = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} i \cdot \Psi_i'(\text{ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ})^i}{\sum_{i=0}^{i=n} \Psi_i(\text{ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ})^i}$$

ὅπου :  $i$ , ὁ ἀριθμὸς μορίων υποκαταστάτη συνδεδεμένου ἀνά μόριο πρωτεΐνης (ένζυμου)

$n$ , ὁ ἀριθμὸς τῶν υπομονάδων τῆς πρωτεΐνης.

$\Psi \neq \Psi'$ , συναρτήσεις

$N$ , ὁ μέσος ὅρος τοῦ ἀριθμοῦ τῶν μορίων τοῦ υποκαταστάτη τοῦ συνδεδεμένου ἀνά μόριο ένζυμου.

ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ =  $Y$  (ἀνάλογα ὁ  $X$  ἢ ὁ  $L$ )

Γιὰ  $n=4$  ἡ (16) γράφεται :

$$(17) \quad N = \frac{\Psi_1'(Y) + 2\Psi_2'(Y)^2 + 3\Psi_3'(Y)^3 + 4\Psi_4'(Y)^4}{\Psi_0 + \Psi_1(Y) + \Psi_2(Y)^2 + \Psi_3(Y)^3 + \Psi_4(Y)^4}$$

Ἄν  $N = N_{Xt}$  ἢ  $N = N_{Lt}$ , τότε  $\Psi = \Psi'$ . Σέ ὅλες τὶς ἄλλες περιπτώσεις δέν ἰσχύει ἡ ἰσότητα.

Ὁ τρόπος παραγωγῆς τῶν  $\Psi$  συναρτήσεων, ἀπὸ συναρτήσεις  $\theta$  περιγράφεται πιὸ κάτω. Πρέπει ὅμως νά ποῦμε ὅτι ἡ παραγωγή τέτοιων συναρτήσεων θά γίνει γιὰ εἰδικές περιπτώσεις ὅπως τὶς  $N_{Xt}$  ἢ  $N_{Lt}$ , γιὰ  $n=4$  καὶ ὑποθέτοντας ὅτι δέν ὑπάρχουν ἀλληλοεπιδράσεις μεταξύ τῶν υποκαταστατῶν.

Κάθε  $\Psi_i(Y)^i$  ὅρος τῆς εξίσωσης (16) ἢ τῆς (17), ἀναπαριστᾷ τή συγκέντρωση ὅλων τῶν ένζυμικῶν εἰδῶν, πού ἔχουν  $i$  μόρια συνδεδεμένου υποκαταστάτη.

Γιὰ τὴν εξίσωση  $N_{Xt}$  (στή περίπτωση δύο υποκαταστατῶν πάντα) καὶ γιὰ ἀνταγωνιστική σύνδεση, ὁ ὅρος  $\Psi_0$  εἶναι τὸ





άθροισμα όλων των ένζυμικών ειδών, πού δέν έχουν συνδεθεῖ μέ  $X$  δηλαδή τά πέντε είδη, πού δέν έχουν συνδεθεῖ μέ  $X$  ἀλλά έχουν συνδεθεῖ μέ μηδέν ὡς τέσσερα μόρια τοῦ ὑποκαταστάτη  $L$ . Ὑπολογίζονται μέ στατιστικά δεδομένα καί καταλήγουμε στή σχέση:

$$\Psi_{0N_{Xt}} = 1 + 4 \cdot (K_L) \cdot (L) + 6 \cdot (K_L)^2 \cdot (L)^2 + 4 \cdot (K_L)^3 \cdot (L)^3 + (K_L)^4 \cdot (L)^4 = (1 + K_L \cdot L)^4$$

Γιά τήν ἐξίσωση  $N_{Lt}$  (στή περίπτωση δύο ὑποκαταστατῶν) ὁ ὅρος  $\Psi_0$  εἶναι τό ἀθροισμα τῶν πέντε ένζυμικών ειδῶν, πού δέν έχουν συνδεθεῖ μέ  $L$  ὑποκαταστάτη ἀλλά έχουν συνδεθεῖ μέ τόν  $X$ . Τότε :

$$\Psi_{0N_{Lt}} = \vartheta_0 + \vartheta_1 \cdot (X) + \vartheta_2 \cdot (X)^2 + \vartheta_3 \cdot (X)^3 + \vartheta_4 \cdot (X)^4$$

(εἶναι τό ἴδιο πολυώνυμο μέ τό παρονομαστή τῆς ἐξίσωσης (14)).

Οἱ συναρτήσεις  $\Psi_i$  ἢ  $\Psi'_i$ , πού συμβολίζουν ὄρους γιά τό νέο ὑποκαταστάτη καί τά νέα μοριακά είδη, παράγονται ἀπό τά μητρικά μοριακά είδη, πού περιεῖχαν μόνο ἓνα ὑποκαταστάτη.

Ἄν ὑποθέσουμε ὅτι ὁ  $X$  εἶναι ὁ πρῶτος ὑποκαταστάτης τότε τά μητρικά είδη εἶναι αὐτά, πού περιέχουν τόν ἴδιο ἀριθμό ὑπομονάδων σέ  $B$  διαμόρφωση (έχει ὑποτεθεῖ ὅτι ὁ  $X$  συνδέεται πάντα σέ  $B$  διαμόρφωση τῆς ὑπομονάδας).

Μιά πολύ παραστατική εἰκόνα τοῦ τρόπου, πού θά περιγραφεῖ μᾶς δίνει ὁ πίνακας VI.

Κάθε νέος  $\Psi_i$  ἢ  $\Psi'_i$  ὅρος θά ἰσοῦται μέ τόν ἀντίστοιχο  $\vartheta_i$  παράγοντα ἐπί ἓνα στατιστικό παράγοντα, πού δηλώνει τόν ἀριθμό τῶν ἰσοδύναμων τρόπων σύνδεσης τοῦ  $L$  γιά τό εἶδος, πού συζητᾶμε ἐκείνη τή στιγμή, ἐπί  $X^i$  ὅπου  $i$  εἶναι ὁ ἀριθμός τῶν μόριων τοῦ  $X$ , πού εἶναι συνδεδεμένα στό νέο εἶδος, ἐπί  $[(K_L) \cdot (L)]^d$  ὅπου  $d$  εἶναι ὁ ἀριθμός τῶν μόριων τοῦ  $L$ , πού συνδέονται σέ ὑπομονάδες μέ  $A$  διαμόρφωση, ἐπί  $[(K_L) \cdot (L)]^e$  ὅπου  $e$  εἶναι ὁ ἀριθμός τῶν μόριων τοῦ  $L$ , σέ ὑπομονάδες πού περιέχουν  $X$  (σέ  $B$  διαμόρφωση), ἐπί τόν παράγοντα



$$\left[ \frac{(K_L) \cdot (L)}{(K_X)} \right]^f$$

όπου  $f$  είναι ο αριθμός των μορίων του  $L$ , πού

συνδέονται σε υπομονάδες με  $B$  διαμόρφωση και δέν περιέχουν  $X$ .

Όπως και πιο πάνω έχει αναφερθεί ο πίνακας VI μās δίνει μερικά μοριακά είδη νέου τύπου και τό πρακτικό τρόπο παραγωγής τους.

Γιά τίς έξιωσεις τών  $N_{Xt}$  και  $N_{Lt}$  ίσχύει ότι  $\Psi_i = \Psi'_i$  για κάθε  $\Psi_i$  όρο. Μένει τώρα νά έξεταστεί ή περίπτωση όπου έχουμε δέσμευση και δεύτερου υποκαταστάτη αλλά με άλληλοεπιδράσεις μεταξύ τών υποκαταστατών. Οί έξιωσεις, πού περιγράφουν τέτοιες δεσμεύσεις είναι τόσο πολύπλοκες, πού έχουν χρησιμοποιηθεί ήλεκτρονικοί υπολογιστές και άυτόγραφικά μηχανήματα για τόν υπολογισμό τους και τίς γραφικές παραστάσεις τών καμπυλών πού παράγονται από αυτές.

Οί πίνακες  $VII_A$  και  $VII_B$  μās δίνουν μερικές έξιωσεις για τή παραπάνω περίπτωση και τά διάφορα είδη μηχανισμών.



Π Ι Ν Α Κ Α Σ    V I

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΝΕΩΝ Ψ ΟΡΩΝ (ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ  
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ) ΑΠΟ ΤΑ ΜΗΤΡΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΙΔΗ

Νέο είδος	μητρικό είδος	$\vartheta_i$ παράγων	δρος για τη σύνδεση του L	στατιστ. παράγων	Νέος Ψ δρος
		$\vartheta_1$	$K_L \cdot L$	3	$3\vartheta_1 \cdot K_L \cdot L \cdot X$
		$\vartheta_1$	$(K_L \cdot L)^3$	1	$\vartheta_1 \cdot (K_L \cdot L)^3 \cdot X$
		$\vartheta_3$	$K_L \cdot L$	1	$\vartheta_3 \cdot K_L \cdot L \cdot X^3$
		$\vartheta_3$	$\frac{K_L \cdot L}{K_X}$	3	$3\vartheta_3 \left[ \frac{K_L \cdot L \cdot X^2}{K_X} \right]$
		$\vartheta_3$	$K_L \cdot L$	3	$3\vartheta_3 \cdot K_L \cdot L \cdot X^3$
		$\vartheta_3$	$\left[ \frac{K_L \cdot L}{K_X} \right]^3$	1	$\vartheta_3 \left[ \frac{K_L \cdot L \cdot X^3}{K_X} \right]$
		$\vartheta_4$	$\frac{K_L \cdot L}{K_X}$	4	$4\vartheta_4 \left[ \frac{K_L \cdot L}{K_X} \right]^3$
		$\vartheta_4$	$K_L \cdot L \left[ \frac{K_L \cdot L}{K_X} \right]$	12	$12\vartheta_4 \cdot K_L \cdot L \left[ \frac{K_L \cdot L \cdot X^3}{K_X} \right]$
		$\vartheta_2$	$K_L \cdot L$	2	$2\vartheta_2 \cdot K_L \cdot L \cdot X^2$
		$\vartheta_4$	$K_L \cdot L$	4	$4\vartheta_4 \cdot K_L \cdot L \cdot X^4$



Π Ι Ν Α Κ Α Σ    V I I <sub>A</sub>

ΜΕΡΙΚΟΙ Ψ ΟΡΟΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ ΚΟΡΕΣΜΟΥ  $N_{Xt}$  ,  $N_X$  ,  $N_{XL}$  ,  
 ΟΤΑΝ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΔΥΟ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ, ΣΕ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΜΕ  $n$  ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ ,  
 ΣΥΝΒΑΙΝΟΥΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΑΥΤΩΝ

$\alpha$ /	$\Psi_i$ γιά $N_{Xt}, N_X, N_{XL}$	$\Psi'_i$ γιά $N_X$	$\Psi'_i$ γιά $N_{XL}$
1	$\theta_i (1+K_L L)^{n-i}$	$\theta_i (1+K_L L)^{n-1}$	0
2	$\sum_{z=i}^n \frac{z!}{i!(z-i)!} \theta_z \left(\frac{K_L L}{K_x}\right)^{z-i}$	$\sum_{z=i}^n \frac{z!}{i!(z-i)!} \theta_z \left(\frac{K_L L}{K_x}\right)^{z-1}$	0
3	$\theta_i (1+K_L L)^n$	$\theta_i (1+K_L L)^{n-1}$	$\theta_i (K_L L) (1+K_L L)^{n-1}$
4	$(1+K_L L)^i \sum_{z=i}^n \frac{z!}{i!(z-i)!} \theta_z \left(\frac{K_L L}{K_x}\right)^{z-i}$	$(1+K_L L)^{i-1} \sum_{z=i}^n \frac{z!}{i!(z-i)!} \theta_z \left(\frac{K_L L}{K_x}\right)^{z-i}$	$(1+K_L L)^{i-1} (K_L L) \sum_{z=i}^n \frac{z!}{i!(z-i)!} \theta_z \left(\frac{K_L L}{K_x}\right)^{z-i}$
5	$\theta_i (1+K_L L)^i$	$\theta_i (1+K_L L)^{i-1}$	$\theta_i (K_L L) (1+K_L L)^{i-1}$
6	$\theta_i (K_L L)^i (1+K_L L)^{n-i}$	0	$\theta_i (K_L L)^i (1+K_L L)^{n-i}$

- |                  |     |          |
|------------------|-----|----------|
| 1. Άνταγωνιστική | (α) | άναστολή |
| 2. Άνταγωνιστική | (β) | άναστολή |
| 3. Ανεξάρτητη    | (α) | άναστολή |
| 4. Ανεξάρτητη    | (β) | άναστολή |
| 5. Συνδιασμένη   | (α) | άναστολή |
| 6. Συνδιασμένη   | (β) | άναστολή |



Π Ι Ν Α Κ Α Σ VII<sub>B</sub>

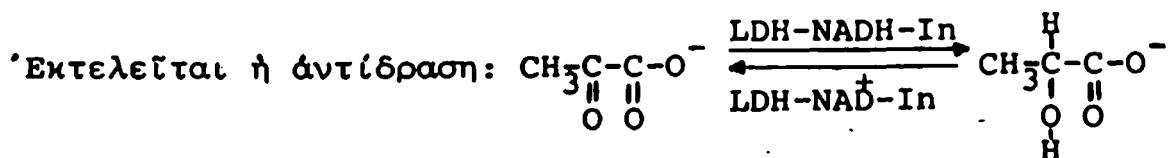
ΜΕΡΙΚΟΙ Ψ ΟΡΟΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ ΚΟΡΕΣΜΟΥ  $N_{Lt}$ ,  $N_L$ ,  $N_{LX}$ ,  
 ΟΤΑΝ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΔΥΟ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ, ΣΕ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΜΕ  $n$  ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ,  
 ΣΥΜΒΑΙΝΟΥΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΑΥΤΩΝ

$\alpha/\alpha$	$\Psi_1$ γιά $N_{Lt}, N_L, N_{LX}$	$\Psi_1'$ γιά $N_L$	$\Psi_1'$ γιά $N_{LX}$
1	$\kappa_L^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_{n-1} x^{n-1}$	$\kappa_L^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_{n-1} x^{n-1}$	0
2	$\left(\frac{\kappa_L}{\kappa_0}\right)^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^{z-1}$	$\left(\frac{\kappa_L}{\kappa_0}\right)^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^{z-1}$	$\neq 0$
3	$\frac{n!}{i!(n-1)!} \kappa_L^i \sum_{z=0}^n \theta_2 x^z$	$\frac{(n-1)!}{i!(n-1)!} \kappa_L^i \sum_{z=0}^n \theta_{n-1} x^{n-1} \frac{z^i}{(z-1)!}$	$\frac{(n-1)!}{i!(n-1)!} \kappa_L^i \sum_{z=0}^n z \theta_2 x^z$
4	$\left(\frac{\kappa_L}{\kappa_0}\right)^i (1+\kappa_0 x)^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^{z-1}$	$\left(\frac{\kappa_L}{\kappa_0}\right)^i (1+\kappa_0 x)^{i-1} \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^{z-1}$	$\kappa_L \left(\frac{\kappa_L}{\kappa_0}\right)^{i-1} (1+\kappa_0 x)^{i-1} \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^{z-1}$
5	$\kappa_L^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^z$	0	$\kappa_L^i \sum_{z=0}^n \frac{z^i}{i!(z-1)!} \theta_2 x^z$
6	$\kappa_L^i \sum_{z=0}^i \frac{(n-2)!}{(n-1)!(i-2)!} \theta_2 x^z$	$\left(\frac{n-i+1}{i}\right) \kappa_L^i \sum_{z=0}^i \frac{(n-2+1)!}{(n-1+1)!(i-2)!} \theta_{2-1} x^{z-1}$	$\frac{i}{1} \kappa_L^i \sum_{z=0}^i \frac{z(n-2)!}{(n-1)!(i-2)!} \theta_2 x^z$

1. Ανταγωνιστική (α) αναστολή  
 2. Ανταγωνιστική (β) αναστολή  
 3. Ανεξάρτητη (α) αναστολή  
 4. Ανεξάρτητη (β) αναστολή  
 5. Συνδιασμένη (α) αναστολή  
 6. Συνδιασμένη (β) αναστολή



## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Μετατροπή του πυροσταφυλικού προς γαλακτικό με ένζυμο τη Γαλακτική Αφυδρογονάση και συνένζυμο NADH. Στην αντίδραση συμμετέχουν διάφοροι αναστολείς.

Ακολουθείται η σπεκτροφωτομετρική μέθοδος και γίνεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφική παραπομπή (33), με τη μεθοδολογία που προτείνεται από τους Hakala M.T. , Glaid A.J. , Schwert G.W.<sup>29</sup> και Wipera D. , Schwert G.W.<sup>40</sup>.

Παρακολουθείται η ελάττωση της απορρόφησης του NADH, που χρησιμοποιείται στην αντίδραση, σε μήκος κύματος  $\lambda=340\text{nm}$ , όταν αυτό μετατρέπεται σε  $\text{NAD}^+$ .

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1) Ρυθμιστικό διάλυμα 0,2 M ιοντικής ισχύος από Tris-tris-HCl-KCl. Διαλύεται ποσότητα του αντιδραστήριου σε δισαπεσταγμένο νερό, έτσι ώστε, στοιχειομετρικά να δίνει διάλυμα 0,2M ιοντικής ισχύος. Το διάλυμα τιτλοδοτείται με HCl 3N και με ηλεκτρόδιο καλομέλανος-γυαλιού μέχρι της επιθυμητής τιμής pH. Στη συνέχεια, προστίθεται στο διάλυμα ποσότητα KCl κρυσταλλικού τόση ώστε να διορθωθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος στη τιμή 0,2M. Φυλάγεται σε κλειστή φιάλη και η τιμή του pH ελέγχεται κάθε φορά πριν από τη χρήση του. (Δέν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό πέρα από τις όκτώ ημέρες).



2) Διαλύματα πυροσταφυλικού Καλίου σε ρυθμιστικό διάλυμα  
 $pH = 7,50$  φωσφορικών.

Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πυροσταφυλικού Καλίου στις παρακάτω συγκεντρώσεις (στή τελική άραιωση μέσα στη κυψελίδα τή στιγμή τής άρχής τής αντίδρασης):

i)	$5,20 \times 10^{-4}$ M	πυροσταφυλικού ανιόντος	
ii)	$2,80 \times 10^{-4}$ M	"	"
iii)	$1,73 \times 10^{-4}$ M	"	"
iv)	$1,30 \times 10^{-4}$ M	"	" (διάλυση σε νερό δισαποσταγμένο)

Οι άραιώσεις στις πιο πάνω συγκεντρώσεις έγιναν από τό φιαλίδιο No.1 τοῦ TEST 124893 BOEHRINGER-MANNHEIM (βιοχημικό αντίδραστήριο).

3) Διάλυμα NADH.

Τό περιεχόμενο τοῦ φιαλίδιου No.2 τοῦ TEST 124893 BOEHRINGER-MANNHEIM (βιοχημικό αντίδραστήριο) διαλύεται σε δισαπεσταγμένο νερό έτσι ὥστε στή τελική άραιωση, μέσα στή κυψελίδα, τή στιγμή τής άρχής τής αντίδρασης ἡ συγκέντρωση τοῦ NADH νά εἶναι  $9,20 \times 10^{-5}$  M.

4) Ὑδατικά διαλύματα ΟΞΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.

Διαλύεται, άρχικά, ποσότητα ὀξαλικού ὀξέος έτσι ὥστε νά ἔχουμε διάλυμα 0,586 M. Από αὐτό σχηματίζονται με άραιωση, διαλύματα τέτοια ὥστε μέσα στή κυψελίδα τή στιγμή τής άρχής τής αντίδρασης οἱ συγκεντρώσεις τῶν ὀξαλικῶν νά εἶναι:

α) $0,25 \times 10^{-4}$ M,	β) $0,50 \times 10^{-4}$ M,	γ) $1,00 \times 10^{-4}$ M,	δ) $1,25 \times 10^{-4}$ M,
ε) $1,50 \times 10^{-4}$ M,	ς) $1,75 \times 10^{-4}$ M,	ζ) $2,00 \times 10^{-4}$ M,	η) $2,25 \times 10^{-4}$ M,
θ) $2,50 \times 10^{-4}$ M,	ι) $2,75 \times 10^{-4}$ M,	ια) $3,00 \times 10^{-4}$ M,	ιβ) $3,50 \times 10^{-4}$ M,
ιγ) $4,00 \times 10^{-4}$ M,	ιδ) $4,50 \times 10^{-4}$ M,	ιε) $5,00 \times 10^{-4}$ M,	ις) $5,20 \times 10^{-4}$ M,
ιζ) $5,40 \times 10^{-4}$ M,	ιη) $5,60 \times 10^{-4}$ M,	ιθ) $5,80 \times 10^{-4}$ M,	κ) $6,00 \times 10^{-4}$ M,
κα) $6,50 \times 10^{-4}$ M,	κβ) $7,00 \times 10^{-4}$ M,	κγ) $7,50 \times 10^{-4}$ M,	κδ) $8,00 \times 10^{-4}$ M,
κε) $8,50 \times 10^{-4}$ M,	κς) $9,00 \times 10^{-4}$ M,	κζ) $9,50 \times 10^{-4}$ M,	κη) $9,60 \times 10^{-4}$ M,
κθ) $1,00 \times 10^{-3}$ M,	λ) $1,05 \times 10^{-3}$ M,	λα) $1,10 \times 10^{-3}$ M,	λβ) $1,20 \times 10^{-3}$ M,
λγ) $1,30 \times 10^{-3}$ M,	λδ) $1,40 \times 10^{-3}$ M,	λε) $1,50 \times 10^{-3}$ M,	λς) $2,00 \times 10^{-3}$ M,
λζ) $2,10 \times 10^{-3}$ M,	λη) $2,20 \times 10^{-3}$ M.		



## 5) Υδατικά διαλύματα ΜΥΡΜΗΚΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.

Διαλύεται με όμοιο τρόπο, όπως και πιο πάνω αναφέρεται.

Σχηματίζονται διαλύματα, από τό μυρμηκικό όξύ, έτσι ώστε μέσα στη κυψελίδα τή στιγμή τής άρχής τής αντίδρασης οί συγκεντρώσεις τών μυρμηκικών νά είναι όπως αναφέρονται πιο πάνω για τό όξαιικό όξύ.

6) Υδατικά διαλύματα  $HgCl_2$ .

Διαλύεται με ίσχυρή θέρμανση ποσότητα  $HgCl_2$  σε νερό δισαπεσταγμένο έτσι ώστε νά σχηματιστεί κεκορεσμένο διάλυμα, σε θερμοκρασία  $23^{\circ}C$  (1g  $HgCl_2$  διαλύεται σε 13,5ml νερού).

Μέ άραίωση παίρνουμε διαλύματα τέτοια ώστε όταν άρχίζει ή αντίδραση, μέσα στη κυψελίδα, οί συγκεντρώσεις του  $HgCl_2$  νά είναι :

α)  $0,25 \times 10^{-4} M$  , β)  $0,50 \times 10^{-4} M$  , γ)  $1,00 \times 10^{-4} M$  , δ)  $1,25 \times 10^{-4} M$  ,  
 ε)  $1,50 \times 10^{-4} M$  , ς)  $1,75 \times 10^{-4} M$  , ζ)  $2,00 \times 10^{-4} M$  , η)  $2,25 \times 10^{-4} M$  ,  
 θ)  $2,50 \times 10^{-4} M$  , ι)  $2,75 \times 10^{-4} M$  , ια)  $3,00 \times 10^{-4} M$  , ιβ)  $3,50 \times 10^{-4} M$  ,  
 ιγ)  $4,00 \times 10^{-4} M$  .

## 7) ENZYMA

ι) Γαλακτική Αφυδρογονάση ( $H_4$ ) από καρδιά βοδιού. Βιοχημικό αντιδραστήριο BOEHRINGER-MANNHEIM 15375 (ELAE) συγκέντρωσης 10 mg/2ml .

ιι) Γαλακτική Αφυδρογονάση ( $M_4$ ) από μύες βοδιού. Βιοχημικό αντιδραστήριο BOEHRINGER-MANNHEIM 15374 (ELAF) συγκέντρωσης 50mg/10ml .

Στή κυψελίδα τοποθετείται μικροποσότητα από τό ένζυμο, πού έχει ήδη άραιωθεί με τό BUFFER πού χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Οί άραιώσεις του ένζυμου γίνονται τέτοιες ώστε νά δημιουργείται διάλυμα τής τάξης του  $0,05 \mu mol/ml$ .

Όλες οί μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία χώρου  $23^{\circ}C$  και άφού τά διάφορα διαλύματα είχαν τή θερμοκρασία αυτή.

Οί μετρήσεις έγιναν σε σπεκτροφωτόμετρο UNICAM .





Στή κυψελίδα του σπεκτροφωτόμετρου προστίθενται τὰ παρακάτω αντιδραστήρια, με τή σειρά πού αναφέρονται, μετρημένα ακριβώς με μικροσιφώνια ή μικροσύριγγα (τό ένζυμο) :

- α) 2,50ml τοῦ ρυθμιστικοῦ Tris-tris-HCl-KCl
- β) 0,10ml διαλύματος ὑποστρώματος (πυροσταφυλικό)
- γ) 0,30ml διαλύματος NADH
- δ) 0,01ml διαλύματος ἀναστολέα (όξαλικό-μυρμηκικό-HgCl<sub>2</sub>)
- ε) 0,02ml διαλύματος τοῦ ένζυμου

Συνολικός όγκος διαλύματος στή κυψελίδα είναι 2,93ml.

Κάθε μέτρηση απαιτεῖ χρόνο τουλάχιστο 3min από τή στιγμή μηδέν.

Ἄφοῦ προστεθοῦν στή κυψελίδα τοῦ σπεκτροφωτόμετρου όλα τὰ αντιδραστήρια - με τή σειρά πού αναφέρονται πιο πάνω - ἐκτός από τό ένζυμο, τοποθετεῖται ἡ κυψελίδα στό όργανο καί προστίθεται ἡ ποσότητα τοῦ ένζυμου. Ἀκολουθεῖ γρήγορη ἀνάδευση με ράβδο πλαστική από πολυαιθυλένιο καί μετρεῖται ἡ ἀπορρόφηση A τοῦ διαλύματος σέ μήκος κύματος  $\lambda = 340\text{nm}$ . Ἀκολουθεῖ δεύτερη μέτρηση μετά από ἕνα πρώτο λεπτό, τρίτη στό δεύτερο λεπτό καί τέταρτη στό τρίτο λεπτό, από τήν ἀρχή τῶν χρόνων.

Ὅρίζουμε σάν ταχύτητα τῆς ἀντίδρασης τό λόγο  $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  καί τοποθετεῖται σέ διάγραμμα  $\Delta A/\Delta t$  ὡς πρός [I] ὅπου [I] είναι ἡ συγκέντρωση τοῦ ἀναστολέα, πού χρησιμοποιεῖται.

Ὁ λόγος  $\Delta A/\Delta t$  είναι ἡ διαφορά τῶν μετρήσεων (πρώτης μεῖον δεύτερης, δεύτερης μεῖον τρίτης, τρίτης μεῖον τέταρτης), πού θά πρέπει νά είναι σταθερή. Ἐπειδή, πρακτικά, οἱ διαφορές αὐτές δέν ἦταν ἀκριβῶς [σε ἀκολουθήσα τή παρακάτω μέθοδο. Για κάθε σημείο τῶν καμπυλῶν, δηλαδή για κάθε μέτρηση, έγιναν τρεῖς μετρήσεις με τὰ ἴδια ἀντιδραστήρια καί ὁ λόγος  $\Delta A/\Delta t$  βγαίνει ὅπως τό παρακάτω παράδειγμα.



Μέτρηση νιοστή : ι)  $\Delta A_{0-1} = a_1$  ,  $\Delta A_{1-2} = a_2$  ,  $\Delta A_{2-3} = a_3$

ιι)  $\Delta A_{0-1} = a_1'$  ,  $\Delta A_{1-2} = a_2'$  ,  $\Delta A_{2-3} = a_3'$

ιιι)  $\Delta A_{0-1} = a_1''$  ,  $\Delta A_{1-2} = a_2''$  ,  $\Delta A_{2-3} = a_3''$

$$\overline{\Delta A}_{0-1} = \frac{a_1 + a_1' + a_1''}{3} ,$$

$$\overline{\Delta A}_{1-2} = \frac{a_2 + a_2' + a_2''}{3} ,$$

$$\overline{\Delta A}_{2-3} = \frac{a_3 + a_3' + a_3''}{3}$$

Μέ τό τρόπο αυτό έχουμε πρακτικά  $\overline{\Delta A}_{0-1} = \overline{\Delta A}_{1-2} = \overline{\Delta A}_{2-3}$  μέχρι καί τό δεύτερο δεκαδικό ψηφίο.

Ό λόγος  $\Delta A / \Delta t$  είναι, πρακτικά ίσος πρὸς  $\Delta A$  ἄφου  $\Delta t = 1 \text{ min.}$

Μέ ὄλο αυτό τό πρόλογο γιά τό τρόπο, πού έγιναν οἱ πειραματικές μετρήσεις καί οἱ διάφορες εἰδικές διεργασίες, δίνεται μιά γενική εἰκόνα τῆς ὅλης πειραματικῆς ἐργασίας.

Ἄναλυτικά τά πειράματα ἔχουν:

### Πείραμα πρῶτο

#### Ἄντιδραστήρια

Γαλακτική Ἄφυδρογονάση ( $H_4$ ) ἀπό καρδιά βοδιού (ὅπως πρὸ πάνω περιγράφεται)

Πυροσταφυλικοῦ Καλίου διάλυμα  $5,20 \times 10^{-4} \text{ M}$  ὕδατικό (ὅπως πρὸ πάνω περιγράφεται)

NADH ὕδατικό διάλυμα  $9,20 \times 10^{-5} \text{ M}$  (ὅπως πρὸ πάνω περιγράφεται)

Ἄξαλικοῦ ὀξεός διαλύματα ὕδατικά σέ συγκεντρώσεις διάφορες (ὅπως πρὸ πάνω περιγράφεται)

ρυθμιστικό Tris-tris-HCl-KCl pH = 8,02 (ὅπως πρὸ πάνω περιγράφεται)

θερμοκρασία  $23^{\circ} \text{C.}$



Σέ ὄλη τή διάρκεια τοῦ πειράματος, τά ἀντιδραστήρια εἶναι καλυμμένα ἀπό τό φῶς.

Οἱ μετρήσεις ἐγίναν μέ τή μεθοδολογία, πού περιγράφεται πρῶτο πάνω.

Τό παραπάνω πείραμα ἐπαναλήφθηκε μέ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση ἀπό μύες βοδιοῦ. Οἱ διάφορες μετρήσεις δέν διάφεραν μεταξύ τους σέ μεγάλο ποσοστό καί ἡ καμπύλη, πού παράγεται ἀπό τά πειραματικά σημεῖα μέ χρήση τοῦ ἔνζυμου, ἀπό μύες βοδιοῦ ( $M_4$ ) εἶναι οὐσιαστικά ἡ ἴδια μέ αὐτή, πού παράγεται μέ χρήση ἔνζυμου ἀπό καρδιά βοδιοῦ ( $H_4$ ).

Στό διάγραμμα (15) τά σημεῖα εἶναι τά πειραματικά ἀπό τή μέτρηση μέ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση ( $H_4$ ). Παράγεται ἡ καμπύλη (α) τοῦ διαγράμματος (15).

#### Πείραμα δεύτερο

Ἐκτελεῖται ὁμοία μέ τό πρῶτο. Στό δεύτερο πείραμα χρησιμοποιεῖται ὑδατικό διάλυμα πυροσταφυλικοῦ καλίου συγκέντρωσης  $2,60 \times 10^{-4} M$ .

Παράγεται ἡ καμπύλη (β) τοῦ διαγράμματος (15).

#### Πείραμα τρίτο

Ἐκτελεῖται ὁμοία μέ τό πρῶτο. Στό τρίτο πείραμα χρησιμοποιεῖται ὑδατικό διάλυμα πυροσταφυλικοῦ καλίου συγκέντρωσης  $1,73 \times 10^{-4} M$ .

Παράγεται ἡ καμπύλη (γ) τοῦ διαγράμματος (15).

#### Πείραμα τέταρτο

Ἐκτελεῖται ὁμοία μέ τό πρῶτο. Στό τέταρτο πείραμα χρησιμοποιεῖται ὑδατικό διάλυμα πυροσταφυλικοῦ καλίου συγκέντρωσης  $1,30 \times 10^{-4} M$ .

Παράγεται ἡ καμπύλη (δ) τοῦ διαγράμματος (15).



Πείραμα πέμπτοΆντιδραστήρια

Γαλακτική Άφυδρογονάση ( $H_4$ ) από καρδιά βοδίου (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Πυροσταφυλικού Καλίου διάλυμα ύδατικό  $5,20 \times 10^{-4} M$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

NADH ύδατικό διάλυμα  $9,20 \times 10^{-5}$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Μυρμηκικού όξεος διαλύματα ύδατικά σε συγκεντρώσεις διάφορες (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Ρυθμιστικό Tris-tris-HCl-KCl  $pH=8,55$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Θερμοκρασία  $23^{\circ}C$ .

Σέ όλη τή διάρκεια του πειράματος, τά αντιδραστήρια είναι καλυμμένα από τό φώς.

Οι μετρήσεις έγιναν μέ τή μεθοδολογία, πού περιγράφεται πιο πάνω.

Τό παραπάνω πείραμα έπαναλήφθηκε μέ Γαλακτική Άφυδρογονάση από μύες βοδίου. Οι διάφορες μετρήσεις δέν διέφεραν μεταξύ τους σέ μεγάλο ποσοστό και ή καμπύλη, πού παράγεται από τά πειραματικά σημεία μέ χρήση του ένζυμου, από μύες βοδίου ( $M_4$ ) είναι ούσιαστικά ή ίδια μέ αύτή, πού παράγεται μέ τή χρήση ένζυμου από καρδιά βοδίου ( $H_4$ ).

Στό διάγραμμα (16) τά σημεία είναι τά πειραματικά από τή μέτρηση μέ Γαλακτική Άφυδρογονάση ( $H_4$ ). Παράγεται ή καμπύλη (α) του διαγράμματος (16).

Πείραμα έκτο

Έκτελείται όμοια μέ τό πέμπτο. Στό έκτο πείραμα χρησιμοποιείται ύδατικό διάλυμα πυροσταφυλικού καλίου συγκέντρωσης  $2,60 \times 10^{-4} M$ .

Παράγεται ή καμπύλη (β) του διαγράμματος (16).

Πείραμα έβδομο

Έκτελείται όμοια μέ τό πέμπτο. Στό έβδομο πείραμα χρησιμοποιείται ύδατικό διάλυμα πυροσταφυλικού καλίου συγκέντρωσης  $1,73 \times 10^{-4} M$ .



Παράγεται η καμπύλη (γ) του διαγράμματος (16)

#### Πείραμα ογδοο

Εκτελείται ομοια με το πέμπτο. Στο ογδοο πείραμα χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα πυροσταφυλικού καλίου συγκέντρωσης  $1,30 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

Παράγεται η καμπύλη (δ) του διαγράμματος (16).

#### Πείραμα ένατο

##### Αντιδραστήρια

Γαλακτική Αφυδρογονάση ( $M_4$ ) από μύες βοδιού (συγκέντρωση του διαλύματος του ένζυμου  $0,15 \mu\text{mol/ml}$ )

Πυροσταφυλικού Καλίου υδατικό διάλυμα  $5,20 \times 10^{-4} \text{ M}$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

NADH υδατικό διάλυμα  $9,20 \times 10^{-5} \text{ M}$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Ρυθμιστικό Tris-tris-HCl-KCl  $\text{pH}=7,00$  (όπως πιο πάνω περιγράφεται)

Θερμοκρασία  $23^\circ\text{C}$ .

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, τα αντιδραστήρια είναι καλυμμένα από το φως.

Οι μετρήσεις δεν έγιναν με τη μεθοδολογία, πού αναφέρεται πιο πάνω, αλλά έγιναν απλές διότι έδιναν πάντα  $\Delta A_{0-1} \approx \Delta A_{1-2} \approx \Delta A_{2-3}$ .

Η μέτρηση με τη χρήση Γαλακτικής Αφυδρογονάσης ( $H_4$ ) από καρδιά βοδιού δεν έγινε. Η δράση του ( $H_4$ ) ένζυμου αναστέλλεται ταχύτατα με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη κάθε πειραματική μέτρηση.

Στο διάγραμμα (17) τα σημεία είναι πειραματικά από τη μέτρηση με Γαλακτική Αφυδρογονάση ( $M_4$ ). Παράγεται η καμπύλη (α) του διαγράμματος (17).

#### Πείραμα δέκατο

Εκτελείται ομοια με το ένατο. Στο δέκατο πείραμα χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα πυροσταφυλικού καλίου συγκέντρωσης  $2,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

Παράγεται η καμπύλη (β) του διαγράμματος (17).



ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟ ΟΞΑΛΙΚΟ

Συγκέντρωση όξελικού σε mol $\times 10^{-4}$	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (α)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (β)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (γ)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (δ)
0,00	0,1240	0,1270	0,1220	0,1200
0,25	0,1130	0,1130	0,1140	0,1070
0,50	0,1070	0,1080	0,1080	0,1050
1,00	0,1040	0,1040	0,1055	0,1030
1,25	0,1030	0,1020	0,1045	0,1025
1,50	0,1025	0,1015	0,1045	0,1025
1,75	0,1020	0,1015	0,1045	0,1025
2,00	0,1010	0,0995	0,1030	0,0995
2,25	0,0860	0,0995	0,0860	0,0770
2,50	0,0800	0,0860	0,0790	0,0740
2,75	0,0765	0,0825	0,0760	0,0720
3,00	0,0745	0,0780	0,0735	0,0700
3,50	0,0725	0,0750	0,0715	0,0690
4,00	0,0720	0,0740	0,0700	0,0690
4,50	0,0720	0,0740	0,0700	0,0690
5,00	0,0700	0,0720	0,0680	0,0650
5,20	0,0600	0,0585	0,0650	0,0550
5,40	0,0540	0,0530	0,0590	0,0480
5,60	0,0500	0,0480	0,0540	0,0440
5,80	0,0470	0,0450	0,0510	0,0400
6,00	0,0440	0,0430	0,0490	0,0385
6,50	0,0400	0,0390	0,0440	0,0355
7,00	0,0380	0,0360	0,0410	0,0340
7,50	0,0370	0,0340	0,0395	0,0330
8,00	0,0360	0,0335	0,0385	0,0325
8,50	0,0360	0,0330	0,0380	0,0325
9,00	0,0360	0,0325	0,0380	0,0325
9,50	0,0320	0,0290	0,0350	0,0290
9,60	0,0275	0,0230	—	—
9,80	—	—	0,0240	0,0190
10,00	0,0250	0,0170	0,0210	0,0140
10,50	0,0170	0,0130	0,0165	0,0100
11,00	0,0140	0,0100	0,0100	0,0070
12,00	0,0110	0,0070	0,0070	0,0035
13,00	0,0090	0,0050	0,0050	0,0025
14,00	0,0070	0,0040	0,0040	0,0020
15,00	0,0070	0,0030	0,0030	0,0020
20,00	0,0060	0,0025	0,0025	0,0020
21,00	0,0060	0,0025	0,0025	0,0020
22,00	0,0060	0,0025	0,0025	0,0020

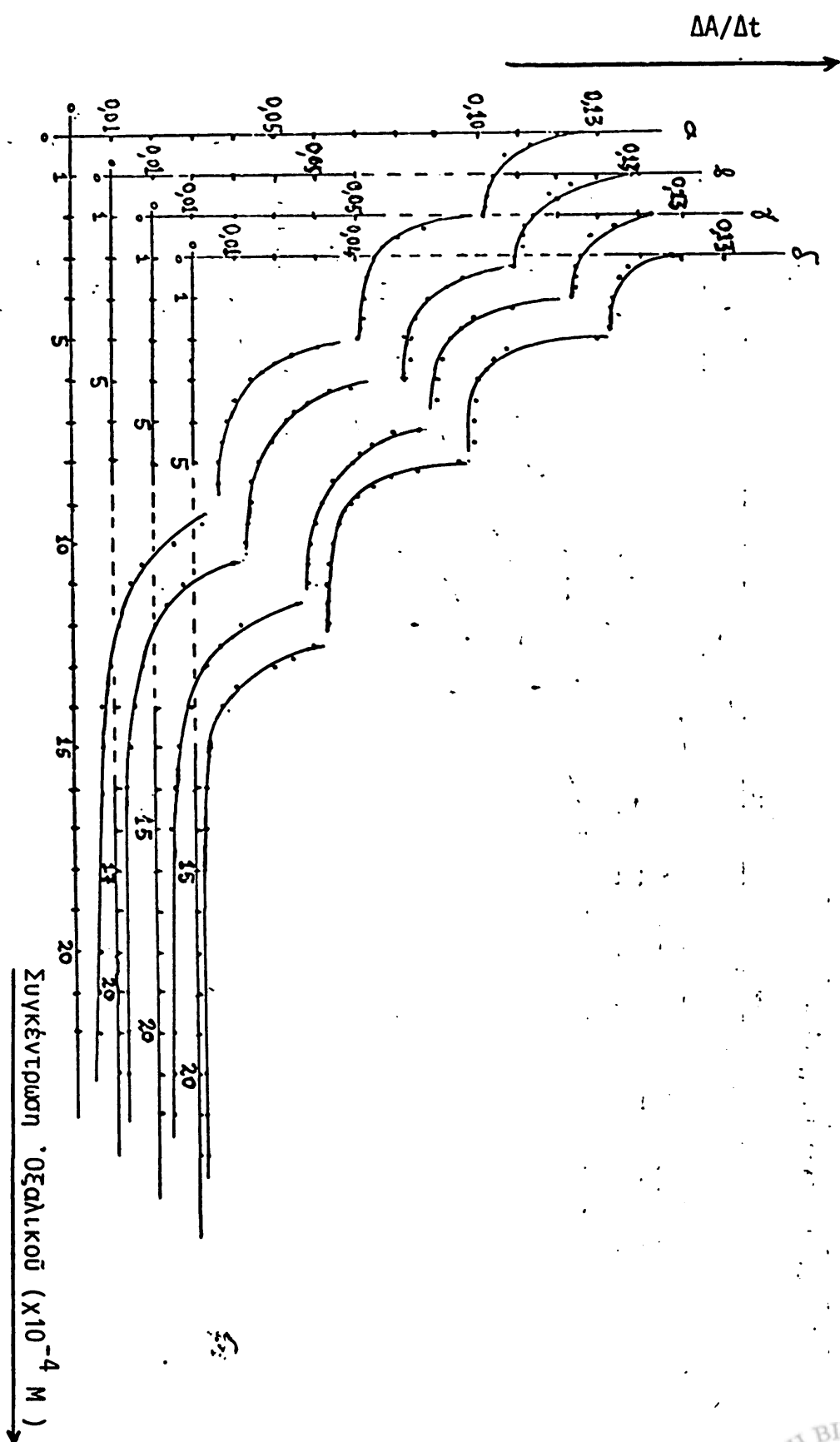


ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟ ΜΥΡΜΗΚΙΚΟ

Συγκέντρωση μυρμηκικού σε $\text{mol} \times 10^{-4}$	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (α)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (β)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (γ)	$\Delta A/\Delta t$ χρόνος 1 min καμπύλη (δ)
0,00	0,1140	0,1170	0,1190	0,1230
0,25	0,1030	0,1070	0,1110	0,1160
0,50	0,1010	0,1035	0,1065	0,1100
0,75	0,1000	0,1020	0,1045	0,1015
1,00	0,0995	0,1015	0,1035	0,1055
1,25	0,0995	0,1015	0,1030	0,1050
1,50	0,0995	0,1015	0,1030	0,1050
1,75	0,0995	0,1015	0,1030	0,1050
2,00	0,0995	0,1000	0,1030	0,1050
2,25	0,0985	0,0900	0,1010	0,1025
2,50	0,0770	0,0810	0,0875	0,0935
2,75	0,0735	0,0770	0,0820	0,0860
3,00	0,0715	0,0745	0,0780	0,0810
3,50	0,0695	0,0725	0,0750	0,0780
4,00	0,0690	0,0715	0,0735	0,0770
4,50	0,0685	0,0715	0,0730	0,0770
5,00	0,0685	0,0715	0,0730	0,0770
5,20	0,0685	0,0715	0,0730	0,0770
5,40	0,0660	0,0680	0,0715	0,0750
5,60	0,0520	0,0470	0,0590	0,0685
5,80	0,0450	0,0410	0,0490	0,0565
6,00	0,0400	0,0380	0,0440	0,0505
6,50	0,0335	0,0355	0,0385	0,0420
7,00	0,0315	0,0340	0,0360	0,0390
7,50	0,0300	0,0335	0,0345	0,0375
8,00	0,0295	0,0330	0,0340	0,0365
8,50	0,0295	0,0325	0,0340	0,0360
9,00	0,0295	0,0320	0,0335	0,0355
9,50	0,0270	0,0300	0,0320	0,0340
9,80	0,0150	0,0185	0,0220	0,0260
10,00	0,0120	0,0150	0,0195	0,0225
10,50	0,0080	0,0110	0,0145	0,0175
11,00	0,0055	0,0080	0,0110	0,0140
12,00	0,0025	0,0050	0,0070	0,0095
13,00	0,0020	0,0045	0,0055	0,0075
14,00	0,0015	0,0045	0,0050	0,0075
15,00	0,0015	0,0040	0,0050	0,0070
20,00	0,0010	0,0040	0,0045	0,0070
21,00	0,0010	0,0040	0,0045	0,0070
22,00	0,0010	0,0040	0,0045	0,0070



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ (15)

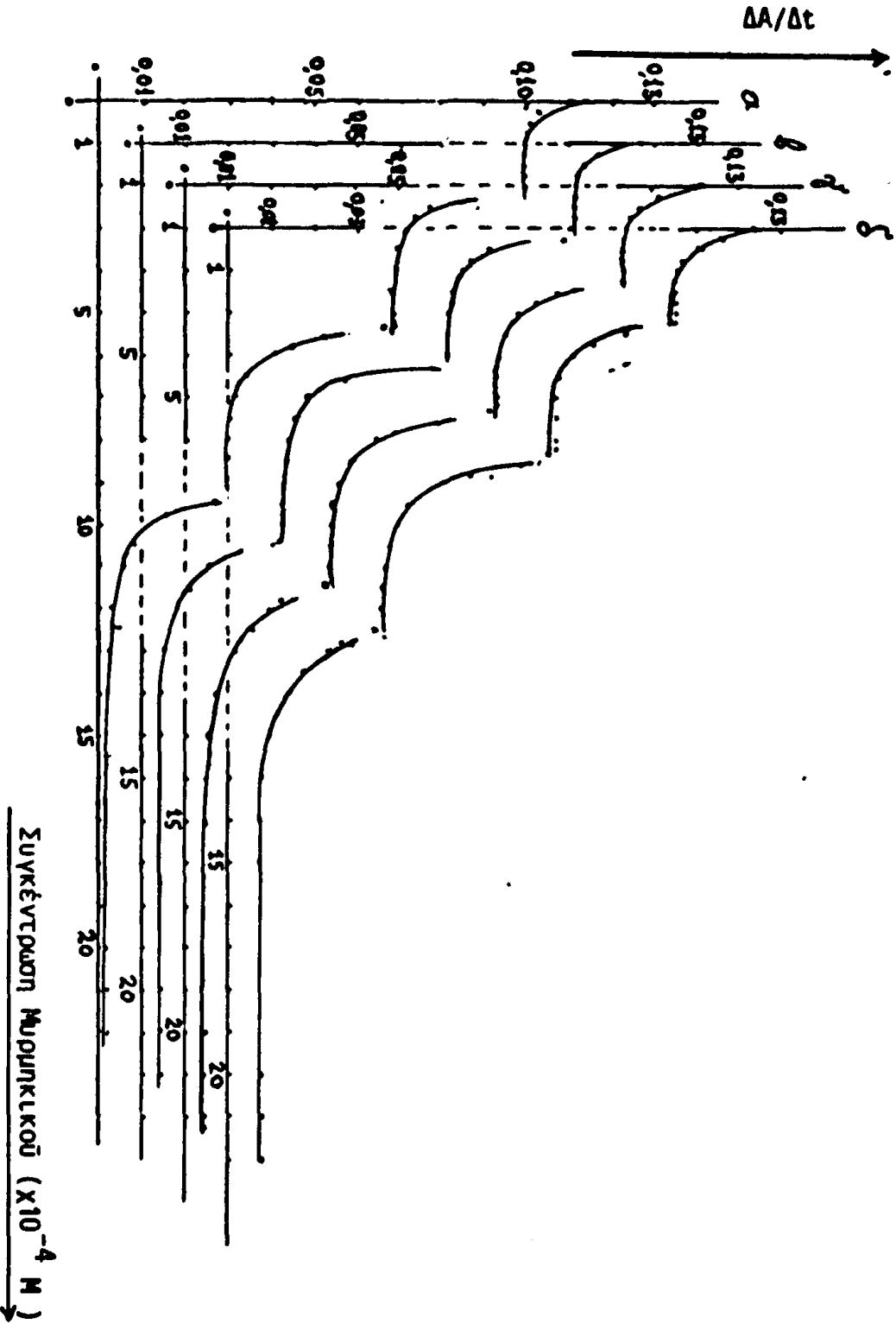


ΟΙ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΕΙΝΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ : ΠΡΩΤΟ(α) , ΔΕΥΤΕΡΟ(β) , ΤΡΙΤΟ(γ) , ΤΕΤΑΡΤΟ(δ) .  
ΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.



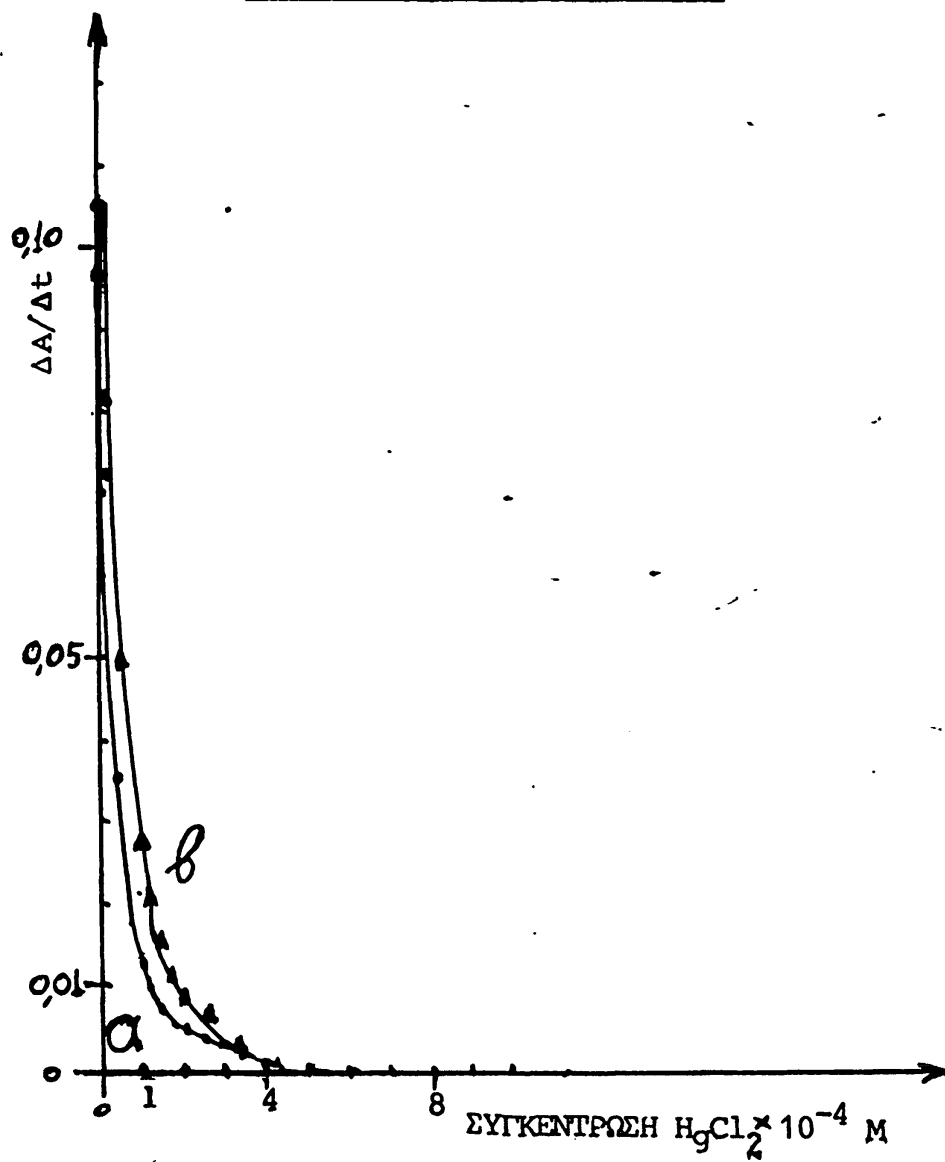


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ (16)



ΟΙ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ : ΠΕΜΠΤΟ(α), ΕΚΤΟ(β), ΕΒΔΟΜΟ(γ), ΟΓΔΩΟ(δ).  
 ΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΛΑΝΘ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α ( 1 7 )

Γραφική απεικόνιση τών πειραμάτων "ένατο" καί "δέκατο" .



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ἡ γενική ἰδέα αὐτῆς τῆς διατριβῆς βασίστηκε στά πειραματικά ἀποτελέσματα μιᾶς παλιότερης μελέτης τῶν ἀπτοσφαιρινῶν τοῦ πλάσματος<sup>41</sup> σέ συνδυασμό μέ μία πιό προσεκτική ἐπανεξέταση καί ἀνάλυση. τῶν πειραματικῶν δεδομένων διαφόρων κινητικῶν μελετῶν ἀλλοστερικῶν ἐνζύμων, πού ἔχουν δημοσιευθεῖ ἀπό διάφορες ἐρευνητικές ὁμάδες.

Πιό συγκεκριμένα, εἶχε παλιότερα παρατηρηθεῖ<sup>41</sup> ὅτι ἡ ἀναστολή τῆς δράσης ὠρισμένων τύπων ἀπτοσφαιρινῶν ἀπό αὐξανόμενες συγκεντρώσεις θειϊκοῦ ἀμμωνίου ἀποδίδεται ἀπό καμπύλες παρόμοιας μορφῆς μέ αὐτές τῶν διαγραμμάτων 15 καί 16. Τήν ἰδιότητα αὐτή ἔχουν -σέ διάφορο βαθμό- οἱ ἀπτοσφαιρίνες τῶν τύπων 2-2 καί 2-1, πού συνίστανται ἀπό διάφορα προΐοντα πολυμερισμοῦ τῆς ἀπτοσφαιρίνης τύπου 1-1 καί ἐπομένως, ἡ συμπεριφορά τους αὐτή θά μποροῦσε νά θεωρηθεῖ ἀποτέλεσμα ἀλλοστερικῶν ἀλληλεπιδράσεων.

Ἡ ἰδέα αὐτή ἐνισχύθηκε μετὰ ἀπό προσεκτική ἀνάλυση τῶν πειραματικῶν δεδομένων τῆς βιβλιογραφικῆς παραπομπῆς (33), πού ἀναφέρθηκε στά προηγούμενα κεφάλαια. Διαπραγματεύεται τή κινητική συμπεριφορά τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης ( $H_4$ ), ἀπό καρδιά βοδιοῦ, ὅταν ἡ δράση τοῦ ἐνζύμου ἀναστέλλεται ἀπό ΟΞΑΛΙΚΟ καί ἀπό ΟΞΑΜΙΚΟ (χρησιμοποιοῦνται τὰ ἀνιόντα τῶν ὀξέων - ἄλατα).

Ἐξετάστηκαν μέ μεγαλύτερη προσοχή τὰ διαγράμματα (8) καί (9) τῆς εἰσαγωγῆς.

Ἐπειδή τὰ σημεῖα τῶν διαγραμμάτων, πού ἀναφέρονται πιό πάνω, εἶναι πειραματικά ἐφαρμόστηκε μία τακτική, ἔτσι ὥστε νά ἔχουμε τίς πειραματικές τιμές τους σέ πίνακα. Καί μέ βάση τό διάγραμμα ( $9_A-9_B$ ) (V), (R), (P), (I) καταρτίστηκε ὁ Πίνακας VIII, ὅπου μέ σαφήνεια ἔχουμε τίς ἀντιστοιχίες τῶν μεταβλητῶν. Μέ βάση τόν Πίνακα VIII φιάχτηκαν καμπύλες (v) πρός (I), ὅπου (I) ἡ συγκέντρωση τοῦ ἀναστολέα (ἐδῶ τό ΟΞΑΛΙΚΟ).

Τά διαγράμματα (18) καί (19) εἶναι οἱ καμπύλες (v) πρός (I) μέ τίς τιμές τῶν σημείων τους, ὅπως ἀπορρέουν ἀπό τόν Πίνακα VIII



Ακολουθώντας τή παραγωγή έξιωώσεων κατά Lineweaver-Burk (καί τήν έξιωση 7 όπως θά δοϋμε νά μετασχηματίζεται παρακάτω) τά σημεία πού έχουν παραχθει θά πρέπει νά ένώνονται μέ ύπερβολές -όπως δείχνουν οι πλήρεις γραμμές.

Άς έξετάσουμε τί παρατηρήσεις μπορούμε νά κάνουμε στά διαγράμματα (18) και (19).

α) Οι ύπερβολές δέν συμπεριλαμβάνουν όλα τά σημεία στις δέκα από τις δώδεκα καμπύλες και μάλιστα φαίνεται καθαρά ότι δέν μπορεί καμιά ύπερβολική γραμμή νά τά συμπεριλάβει.

β) Όπως έχουν σχεδιαστεί οι καμπύλες φαίνεται ότι οι αποκλίσεις από τις ύπερβολές έπαναλαμβάνονται για τήν ίδια "όμάδα" σημείων (πού βρίσκονται τό ένα κάτω από τό άλλο).

Οι δύο πιο πάνω παρατηρήσεις μπορούν νά διατυπωθούν απ' εύθείας στά διαγράμματα (9Α-9Β) τών  $1/v$  πρός  $1/R$  και  $1/v$  πρός  $1/P$  όπου τά πειραματικά σημεία δέν βρίσκονται πάνω στις εύθειες ούτε μπορούν νά ένωθούν μέ κάποια εύθεία γραμμή και οι αποκλίσεις από τις εύθειες έπαναλαμβάνονται για τήν ίδια "όμάδα" σημείων.

Στά διαγράμματα (18) και (19) οι πιο πάνω παρατηρήσεις οδηγούν στη σκέψη ότι κάποια άλλη, ίσως, γραμμή θά πρέπει νά γίνει για νά συνδέονται μεταξύ τους τά πειραματικά σημεία. Καί ακόμη απλή παρατήρηση τών διαγραμμάτων (8 Α, Β, Γ, Δ,) και (9 Α, Β, Γ, Δ,) δείχνει πώς παρόμοια διεργασία θά μάς οδηγοϋσε στις ίδιες σκέψεις.

Η γραμμή όμως πού ταιριάζει στη περίπτωση αυτή είναι όπωσδήποτε ή ύπερβολή αφού μέ ύπερβολή παρίστανται γραφικά τέτοιες έξιώσεις όπως ή κατά Lineweaver-Burk έκφραση και οι έκφράσεις, πού παράγονται μέ βάση τά "συνεργατικά φαινόμενα" σέ όλιγομερείς πρωτεΐνες (πράγμα πού θά δοϋμε παρακάτω).

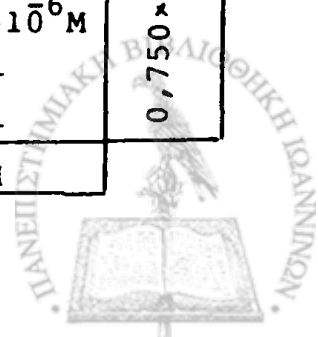
Αφού λοιπόν θά πρέπει νά είναι όπωσδήποτε ύπερβολή αυτή ή γραμμή, πού συζητάμε, και μία μόνο ύπερβολή δέν μπορεί νά μάς ικανοποιήσει είναι λογικό νά σκεπτόμαστε ότι χρειάζονται περισσότερες από μία ύπερβολές νά συνδεθούν μεταξύ τους τά πειραματικά σημεία τών διαγραμμάτων (18) και (19). Καί φυσικά



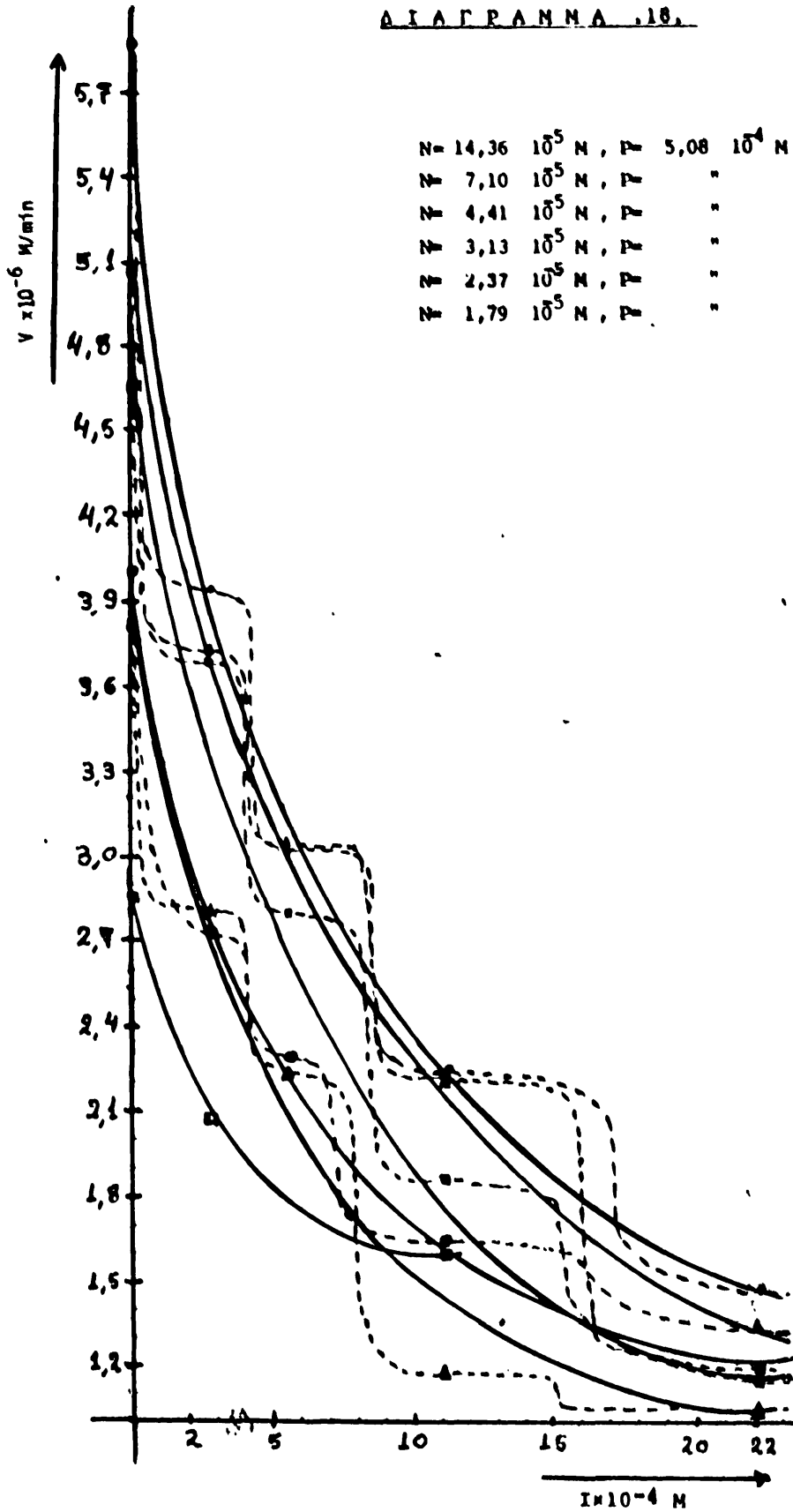
Π Ι Ν Α Κ Α Σ VIII

ΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ 18 ΚΑΙ 19 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ  
ΛΗΦΘΕΙ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ 9Α ΚΑΙ 9Β

N	I όταν N=C	V όταν N=C	I όταν P=C	V όταν P=C	P
$14,360 \times 10^5 M$	0 $1,880 \times 10^4 M$ $3,750 \times 10^4 M$ $7,500 \times 10^4 M$ $15,00 \times 10^4 M$	$3,740 \times 10^6 M$ $2,805 \times 10^6 M$ $2,360 \times 10^6 M$ $1,794 \times 10^6 M$ $1,293 \times 10^6 M$	0 $2,780 \times 10^4 M$ $5,560 \times 10^4 M$ $11,10 \times 10^4 M$ $22,20 \times 10^4 M$	$5,880 \times 10^6 M$ $3,940 \times 10^6 M$ $3,020 \times 10^6 M$ $2,240 \times 10^6 M$ $1,475 \times 10^6 M$	$5,740 \times 10^4 M$
$7,100 \times 10^5 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$3,000 \times 10^6 M$ $2,035 \times 10^6 M$ $1,795 \times 10^6 M$ $1,545 \times 10^6 M$ $1,095 \times 10^6 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$5,080 \times 10^6 M$ $3,730 \times 10^6 M$ $3,030 \times 10^6 M$ $2,235 \times 10^6 M$ $1,304 \times 10^6 M$	$2,970 \times 10^4 M$
$4,410 \times 10^5 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$1,952 \times 10^6 M$ $1,600 \times 10^6 M$ $1,475 \times 10^6 M$ $1,170 \times 10^6 M$ $0,878 \times 10^6 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$4,660 \times 10^6 M$ $3,690 \times 10^6 M$ $2,800 \times 10^6 M$ $1,865 \times 10^6 M$ $1,165 \times 10^6 M$	$1,830 \times 10^4 M$
$3,190 \times 10^5 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$1,615 \times 10^6 M$ $1,282 \times 10^6 M$ $1,155 \times 10^6 M$ $0,878 \times 10^6 M$ $0,773 \times 10^6 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$4,000 \times 10^6 M$ $2,730 \times 10^6 M$ $2,290 \times 10^6 M$ $1,647 \times 10^6 M$ $1,190 \times 10^6 M$	$1,340 \times 10^4 M$
$2,370 \times 10^5 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$1,358 \times 10^6 M$ $1,094 \times 10^6 M$ $0,935 \times 10^6 M$ $0,801 \times 10^6 M$ $0,680 \times 10^6 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$3,830 \times 10^6 M$ $2,800 \times 10^6 M$ $2,240 \times 10^6 M$ $1,765 \times 10^6 M$ $1,057 \times 10^6 M$	$1,008 \times 10^4 M$
$1,790 \times 10^5 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$1,170 \times 10^6 M$ $0,801 \times 10^6 M$ $0,774 \times 10^6 M$ $0,636 \times 10^6 M$ $0,527 \times 10^6 M$	ΤΟ ΙΔΙΟ	$2,850 \times 10^6 M$ $2,073 \times 10^6 M$ $1,618 \times 10^6 M$ — —	$0,750 \times 10^4 M$
		$P = 6,080 \times 10^4 M$		$N = 9,200 \times 10^5 M$	



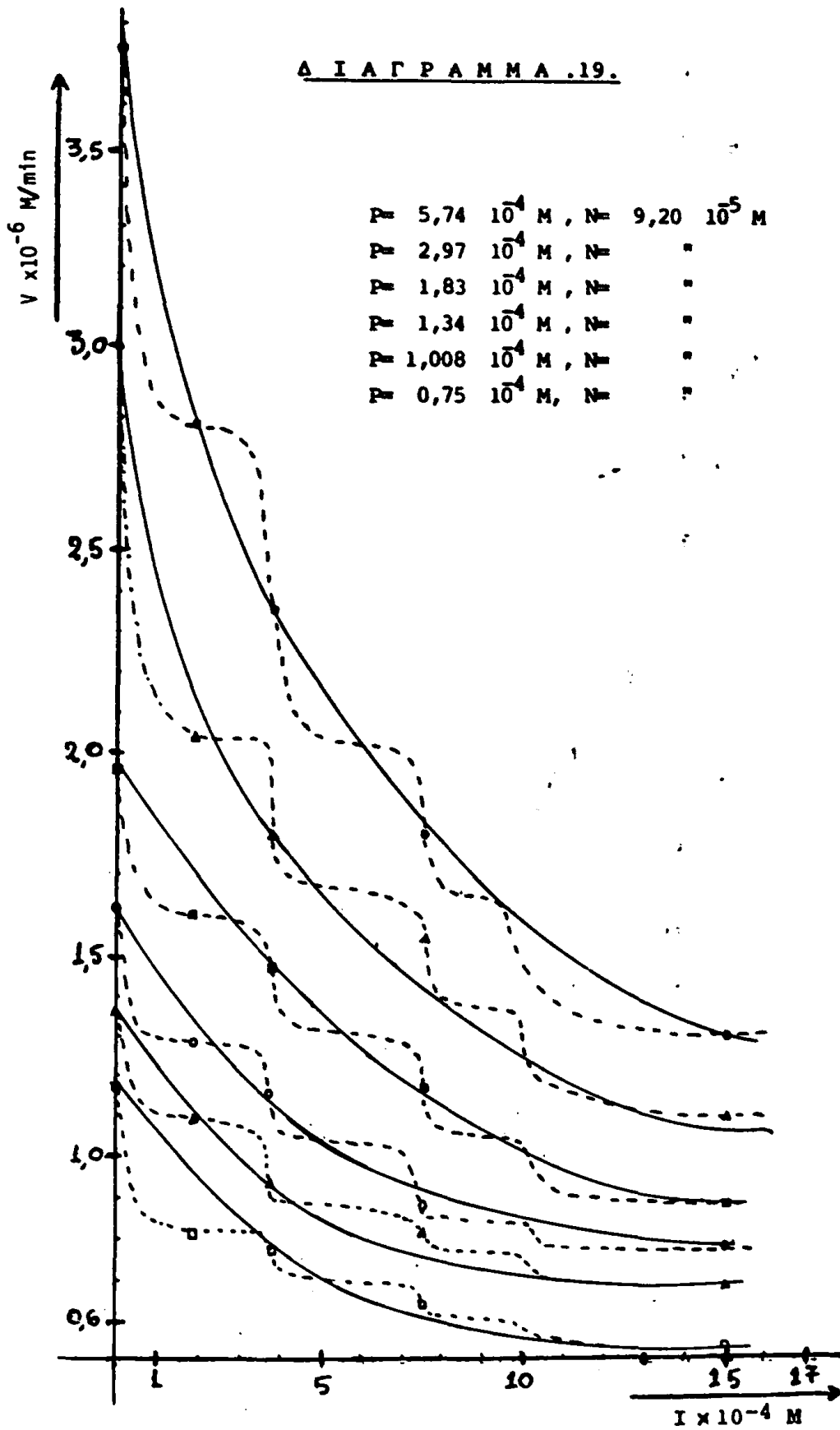
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10.



ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΕΙΝΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΡΒΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 9A



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ .19.



ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΕΙΝΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ  
ΓΗΜΕΙΩΝ ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 9B



κάτι τέτοιο μπορεί να έχει μια ευρύτερη εφαρμογή σε άλλες ανάλογες διεργασίες.

Η εξίσωση (5), όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (33), περιγράφει το διάγραμμα (9) ή και τα διαγράμματα (18) (19) μετά τη μετατροπή που έγινε με βάση το πίνακα VIII. Ας δοϋμε όμως πώς μπορεί να απλοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να γίνει πιο προσιτή ή διερεύνηση της γραφικής της απεικόνισης.

Θά χρησιμοποιήσουμε για αυτό τα πειραματικά και θεωρητικά δεδομένα του διαγράμματος (9), όπως παρουσιάζονται στο πίνακα V. Δηλαδή ότι ισχύει  $(K_2 + K_4)/K_4 = 4,6$  και ότι μπορούμε να αντικαταστήσουμε τη συγκέντρωση του αναστολέα I με  $\alpha \cdot K_I$  όπου  $\alpha$  μια αριθμητική σταθερά (φαίνεται εύκολα από το διάγραμμα (9) και το πίνακα VIII) ή  $I = \beta \cdot K_I'$  και  $I = \gamma \cdot K_I''$  όπου  $\beta$  και  $\gamma$  ανάλογα με το  $\alpha$ .

Με βάση λοιπόν τα άμεσα παραπάνω ή εξίσωση (5) γίνεται:

$$(18) \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + (1 + \gamma) \cdot \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R \cdot P} \right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) + \frac{\alpha^2 \times K_I}{4,6 \times I}}$$

Η μορφή αυτή είναι μια ομογραφική συνάρτηση με μεταβλητές τις ποσότητες  $v$  και  $I$  και λύνεται άπλά.

Βρίσκουμε τη τιμή του  $I$  που μηδενίζει το παρονομαστή και είναι ή:

$$I_{op} = - \frac{\alpha^2 \times K_I}{4,6 \left[ 1 + (1 + \gamma) \cdot \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R \cdot P} \right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) \right]}$$

και για αυτή τη τιμή ή  $v$  τείνει στο άπειρο. Αν λύσουμε τη (18) ως προς  $I$  έχουμε:

$$I = \frac{\alpha^2 \times v \times K_I}{4,6 \left[ v_{\max} - v \left[ 1 + (1 + \gamma) \cdot \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R \cdot P} \right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) \right] \right]}$$





Βρίσκουμε τή τιμή του  $v$ , πού μηδενίζει τό παρονομαστή και είναι ή :

$$v_{op} = \frac{v_{max}}{1 + (1 + \gamma) \cdot \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R \cdot P} \right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta)}$$

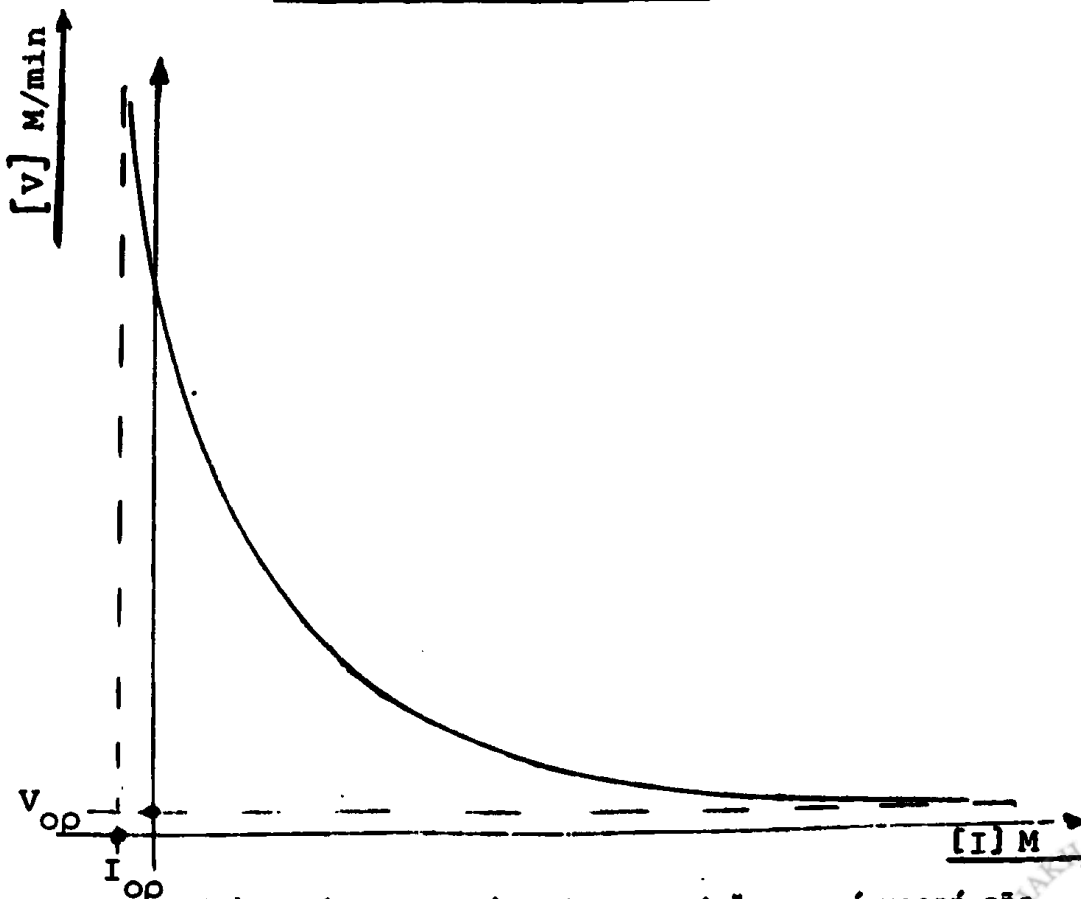
και γι'αυτή τή τιμή ή  $I$  τείνει στό άπειρο.

Οι τιμές  $v_{op}$  και  $I_{op}$  δείχνουν τή θέση των πόλων της ομογραφικής συνάρτησης.

(ή έπεξεργασία των παραπάνω στό παράρτ.1).

Αν μεταφέρουμε τά παραπάνω σέ διάγραμμα  $v$  πρός  $I$  έχουμε φιάξει τή γραφική άπεικόνιση της έξίσωσης (5-18). Τό διάγραμμα (20) είναι ή γραφική άπεικόνιση της (5) όπως τήν έχουμε μετασχηματίσει στή μορφή της (18), γιά θετικές τιμές των  $v$  και  $I$ .

Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (20)



Γραφική άπεικόνιση των έξισώσεων, πού έχουν τή μορφή της έξίσωσης (5).



Τέτοια μορφή περιμέναμε νά είχαν καί οι καμπύλες, πού προκύψαν από τό πίνακα VIII καί παρίστανται μέ πλήρεις γραμμές στά διαγράμματα (18) καί (19).

Σέ υπερβολικῆς μορφῆς καμπύλη ἀπεικονίζεται γραφικά καί ἡ ἐξίσωση Michaelis-Menten:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{X}}$$

καί ἡ ἐξίσωση, πού ἔχει προταθεῖ ἀπό τόν Hill καί ἔχει ἐφαρμογή σέ ἀπλές ἢ σέ ὀλιγομερεῖς πρωτεΐνες. Μέ  $n$  συμβολίζεται ὁ ἀριθμός τῶν ὑπομονάδων τοῦ ὀλιγομεροῦς.

Ἡ ἐξίσωση Hill εἶναι ἡ:

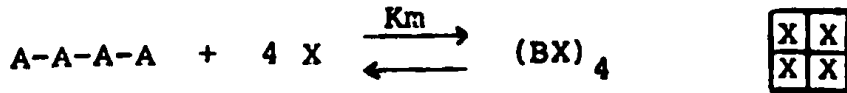
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{(K_m)^n}{(X)^n}}$$

Οἱ πῖό πάνω ἐξισώσεις τῶν Michaelis-Menten καί Hill ἐφαρμόζονται σέ περιπτώσεις ὅπου δέν ὑπάρχει δράση ἀναστολέα στό ἐνζυμικό σύστημα.

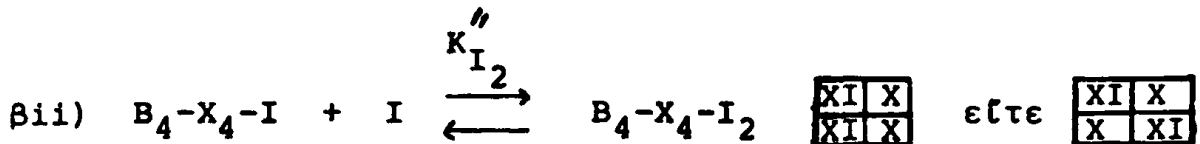
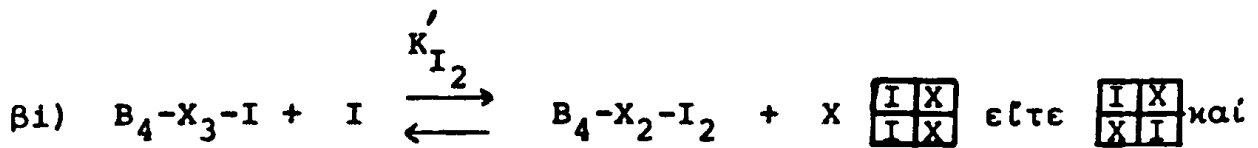
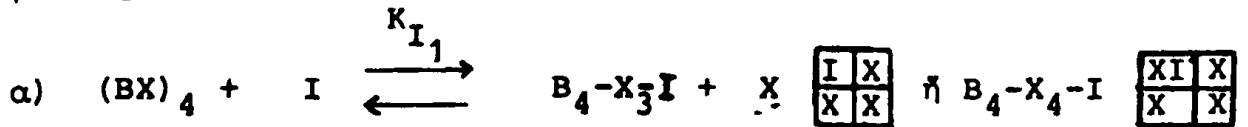
Ἄς ξαναθυμηθοῦμε τή (β) συνθήκη τοῦ ἀλλοστερικοῦ πρότυπου τῶν Koshland, Nemethy, Filmer πού λέει ὅτι "μιά ἀλλαγὴ στή διαμόρφωση μιᾶς ὑπομονάδας μπορεῖ νά ἀλλάξει τή σχετική σταθερότητα τῶν διαμορφώσεων τῶν γειτονικῶν ὑπομονάδων μέσα ἀπό ἐνδοῦπομοναδικές ἀλληλοεπιδράσεις" καί μέ γνώμονα αὐτή νά δοῦμε σέ τί συμπέρασμα εἶναι λογικό νά καταλήξουμε γιά τή μορφή, πού τελικά θά πρέπει νά ἔχουν οἱ καμπύλες τῶν διαγραμμάτων (18), (19), πού συζητᾶμε, ὥστε οἱ γραμμές νά συμπεριλαμβάνουν ὅλα τὰ σημεῖα.



Υποθέτουμε ότι έχουμε ένα τετραμερές E (ας υποθέσουμε πώς έχει διάταξη τετραγωνική) και πρώτο υποκαταστάτη X (τό υπόστρωμα). Ακόμη υποθέτουμε ότι ισχύει η :



Δεύτερος υποκαταστάτης I (ο αναστολέας) συνδέεται σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις:



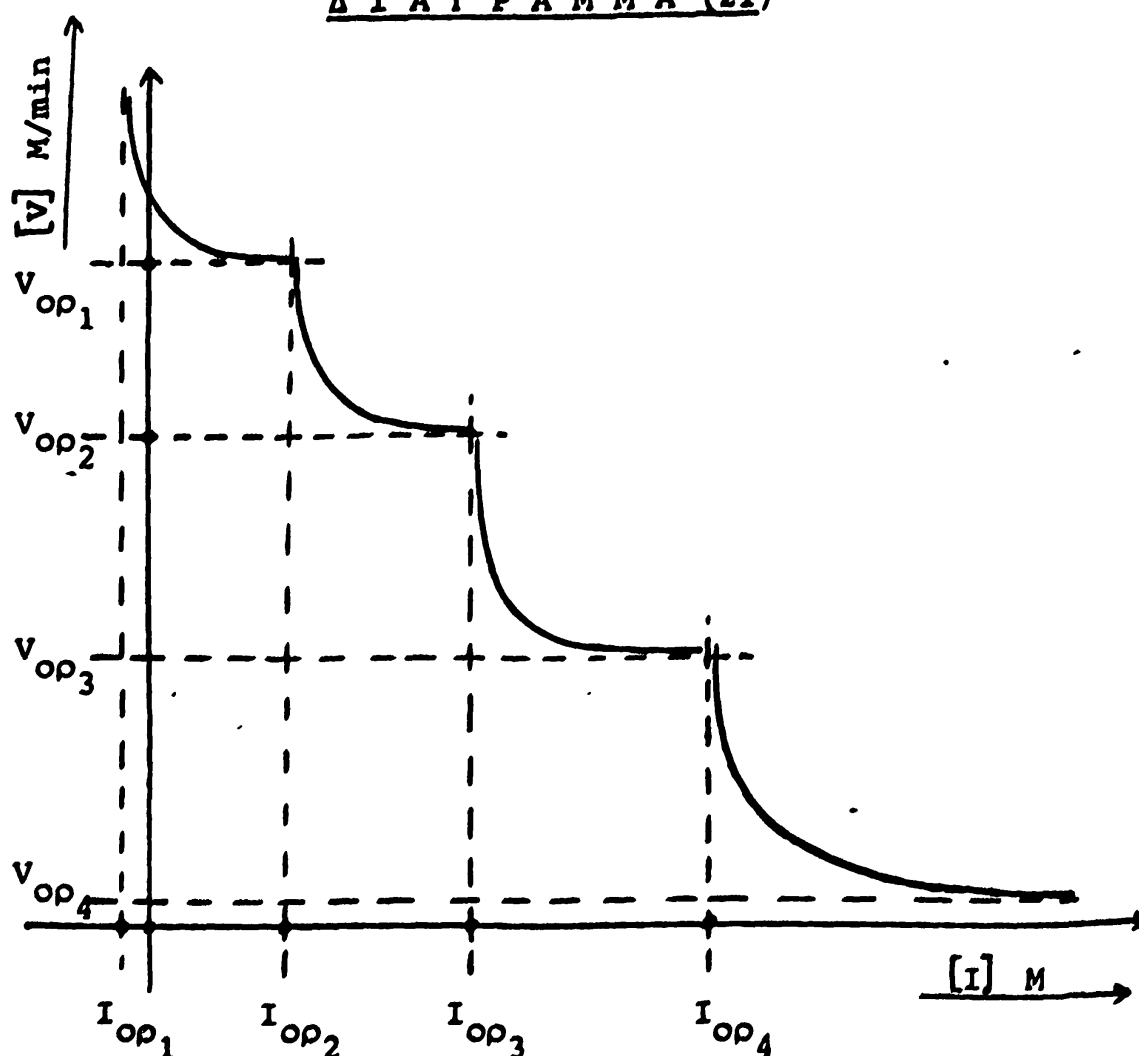
τά (γ) και (δ) μοια με τις αντίστοιχες  $K_{I_3}$  και  $K_{I_4}$

Εφαρμόζοντας στα πιο πάνω τη (β) συνθήκη του αλλοστερικού πρότυπου των Koshland, Nemethy, Filmer, σκεπτόμαστε ότι είναι δυνατό σε κάθε στάδιο από (α) ως (δ) να αλλάζουν οι σχετικές σταθερότητες των γειτονικών υπομονάδων-στη σελίδες 48, 49 και 50 εξηγείται και περιγράφεται με σαφήνεια τό σχετικό θέμα-και κατά συνέπεια οι διάφορες  $K_I$  (από  $K_{I_1}$  ως  $K_{I_4}$ ) να είναι διάφορες μεταξύ τους, από στάδιο σε στάδιο.

Με αυτές τις σκέψεις ή εξίσωση (5 ή 18) δέν θά έπρεπε να είναι μία αλλά τέσσερεις, όσες δηλαδή είναι οι διάφορες  $K_I$ ,  $K'_I$ ,  $K''_I$ . Επομένως τέσσερεις υπερβολές θά πρέπει να γίνουν ώστε τά σημεία των πειραμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για τά διαγράμματα (8), (9), (18), (19), να βρίσκονται πάνω στις αντίστοιχες γραμμές.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πώς κάθε εξίσωση της μορφής της εξίσωσης (5 ή 18) δέν θά έπρεπε να είχε τη μορφή της υπερβολής αλλά αυτή του διαγράμματος (21).



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (21)

Ἡ γραφικὴ ἀπεικόνιση, πού πρέπει νά ἔχουν οἱ ἐξισώσεις τῆς μορφῆς 5 ἢ 18 .

Μέ τίς σκέψεις αὐτές καί μέ τίς παρατηρήσεις, πού διατυπώθηκαν πῶς πάνω ὁδηγηθήκαμε ἔτσι ὥστε νά ἀπεικονίσουμε γραφικά, μέ διακεκομμένες γραμμές, τὰ διαγράμματα (18) καί (19) .

Τά πειραματικά δεδομένα τῆς ἐργασίας αὐτῆς βασίστηκαν σ'αὐτές τίς παρατηρήσεις καί γι'αὐτό τό λόγο οἱ πειραματικές συνθήκες τῶν μετρήσεων μας εἶναι ὁμοιες μέ αὐτές τῶν διαγραμμάτων (8,9,18,19) .



Τά αποτελέσματα τών πειραμάτων μας δικαίωσαν έντελώς τίσ παραπάνω σκέψεις και ύποθέσεις. Δέν έγινε - στά διάφορα πειράματα - παρά επανάληψη τών πειραμάτων τής βιβλιογραφικής παραπομπής (33), τών διαγραμμάτων (9A-9B), μέ τή μέγιστη δυνατή πυκνότητα σημείων και μάλιστα μέ τή χρήση και τής ( $H_4$ ) από καρδιά βοδιού και τής ( $M_4$ ) από μύες βοδιού Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης.

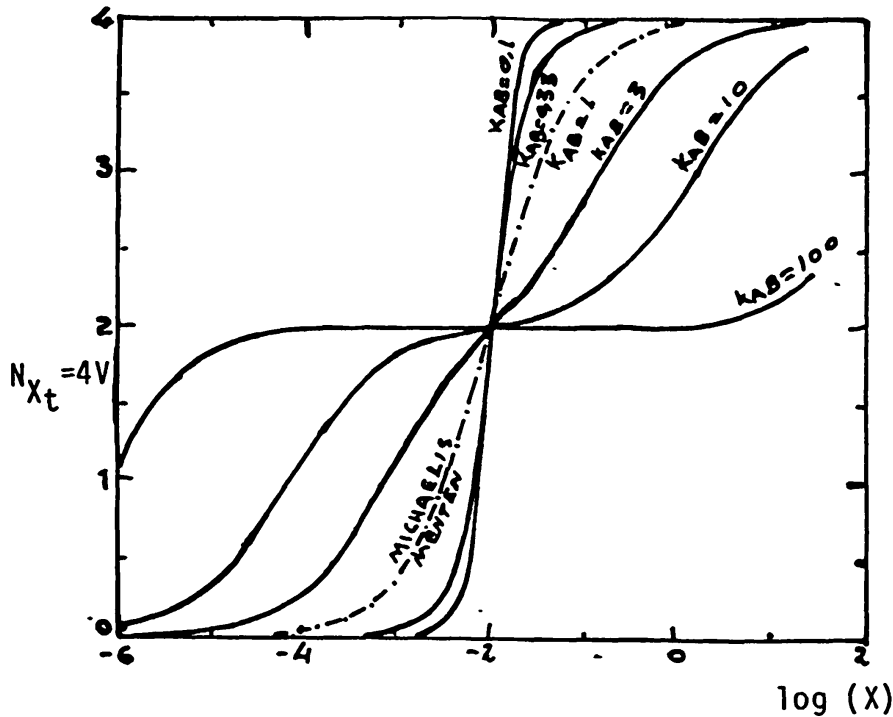
Οί απόψεις αυτές, πού πριν λίγο διατυπώθηκαν, για τή πραγματική μορφή τών καμπυλών κορεσμού όταν τό ένζυμο Γαλακτική 'Αφυδρογονάση αναστέλλεται στή δράση του από μη ειδικούς αναστολείς, επαληθεύονται και από τήν έπεξεργασία τών θεωρητικών προτάσεων, πού έχουν διατυπωθεί για τίσ "συνεργατικές επίδράσεις" μέ τήν ανάπτυξη τους μέ βάση τό άλλωστερικό πρότυπο τών Koshland, Nemethy, Filmer.

"Ας αρχίσουμε από τή περίπτωση, όπου μόρια ύποκαταστάτη X εισέρχονται σέ ύπομονάδες ενός τετραμερούς μέ "τετραγωνική διάταξη", χωρίς τήν είσοδο δεύτερου ύποκαταστάτη. Για τή περίπτωση αυτή έχει παραχθεί ή έξείσωση (15).

Στά διαγράμματα (22) και (23) φαίνεται ή μεταβολή τής  $K_{AB}$  όταν  $K_{BB}$  και  $(K_X) \cdot (K_t)$  είναι σταθερές (διάγραμμα 22) και  $K_{AB}$ ,  $K_{BB}$  όταν  $(K_X) \cdot (K_t)$  σταθερό (διάγραμμα 23).



## Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α (22)

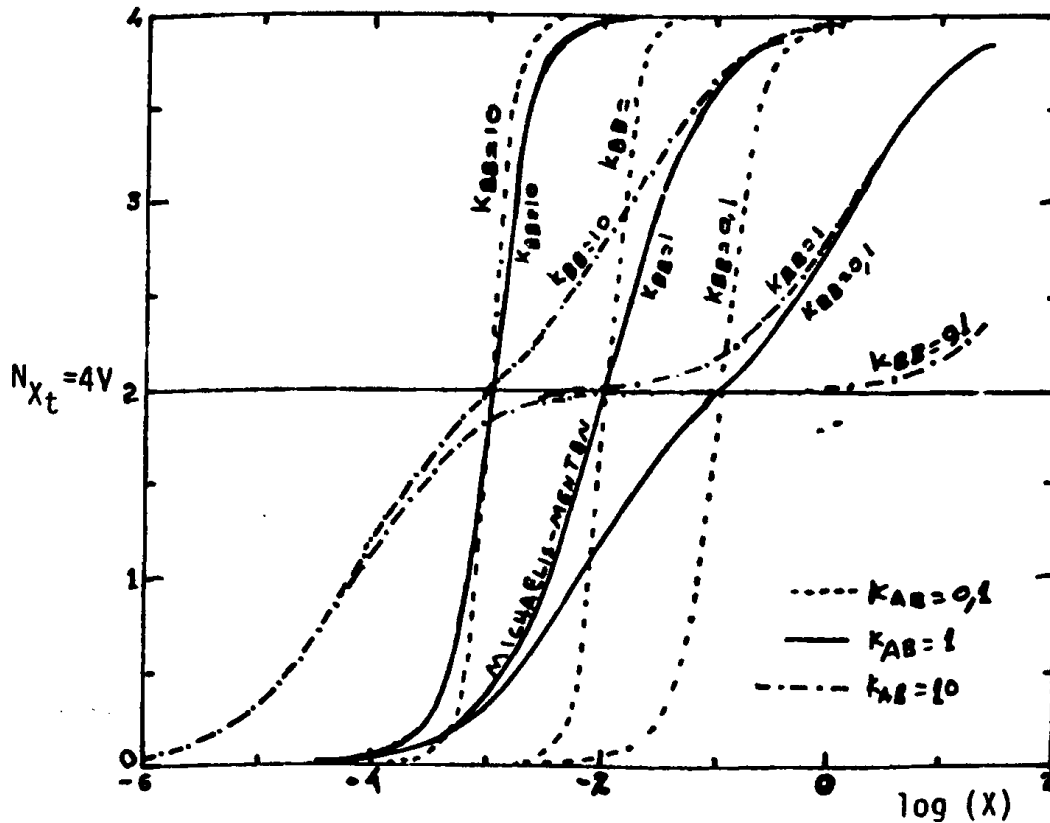


Παραδείγματα καμπυλών κορεσμού για "τετραγωνική διάταξη"<sup>37</sup>.  
 Η  $K_{BB}$  διατηρείται σταθερή καί ίση πρὸς 1. φαίνεται ἡ μεταβολή  
 τῆς  $K_{AB}$  ὅταν  $(K_X)(K_t)$  σταθερό καί ἴσο πρὸς 100. Μιά  
 Michaelis-Menten καμπύλη δεύχεται γιὰ σύγκριση.

Στὸ διάγραμμα (22) οἱ σταθερότητες τῶν διαμορφωτικῶν  
 καταστάσεων A-A καί B-B εἶναι ἴδιες. Ἄν  $K_{AB} > 1$   
 σταθεροποιῦνται ἐνδιάμεσοι τύποι, σχετικὰ ὡς πρὸς τὶς A-A  
 B-B, ἐνῶ ἂν  $K_{AB} < 1$  οἱ ἐνδιάμεσοι τύποι εἶναι λιγώτερο  
 σταθεροί.

Σημειώνεται ὅτι ὅλες οἱ καμπύλες περνοῦν ἀπὸ τὴν ἴδια  
 τιμὴ τοῦ  $N_{Xt} = 2$  καί αὐτές οἱ μεταβολές τῆς  $K_{AB}$  τείνουν  
 νὰ προκαλέσουν ἐπιδράσεις ἀντίστροφες πρὸς τὶς ἀλλαγές  
 στὴ  $K_{BB}$



Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α ( 2 3 )

Παραδείγματα καμπυλών σύνδεσης για "τετραγωνική διάταξη"<sup>37</sup>  
 Το γινόμενο  $(K_x \times K_t)$  διατηρείται σταθερό και ίσο προς 100, ενώ  
 μεταβάλλονται οι  $K_{AB}$  και  $K_{BB}$  ταυτόχρονα. Καμπύλες με  $K_{AB}$   
 σταθερή είναι ασύμπτωτες σε χαμηλές συγκεντρώσεις του  $X$ .  
 Καμπύλες με  $K_{BB}/K_{AB}$  σταθερό λόγο είναι ασύμπτωτες σε υψηλές  
 συγκεντρώσεις του  $X$ . Καμπύλες με σταθερή  $K_{BB}$  διατέμνονται  
 σε τιμή  $N_{Xt} = 2,0$ .

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, που προκύψαν από τα διαγράμματα  
 (22) και (23) μπορούν να μας δείξουν ποσοτικά συμπεράσματα.  
 Και έχει βρεθεί ότι για κάθε τιμή της  $K_{BB}$ , που πέρνουμε,  
 υπάρχει μία τιμή της  $K_{AB}$ , που μας οδηγεί σε μία καμπύλη  
 ταυτόσημη με αυτή των Michaelis-Menten. Στην εξίσωση (15), που  
 συζητάμε η σχέση των σταθερών που χρειάζεται για να ικανο-  
 ποιήσει αυτή τη συνθήκη είναι η σχέση (19)

$$K_{AB} = \sqrt{K_{BB}}$$



Αντικαθιστώντας τή σχέση (19) στήν (15) (βλέπε παραρτ.1α) καταλήγουμε στήν εξίσωση (20), πού εΐναι ή :

$$N_{Xt} = \frac{4(X)}{\frac{1}{(K_{BB}) \cdot (K_X) \cdot (K_t)} + (X)} \quad (20)$$

Γιά  $\frac{1}{(K_{BB}) \cdot (K_X) \cdot (K_t)} = K_D$  ή εξίσωση (20) γίνεται μιá κλασσική Michaelis-Menten σχέση :

$$N_{Xt} = \frac{4(X)}{K_D + (X)}$$

Άς εξετάσουμε τώρα τή περίπτωση, πού μās ενδιαφέρει περισσότερο και πού αναφέρεται στή περίπτωση όπου έχουμε σύνδεση δύο υποκαταστατών στό ίδιο μόριο ένζυμου. Καί γι' αυτή τή περίπτωση θά χρησιμοποιήσουμε ένα τετραμερές μέ "τετραγωνική διάταξη", γιά λόγους όμοιότητας πρός τό ένζυμο, πού εξετάζουμε.

Ακολουθώντας τό πίνακα VI μπορούμε εύκολα νά παράγουμε όλα τά "νέα" είδη τών μορίων, πού περιέχουν από ένα ως τέσσερα μόρια του L (δεύτερος υποκαταστάτης) και είχαν από ένα ως τέσσερα μόρια X (πρώτος υποκαταστάτης). Συνολικά έχουμε 106 τέτοια "νέα" είδη, πού περιγράφονται από 54 σχέσεις (βλέπε παραρτ. 2), διότι αρκετά από αυτά περιγράφονται από ίδιες σχέσεις.

Θά δημιουργήσουμε τά νέα είδη γιά τή περίπτωση όπου τό παλιό μοριακό είδος είχε τέσσερα μόρια του X υποκαταστάτη ανά μόριο ένζυμου (όλες οι υπομονάδες περιέχουν από ένα μόριο του υποκαταστάτη X και είναι στή Β διαμορφωμερή κατάσταση) και εισέρχονται σ' αυτό, από ένα ως τέσσερα μόρια του δεύτερου υποκαταστάτη L. Στή συνέχεια θά καταστρώσουμε τήν εξίσωση  $N_{Lt}$  γιά τή περίπτωση, πού εξετάζουμε. Η εξίσωση  $N_{Xt}$  είναι σχεδόν ή ίδια και λύνεται μέ όμοιο τρόπο.





Σχηματίζονται τὰ παρακάτω μοριακά είδη με τὶς σχέσεις, πού τὰ περιγράφουν:

ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΙΔΗ

XL	X
X	X

(α)

L	X
X	X

(β)

ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ LΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΧΕΣΕΙΣ

α)  $4\theta_4 \cdot (K_L) \cdot (L) \cdot (X)^4$

β)  $\frac{4\theta_4 \cdot (K_L) \cdot (L) \cdot (X)^3}{(K_X)}$

X	XL
XL	X

XL	XL
X	X

(α)

α)  $6\theta_4 \cdot (K_L)^2 \cdot (L)^2 \cdot (X)^4$

L	X
X	XL

XL	L
X	X

(β)

ΔΥΟ ΜΟΡΙΑ L

β)  $\frac{12\theta_4 \cdot (K_L)^2 \cdot (L)^2 \cdot (X)^3}{(K_X)}$

L	X
X	L

L	L
X	X

(γ)

γ)  $\frac{6\theta_4 \cdot (K_L)^2 \cdot (L)^2 \cdot (X)^2}{(K_X)^2}$

(α)

XL	XL
XL	X

(β)

L	XL
XL	X

XL	XL
L	X

ΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑ L

α)  $4\theta_4 \cdot (K_L)^3 \cdot (L)^3 \cdot (X)^4$

L	XL
L	X

XL	L
L	X

L	L
L	X

(γ)

(δ)

β)  $\frac{12\theta_4 \cdot (K_L)^3 \cdot (L)^3 \cdot (X)^3}{(K_X)}$

γ)  $\frac{12\theta_4 \cdot (K_L)^3 \cdot (L)^3 \cdot (X)^2}{(K_X)^2}$

δ)  $\frac{4\theta_4 \cdot (K_L)^3 \cdot (L)^3 \cdot (X)}{(K_X)^3}$



ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΙΔΗΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΧΕΣΕΙΣ

(α)	(β)
XL XI	XL XI
XL XI	XL I

(γ)	(δ)
L XL	L I
XL L	XL XI

ΤΕΣΣΕΡΑ ΜΟΡΙΑ L

(ε)	(ς)
L L	L L
L XL	L L

α)  $\frac{\vartheta_4 \cdot (K_L)^4 \cdot (L)^4 \cdot (X)^4}{(K_X)^4}$

β)  $\frac{4\vartheta_4 \cdot (K_L)^4 \cdot (L)^4 \cdot (X)^3}{(K_X)^4}$

γ)  $\frac{6\vartheta_4 \cdot (K_L)^4 \cdot (L)^4 \cdot (X)^2}{(K_X)^4}$

δ)  $\frac{4\vartheta_4 \cdot (K_L)^4 \cdot (L)^4 \cdot (X)}{(K_X)^4}$

ε)  $\frac{\vartheta_4 \cdot (K_L)^4 \cdot (L)^4}{(K_X)^4}$



Τίς σχέσεις, πού έχουμε παράγει παραπάνω, τίς αντικαθιστούμε στην εξίσωση (17) με τέτοιο τρόπο ώστε για κάθε  $\Psi = \Psi'$  όρο της να προστίθενται οι σχέσεις, πού έχουμε παράγει γι' αυτόν.

Ἡ εξίσωση (17), πού παράγεται με αυτό τό τρόπο είναι μιά πολύ μεγάλη, σέ μήκος, σχέση. Μπορούμε όμως νά τήν ἀπλοποιήσουμε αντικαθιστώντας ὠρισμένες παραστάσεις της, πού ἐπαναλαμβάνονται.

Ἔτσι καλοῦμε τή  $(K_{BB}) \cdot (K_X) \cdot (K_L) = G$  καί τή  $(K_L) \cdot (L) = J$ .

Τότε ἡ εξίσωση (17) γράφεται:

$$(20) N_{Lt} = \frac{4G^4 \cdot \left( J \cdot X^4 + \frac{J \cdot X^3}{K_X} \right) L + 2G^4 \left( 6J^2 \cdot X^4 + 12 \frac{J^2 \cdot X^3}{K_X} + 6 \frac{J^2 \cdot X^2}{K_X} \right) L^2 +}{(1+GX)^4 + 4G^4 \cdot \left( J \cdot X^4 + \frac{J \cdot X^3}{K_X} \right) L + 2G^4 \cdot \left( 6J^2 \cdot X^4 + 12 \frac{J^2 \cdot X^3}{K_X} + 6 \frac{J^2 \cdot X^2}{K_X} \right) L^2 +}$$

$$\frac{3G^4 \cdot \left( 4J^3 \cdot X^4 + 12 \frac{J^3 \cdot X^3}{K_X} + 12 \frac{J^3 \cdot X^2}{K_X} + 4 \frac{J^3 \cdot X}{K_X} \right) L^3 + 4G^4 \cdot \left( J^4 \cdot X^4 + 4 \frac{J^4 \cdot X^3}{K_X} + 6 \frac{J^4 \cdot X^2}{K_X} + 4 \frac{J^4 \cdot X}{K_X} + \frac{J^4}{K_X} \right) L^4}{3G^4 \cdot \left( 4J^3 \cdot X^4 + 12 \frac{J^3 \cdot X^3}{K_X} + 12 \frac{J^3 \cdot X^2}{K_X} + 4 \frac{J^3 \cdot X}{K_X} \right) L^3 + G^4 \cdot \left( J^4 \cdot X^4 + 4 \frac{J^4 \cdot X^3}{K_X} + 6 \frac{J^4 \cdot X^2}{K_X} + 4 \frac{J^4 \cdot X}{K_X} + \frac{J^4}{K_X} \right) L^4}$$

Ἡ εξίσωση (17) μπορεί νά ἀπλοποιηθεῖ ἀκόμη. Ἡ παράσταση

$X + \frac{1}{K_X}$ , γιά συντομία θά γράφεται σάν  $W$ . Ἔτσι ἡ (17) γίνεται:

$$(21) N_{Lt} = \frac{4G^4 \cdot W \cdot L^2 \cdot X^3 \cdot K_L + 12G^4 \cdot W^2 \cdot L^4 \cdot X^2 \cdot K_L^2 + 12G^4 \cdot W^3 \cdot L^6 \cdot X \cdot K_L^3 + 4G^4 \cdot W^4 \cdot L^8 \cdot K_L^4}{(1+GX)^4 + 4G^4 \cdot W \cdot L^2 \cdot X^3 \cdot K_L + 6G^4 \cdot W^2 \cdot L^4 \cdot X^2 \cdot K_L^2 + 4G^4 \cdot W^3 \cdot L^6 \cdot X \cdot K_L^3 + G^4 \cdot W^4 \cdot L^8 \cdot K_L^4}$$

Πρὶν προχωρήσουμε στή πιό πέρα ἀπλοποίηση τῆς εξίσωσης (21), θά πρέπει νά ἐκθέσουμε μερικές σκέψεις μας τόσο γιά τή φυσική σημασία τῶν σταθερῶν  $(K_X)$ ,  $(K_L)$ , ὅσο καί γιά τή σχέση τους πρός τή γνωστή σταθερά  $(K_m)$  Michaelis-Menten καί τή συνήθη ἀριθμητική τιμή τους σέ διάφορα πειράματα.



Ακόμη πρέπει νά πούμε ότι κάθε άπλοποίηση τής (21) έχει σά μόνο σκοπό τό πιο εύκολο προσδιορισμό τής γραφικῆς τῆς άπεικόνισης καί τή προσαρμογή τῆς μέ βάση τά πειραματικά δεδομένα αὐτῆς τῆς έργασίας. Κατά τά άλλα ἡ έξίσωση (21) παραμένει στήν οὐσία άναλλοίωτη.

Ἡ  $(K_X)$  έχει τή φυσική σημασία τῆς  $(K_m)$  καί γιά κάθε ὑπομονάδα ξεχωριστά καί γιά όλόκληρο τό ένζυμο. Μέ τή βαθμιαία είσοδο, στό μόριο τοῦ ένζυμου, τοῦ δεύτερου ὑποκαταστάτη τήν (ιδιότητα αὐτή τῆς  $(K_X)$  άποκτᾶ καί ἡ  $(K_L)$ .

Από πειραματικά δεδομένα διαφόρων έρευνητῶν λ.χ. τῆς βιβλιογραφικῆς παραπομπῆς (33) ἡ  $(K_m)$  εἶναι τῆς τάξης τοῦ  $10^{-4}$  καί ίσχύει τό ίδιο γιά τή  $(K_X)$  καί  $(K_L)$  καί άκόμη ἡ συγκέντρωση τοῦ πρώτου ὑποκαταστάτη (X) εἶναι τῆς ίδιᾶς τάξης μεγέθους μέ τοῦ δεύτερου ὑποκαταστάτη (L), τῆς τάξης τοῦ  $10^{-4}$ .

Οἱ τιμές αὐτές γιά τίς διάφορες σταθερές, πού αναφέρονται πιο πάνω δέν έχουν έπιλεγεί τυχαία. Διότι σέ κάθε πειραματική έργασία μέ τό ένζυμο τῆς Γαλακτικῆς Αφυδρογονάσης (άλλά καί μέ κάθε άλλο ένζυμο γενικώτερα) οἱ μετρήσεις διεξάγονται σέ μιᾶ περιοχή συγκεντρώσεων όχι άκραία, ὡς πρὸς τή καμπύλη κορεσμοῦ, αλλά τέτοια ὥστε νά συγκεντρώνει τίς περισσότερες πιθανότητες πραγματικότητας τῶν αποτελεσμάτων.

Έτσι, μέ αὐτές τίς σκέψεις, μπορούμε νά άπλοποιήσουμε τήν έξίσωση (21) καί από τή μορφή πού έχει νά φτάσουμε στήν έξίσωση (22α-22β) (βλέπε παρ.3).

$$(22α) N_{Lt} = \frac{4G^4 \cdot X^3 \frac{K_L^2 \cdot \beta}{K_X} \cdot L}{(1+GX)^4 + 4G^4 \cdot X^3 \frac{K_L^3 \cdot \beta^2}{K_X} - 2G^4 \cdot X \frac{K_L^8 \cdot \beta^5}{K_X^3} \cdot L}$$



$$(22\beta) \quad N_{Lt} = \frac{4G^4 \cdot X^3 \frac{K_L^2 \cdot \beta}{K_X}}{\left(1+GX\right)^4 \frac{1}{L} + G^4 \frac{K_L^2 \cdot \beta}{K_X} \left(4X^3 + 6X^2 \frac{K_L^3 \cdot \beta^2}{K_X} + 4X \frac{K_L^6 \cdot \beta^4}{K_X^2} + \frac{K_L^9 \cdot \beta^6}{K_X^3}\right)}$$

· Η Εξίσωση (22α-22β) είναι μία ομογραφική συνάρτηση με μεταβλητές τις ποσότητες  $N_{Lt}$  και  $L$ . Λύνεται με όμοιο τρόπο όπως και η προηγούμενη εξίσωση (18).

Βρίσκουμε τη τιμή του  $L$ , που μηδενίζει το παρονομαστή και είναι ή:

$$L_{Op} = \frac{K_X^3 \cdot (1+GX)^4}{2XG^4 \cdot \beta^5 \cdot K_L^8} + \frac{2X^2 \cdot K_X^2}{K_L^5 \cdot \beta^3}$$

ή γράφουμε τη  
άκριβη μορφή της

$L_{Op}$  :

$$L_{Op} = \frac{K_X^3 \cdot (1+K_{BB} \cdot K_X \cdot K_t \cdot X)^4}{2X \cdot K_{BB}^4 \cdot K_X^4 \cdot K_t^4 \cdot K_L^8 \cdot \beta^5} + \frac{2X^2 \cdot K_X^2}{K_L^5 \cdot \beta^3}$$

Και για αυτή τη τιμή το  $N_{Lt}$  τείνει στο άπειρο. Αν λύσουμε τη μορφή (22β) ως προς  $L$  έχουμε:

$$L = \frac{N_{Lt} (1+GX)^4}{\frac{G^4 \cdot K_L^2 \cdot \beta}{K_X} \left[ 4X^3 - N_{Lt} \left( 4X^3 + \frac{6K_L^3 \cdot \beta^2 \cdot X^2}{K_X} + \frac{4K_L^6 \cdot \beta^4 \cdot X}{K_X^2} + \frac{K_L^9 \cdot \beta^6}{K_X^3} \right) \right]}$$

Βρίσκουμε τη τιμή του  $N_{Lt}$ , που μηδενίζει το παρονομαστή της πιο πάνω σχέσης και είναι  $N_{Lt}$  ή:

$$N_{Lt} \text{ op} = \frac{4X^3}{4X^3 + \frac{6K_L^3 \cdot \beta^2 \cdot X^2}{K_X} + \frac{4K_L^6 \cdot \beta^4 \cdot X}{K_X^2} + \frac{K_L^9 \cdot \beta^6}{K_X^3}}$$



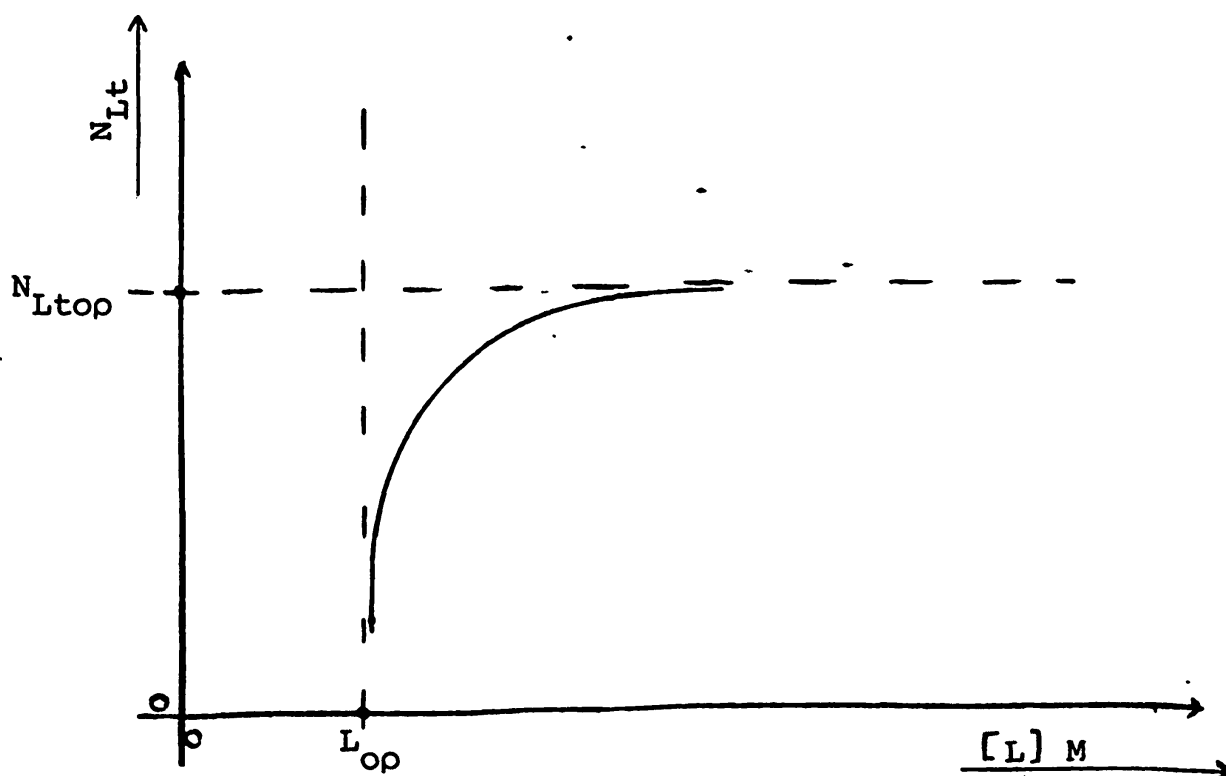
Καί γι'αυτή τή τιμή τό  $L$  τείνει στό άπειρο.

Οι τιμές  $L_{op}$  καί  $N_{Lt,op}$  δείχνουν τή θέση τών πόλων τής όμογραφικής συνάρτησης.

Οι διάφοροι ύπολογισμοί, πού μάς όδηγοϋν στίς πιό πάνω σχέσεις βρίσκονται στό παράρτημα 3.

Σύμφωνα μέ όσα έκθέσαμε άμέσως πιό πάνω, θά πρέπει ή έξίσωση (22) νά παρίσταται γραφικά μέ σχήμα ύπερβολής, όπως δείχνει τό διάγραμμα (24).

Δ Ι Α Γ Ρ Α Μ Μ Α 24

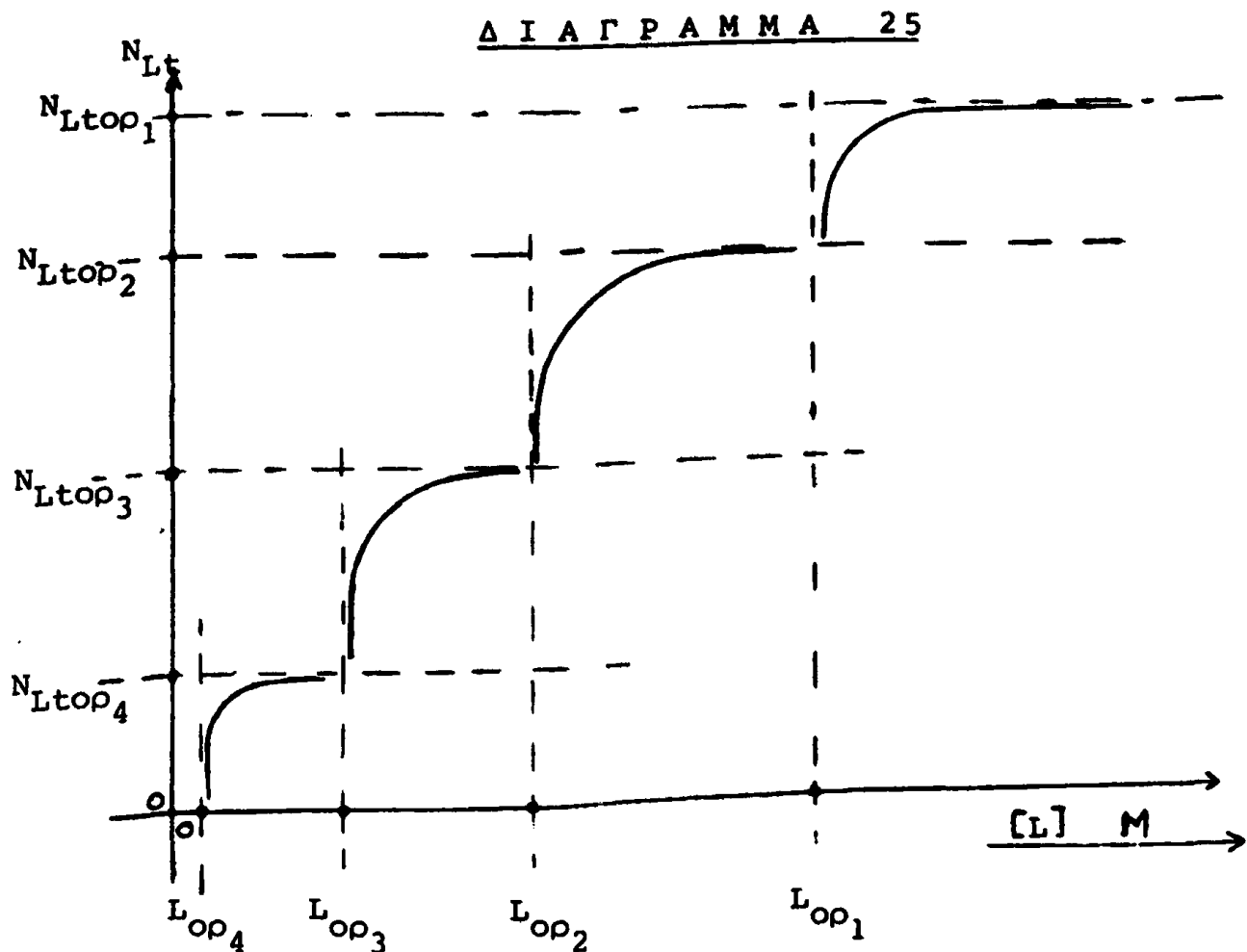


Ή γραφική άπεικόνιση τής έξίσωσης 22, όπως προκύπτει άπό τή λύση της (στό κείμενο).



Αν όμως λάβουμε υπ' όψη μας όσα έχουμε εκθέσει για τήν  
 έξίσωση (5-18) στις σελίδες 83, 84 και αυτά τών σελίδων 48, 49, 50  
 συμπεραίνουμε ότι και στή περίπτωση τής έξίσωσης (22) ή σταθερά  
 $K_L$  δέν είναι μία αλλά τέσσερεις και αλλάζουν - από τή πρώτη  
 ως τή τέταρτη - έτσι ώστε κάθε μία, από τίς τέσσερεις στή  
 συνέχεια ύπερβολές, νά είναι συνεχόμενη μέ τή προηγούμενη τής.  
 (Δηλαδή για κάθε διαφορετική  $K_L$  ύπάρχει μία διαφορετική  
 ύπερβολή).

Τό διάγραμμα (25) άπεικονίζει γραφικά τή πραγματική μορφή  
 τής έξίσωσης (22).



Η γραφική άπεικόνιση τής έξίσωσης 22 .



Ἄς δοῦμε, μέ λίγα λόγια, γιατί τό διάγραμμα (25) ἔχει αὐτή τή μορφή.

Ἐπιθέτουμε ὅτι βρισκόμαστε στήν ἀρχή τῆς ἀντίδρασης. Ὁ πρῶτος ὑποκαταστάτης  $X$  ἔχει ἤδη καταλάβει καί τίς τέσσερεις ὑπομονάδες τοῦ ἔνζυμου καί τότε ἀρχίζει νά εἰσέρχεται ὁ δεῦτερος ὑποκαταστάτης  $L$ .

Ξαναβλέπουμε τίς σχέσεις, πού ἐκφράζουν τίς  $L_{Op}$  καί  $N_{Lt_{Op}}$ . Ἐπειδή ἡ (ποσότητα)  $K_L$  ἔχει ἀριθμητική τιμή ἀρνητικῆς δύναμης καί εἶναι θετικός ἀριθμός, ὅταν αὐξάνει ὁ ἐκθέτης μειώνεται ἡ τιμή τῆς. Ἐπίσης ἐπιθέτουμε ὅτι ὅταν ἡ  $K_L$  μεταβάλλεται κατά τή διάρκεια τῆς ἀντίδρασης (καί λαβαίνει τίς τέσσερεις διαφορετικῆς τιμές) αὐξάνει. Τότε τόσο ἡ τιμή τῆς  $L_{Op}$  ὅσο καί ἡ τῆς  $N_{Lt_{Op}}$  μειώνονται, διότι καί στίς δύο ἐκφράσεις ἡ ποσότητα  $K_L$  βρίσκεται στό παρονομαστή. Ἄν ἡ  $K_L$ , ὅταν μεταβάλλεται, μειώνεται, τότε ἡ τιμή τῆς  $L_{Op}$  καί τῆς  $N_{Lt_{Op}}$  αὐξάνονται.

Τά  $L_{Op}$  ἀπό 1 ὠς 4 καί τά  $N_{Lt_{Op}}$  ἀπό 1 ὠς 4 δείχνουν μόνο τή διαδοχή καί ὄχι τή προτεραιότητα στό διάγραμμα (25).

Τά ἀποτελέσματα τῶν πειραματικῶν μετρήσεων αὐτῆς τῆς ἐργασίας εἶναι σέ πλήρη συμφωνία μέ τά θεωρητικά ἀποτελέσματα τῆς Φυσικῆς, ἡ χρήση ἑνός μόνο ἔνζυμου δέν γενικεύει τά ἀποτελέσματα. Ὅμως οἱ θεωρητικῆς προτάσεις, πού χρησιμοποιήθηκαν καί κατέληξαν σέ καμπύλες τέτοιες ὥστε νά ἐπαληθεύουν τίς σκέψεις μας καί τά πειραματικά μας ἀποτελέσματα, εἶναι γενικῆς.

Σάν ἀντίλογος σέ αὐτά θά μπορούσαν νά εἶναι πρῶτο τό γεγονός τῆς μορφῆς τῶν πειραματικῶν καμπυλῶν, πού πήραμε μέ τή χρήση τοῦ  $HgCl_2$  σάν ἀναστολέα καί δεῦτερο τό ὅτι γιά τή λύση τῶν γενικευμένων ἐξισώσεων τοῦ τύπου τῆς  $N_{Lt}$  χρησιμοποιήθηκαν ἀριθμητικῆς τιμές σταθερῶν, πού ἀναφέρονται στό ἔνζυμο Γαλακτική Ἀφυδρογονάση. Καί τά δύο αὐτά ἐπιχειρήματα ἀνασκευάζονται.





Ο  $\text{HgCl}_2$  είναι ένας ειδικός αναστολέας για ένζυμα με σουλφυδρυλομάδες όπως η Γαλακτική Αφυδρογονάση. Εάν τέτοιος άπενεργοποιεί το ένζυμο ταχύτατα, κάτι που μας εμποδίζει να δούμε διεξοδικά τη δράση του σε εύρεια περιοχή συγκεντρώσεων.

Οι εξισώσεις του τύπου της  $N_{L_t}$  επεξεργάστηκαν έτσι ώστε να είναι δυνατό με γενικό τρόπο να φανεί η κύρια μορφή τους. Οι αριθμητικές τιμές των σταθερών, που χρησιμοποιήθηκαν είναι συνήθεις τιμές κοινότατες σε πολλά άλλοστερικά ένζυμα και επί πλέον δεν άλλαξαν σε τίποτα τη καθολική (τη χονδρική θα λέγαμε) μορφή τους.

Εάν γενικό πλέον συμπέρασμα, από όσα μέχρι τώρα εκτέθηκαν, φαίνεται η βεβαιότητα ότι οι καμπύλες κορεσμού ενός άλλοστερικού ενζυμου (καίστη προκειμένη περίπτωση της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης), δεν ακολουθούν τη τυπική γραφική απεικόνιση αλλά έχουν σημεία ασυνέχειας, όταν αναστέλλεται η δράση του από διάφορους μη ειδικούς αναστολείς.

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι καθώς προχωρεί ο κορεσμός κάθε υπομονάδας αυτή εκτείνει στις γειτονικές της υπομονάδες επιδράσεις τέτοιες ώστε η θερμοδυναμική σταθερά ισορροπίας για την αντίδραση, που βρίσκεται σε εξέλιξη, αλλάζει κάποια χρονική στιγμή. Έτσι αλλάζει όλη η διεργασία σύνδεσης και φυσικά και η σχέση, που τη περιγράφει απεικονίζεται με μία άλλα γραμμή. Στα σημεία αυτά έχουμε ασυνέχεια της συνολικής γραφικής απεικόνισης.

Τό φαινόμενο, έτσι, στο σύνολό του, χωρίζεται σε τόσα μέρη όσες οι υπομονάδες του ενζυμου, που χρησιμοποιείται (για τη Γαλακτική Αφυδρογονάση τέσσερα μέρη).

Η ποσότητα  $N_{L_t}$ , όπως έχει περιγραφεί ένωρίτερα, είναι τό γραμμομοριακό κλάσμα του ένωμένου υποκαταστάτη (αναστολέα) προς τό συνολικό ένζυμο (ομέσος όρος). Όταν διατηρείται σταθερή ή συγκέντρωση του ενζυμου, ο ρυθμός αύξησης ή ελάττωσης του  $N_{L_t}$  σημαίνει αντίστροφα ελάττωση ή αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης.



Έτσι ή μέτρηση του  $N_{Lt}$  στη διάρκεια της ένζυμικής αντίδρασης, όταν διατηρείται σταθερή ή συγκέντρωση του ένζυμου, είναι ένα μέτρο της ταχύτητας αντίδρασης (μέ αντίστροφη φορά) .

Με αυτά εξηγείται ή χρήση του  $N_{Lt}$  στις θεωρητικές καμπύλες αντί της ταχύτητας αντίδρασης, όπως και στα διαγράμματα (24) - (25). Είναι μιά πλό εύχρηστη έκφραση.



## 6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α 1ΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗΣ (18 - 5)

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_R}{R} \left(1 + \frac{I}{K_I''}\right) + \frac{K_P}{P} \left(1 + \frac{I}{K_I'}\right) + \frac{K_{RP}}{R P} \left(1 + \frac{I}{K_I'}\right) + \frac{I}{4,6 K_I}}$$

$$\eta \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \left(1 + \frac{I}{K_I''}\right) \left(\frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P}\right) + \frac{K_P}{P} \left(1 + \frac{I}{K_I'}\right) + \frac{I}{4,6 K_I}}$$

Χρησιμοποιούνται πειραματικά δεδομένα του πίνακα V ,  
 $\frac{K_2 + K_4}{K_4} = 4,6$  και οι  $I = \alpha \cdot K_I$  ,  $I = \beta \cdot K_I'$  ,  $I = \gamma \cdot K_I''$  , πού  
 έξηγούνται στη σελίδα (81). Μετά τά παραπάνω η (18-5) γίνεται:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + (1 + \gamma) \left(\frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P}\right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) + \frac{\alpha^2 K_I}{4,6 I}}$$

Η πιο πάνω ομογραφική συνάρτηση v προς I λύνεται  
 απλά. Βρίσκουμε τή τιμή του I, πού μηδενίζει τόν παρονομαστή.  
 φαίνεται εύκολα ότι είναι η :

$$I_{op} = \frac{\alpha^2 K_I}{4,6 \left[ 1 + (1 + \gamma) \left(\frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P}\right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) \right]}$$

Καί η  $I_{op}$  είναι πόλος τής ομογραφικής. Η πιο πάνω  
 συνάρτηση λύνεται ως προς I.

$$1 + (1 + \gamma) \left(\frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P}\right) + \frac{K_P}{P} (1 + \beta) + \frac{\alpha^2 K_I}{4,6 I} = \frac{V_{\max}}{v}$$



ή

$$I = \frac{\alpha^2 v K_I}{4,6 \left[ v_{\max} - v \left[ 1 + (1+\gamma) \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P} \right) + \frac{K_P}{P} (1+\beta) \right] \right]}$$

Ἡ τιμὴ τοῦ  $v$ , πού μηδενίζει τὸν παρονομαστή, εἶναι πῶλος τῆς παραπάνω ὁμογραφικῆς  $I$  πρὸς  $v$  καὶ εἶναι ἡ :

$$v_{op} = \frac{v_{\max}}{1 + (1+\gamma) \left( \frac{K_R}{R} + \frac{K_{RP}}{R P} \right) + \frac{K_P}{P} (1+\beta)}$$

Οἱ τιμές  $I_{op}$  καὶ  $v_{op}$  χρησιμοποιοῦνται γιὰ τὴ κατασκευὴ τοῦ διαγράμματος (20).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙαΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΒΙΣΩΣΗΣ (19) ΣΤΗΝ ΕΒΙΣΩΣΗ (15)

$$N_{Xt} = \frac{4K_{BB}K_XK_tX + 12K_{BB}^2K_X^2K_t^2X^2 + 12K_{BB}^3K_X^3K_t^3X^3 + 4K_{BB}^4K_X^4K_t^4X^4}{1 + 4K_{BB}K_XK_tX + 6K_{BB}^2K_X^2K_t^2X^2 + 4K_{BB}^3K_X^3K_t^3X^3 + K_{BB}^4K_X^4K_t^4X^4}$$

ή

$$N_{Xt} = \frac{4K_{BB}K_XK_tX \left(1 + K_{BB}K_XK_tX\right)^3}{\left(1 + K_{BB}K_XK_tX\right)^4}$$

ή

$$N_{Xt} = \frac{4K_{BB}K_XK_tX}{1 + K_{BB}K_XK_tX}$$

ή

$$N_{Xt} = \frac{4X}{\frac{1}{K_{BB}K_XK_t} + X}$$



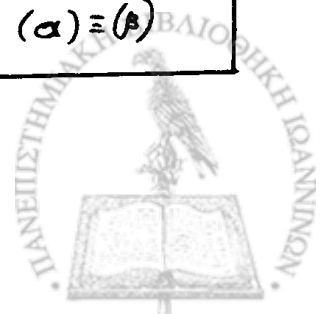
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

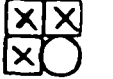
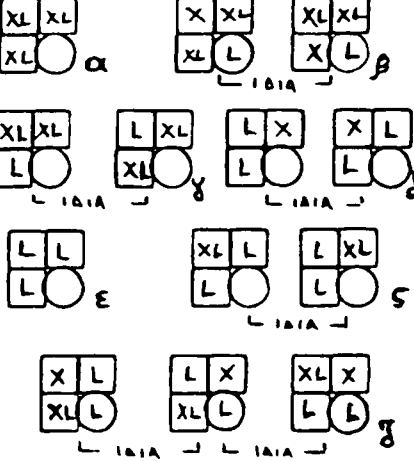
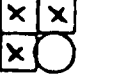
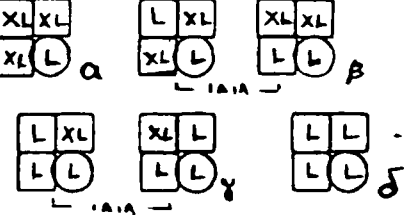
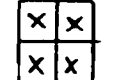


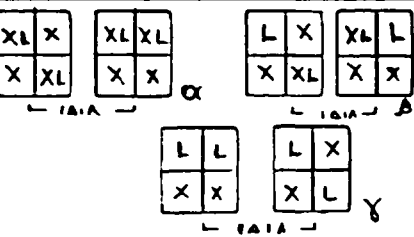
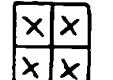
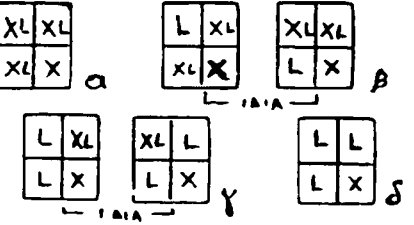
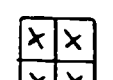
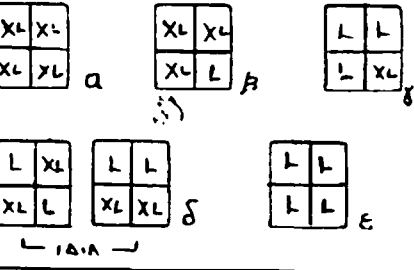
Τα "νέα" μοριακά είδη και οι σχέσεις που τα περιγράφουν, αναλυτικά

Παλαιό είδος	Μοριακά νέα είδη	ΝΕΑ ΕΙΔΗ	Σχέσεις, που περιγράφουν τα νέα είδη
	1	α β γ	α) $3\partial_1(k_1)(l)(x), \beta) \partial_1(k_1)(l)(x)$ γ) $\partial_1 \frac{(k_1)(l)}{(kx)}$
	2	α β γ	α) $3\partial_1(k_1)^2(l)^2(x), \beta) 3\partial_1(k_1)^2(l)^2(x)$ γ) $3\partial_1 \frac{(k_1)^2(l)^2}{(kx)}, (\alpha) \equiv (\beta)$
	3	α β γ	α) $\partial_1(k_1)^3(l)^3(x), \beta) 3\partial_1(k_1)^3(l)^3(x)$ γ) $3\partial_1 \frac{(k_1)^3(l)^3}{(kx)}$
	4	α β	α) $\partial_1(k_1)^4(l)^4(x), \beta) \partial_1 \frac{(k_1)^4(l)^4}{(kx)}$
	1	α β γ	α) $2\partial_2(k_1)(l)(x)^2, \beta) 2\partial_2(k_1)(l)(x)^2$ γ) $2\partial_2 \frac{(k_1)(l)}{(kx)}(x), (\alpha) \equiv (\beta)$
	1	α β γ	α) $2\partial_2(k_1)(l)(x)^2, \beta) 2\partial_2(k_1)(l)(x)^2$ γ) $2\partial_2 \frac{(k_1)(l)}{(kx)}(x), (\alpha) \equiv (\beta)$
	2	α β γ δ ε ζ	α) $\partial_2(k_1)^2(l)^2(x)^2, \beta) 4\partial_2(k_1)^2(l)^2(x)^2$ γ) $\partial_2(k_1)^2(l)^2(x)^2, \delta) 2\partial_2 \frac{(k_1)^2(l)^2}{(kx)}(x)$ ε) $\partial_2 \frac{(k_1)^2(l)^2}{(kx)^2}, \zeta) 4\partial_2 \frac{(k_1)^2(l)^2}{(kx)}(x)$ (α) ≡ (γ)



Παλαιό είδος	Μορφή Προσταθίου	ΝΕΑ ΕΙΔΗ	Συντεταγμένες που περιγράφουν τα "νέα είδη"
	2	α β γ δ ε ς	$\alpha) \partial_2 (k_1)^2 (l)^2 (x)^2, \beta) 4 \partial_2 (k_1)^2 (l)^2 (x)^2$ $\gamma) \partial_2 (k_1)^2 (l)^2 (x)^2, \delta) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2 (x)}{(k_1)}$ $\epsilon) \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2}{(k_1)^2}, \sigma) 4 \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2 (x)}{(k_1)}$ $\zeta) \equiv (\gamma)$
	3	α β γ δ ε ς	$\alpha) 2 \partial_2 (k_1)^3 (l)^3 (x)^2, \beta) 2 \partial_2 (k_1)^3 (l)^3 (x)^2$ $\gamma) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^3 (l)^3}{(k_1)^2}, \delta) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^3 (l)^3 (x)}{(k_1)}$ $\epsilon) 4 \partial_2 \frac{(k_1)^3 (l)^3 (x)}{(k_1)}, (\alpha) \equiv (\beta)$
	3	α β γ δ ε	$\alpha) 2 \partial_2 (k_1)^2 (l)^2 (x)^2, \beta) 2 \partial_2 (k_1)^2 (l)^2 (x)^2$ $\gamma) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2}{(k_1)^2}, \delta) 4 \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2 (x)}{(k_1)}$ $\epsilon) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^2 (l)^2 (x)}{(k_1)}, (\alpha) \equiv (\beta)$
	4	α β γ	$\alpha) \partial_2 (k_1)^4 (l)^4 (x)^4, \beta) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^4 (l)^4 (x)}{(k_1)}$ $\gamma) \partial_2 \frac{(k_1)^4 (l)^4}{(k_1)^2}$
	4	α β γ	$\alpha) \partial_2 (k_1)^4 (l)^4 (x)^4, \beta) 2 \partial_2 \frac{(k_1)^4 (l)^4 (x)}{(k_1)}$ $\gamma) \partial_2 \frac{(k_1)^4 (l)^4}{(k_1)^2}$
	1	α β γ δ	$\alpha) \partial_3 (k_1)(l)(x)^3, \beta) 3 \partial_3 (k_1)(l)(x)^3$ $\gamma) 3 \partial_3 \frac{(k_1)(l)}{(k_1)} (x)^2$
	2	α β γ δ ε ς	$\alpha) 3 \partial_3 (k_1)^2 (l)^2 (x)^3, \beta) 3 \partial_3 (k_1)^2 (l)^2 (x)^3$ $\gamma) 3 \partial_3 \frac{(k_1)^2 (l)^2}{(k_1)^2} (x)$ $\delta) 6 \partial_3 \frac{(k_1)^2 (l)^2 (x)^2}{(k_1)}$ $(\alpha) \equiv (\beta)$



Παλαιό είδος	ΜΟΡΙΑ ΑΔΡΕΣ ΥΠΟΜΟΝΗ ΕΣΤΑΤΑ	ΝΕΑ ΕΙΔΗ	Σχέσεις, που περιγράφουν τα "νέα είδη"
	3		<p>α) <math>\partial_3 (k_L)^3 (L)^3 (x)^3</math>, β) <math>3\partial_3 (k_L)^3 (L)^3 (x)^3</math>  γ) <math>3\partial_3 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)} (x)^2</math>, δ) <math>3\partial_3 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)^2} (x)</math>  ε) <math>\partial_3 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)^3}</math>, ζ) <math>3\partial_3 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)^2} (x)</math>  η) <math>6\partial_3 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)} (x)</math>, θ) <math>\equiv (\zeta)</math></p>
	4		<p>α) <math>\partial_3 (k_L)^4 (L)^0 (x)^3</math>, β) <math>3\partial_3 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)} (x)^2</math>  γ) <math>3\partial_3 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)^2} (x)</math>, δ) <math>\partial_3 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)^3}</math></p>
	1		<p>α) <math>4\partial_4 (k_L)(L)(x)^4</math>, β) <math>4\partial_4 \frac{(k_L)(L)}{(k_x)} (x)^3</math></p>
	2		<p>α) <math>6\partial_4 (k_L)^2 (L)^2 (x)^4</math>, β) <math>12\partial_4 \frac{(k_L)^2 (L)^2}{(k_x)} (x)^3</math>  γ) <math>6\partial_4 \frac{(k_L)^2 (L)^2}{(k_x)^2} (x)^2</math></p>
	3		<p>α) <math>4\partial_4 (k_L)^3 (L)^3 (x)^4</math>, β) <math>12\partial_4 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)} (x)^3</math>  γ) <math>12\partial_4 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)^2} (x)^2</math>, δ) <math>4\partial_4 \frac{(k_L)^3 (L)^3}{(k_x)^3} (x)</math></p>
	4		<p>α) <math>\partial_0 (k_L)^4 (L)^4 (x)^4</math>, β) <math>4\partial_4 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)} (x)^3</math>  γ) <math>4\partial_4 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)^2} (x)^2</math>, δ) <math>6\partial_4 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)^3} (x)</math>  ε) <math>\partial_4 \frac{(k_L)^4 (L)^4}{(k_x)^4}</math></p>





ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Η ΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΒΙΣΩΣΗΣ 21 N<sub>Lt</sub> ΩΣ ΠΡΟΣ L

$$N_{Lt} = \frac{4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (K_L L X + \frac{K_L L X^2}{K_X}) L \cdot 2 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (6 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^2 + 3 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (4 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^3}{(1 + K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma} X)^4 + 4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (K_L L X + \frac{K_L L X^2}{K_X}) L \cdot 2 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (6 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^2 + 3 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (4 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^3 + 4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (K_L^2 L^2 X + 6 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^4} + \frac{4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (K_L L X + \frac{K_L L X^2}{K_X}) L \cdot 2 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (6 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^2 + 3 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (4 K_L^2 L^2 X + 12 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^3}{4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (K_L^2 L^2 X + 6 \frac{K_L L X^2}{K_X} + 6 \frac{K_L^2 X^2}{K_X^2}) L^4} -$$

Απλοποιώντας τη παραπάνω σχέση έχουμε :

$$N_{Lt} = \frac{4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X}) K_L L^2 X^2 + 12 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^2 K_L L^2 X + 12 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^3 K_L L X + 4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^4 K_L L^2}{(1 + K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma} X)^4 + 4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X}) K_L L^2 X + 6 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^2 K_L L X + 4 K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^3 K_L L X + K_{\alpha} K_{\beta} K_{\gamma}^2 (X + \frac{1}{K_X})^4 K_L L^2}$$

Μέσα έχουν έκτεθει στη σελίδα (93), μπορούμε να παραδεχτούμε ότι :

α) X της τάξης του 10<sup>-4</sup> και K<sub>X</sub> της τάξης του 10<sup>-4</sup>

δρα  $X + \frac{1}{K_X} \approx \frac{1}{K_X}$

β) L της τάξης του 10<sup>-4</sup> και K<sub>L</sub> της τάξης του 10<sup>-4</sup>

δρα μπορούμε να γράψουμε τη σχέση L = β · K<sub>L</sub> όπου β σταθερά.

Με βάση τα παραπάνω η N<sub>Lt</sub> μπορεί να πάρει τρεις μορφές

(α) και (β) αφού πρώτα, για συντομία γράψουμε K<sub>BB</sub> K<sub>X</sub> K<sub>t</sub> = G .



(α)

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^3 L^2 + 12G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X^2 L^4 + 12G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 X L^6 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^4 L^8}{(1+GX)^4 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^3 L^2 + 6G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X^2 L^4 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 X L^6 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^4 L^8}$$

ή

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 \left(X + \frac{K_L L^2}{K_X}\right)^3}{(1+GX)^4 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 \left[4X^3 + 6\left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^2 L^2 + 4\left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X L^4 + \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 L^6\right]}$$

Παραδεχόμαστε ότι ισχύει:

$$X + \frac{K_L L^2}{K_X} \simeq 10^{-4} + \frac{10^{-4} \cdot 10^{-8}}{10^{-4}} = X$$

Καί τότε έχουμε:

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 X^3}{(1+GX)^4 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) \left[2\left(X + \frac{K_L L^2}{K_X}\right)^3 - \frac{K_L^2 L^4}{K_X^2} \left(2X + \frac{K_L L^2}{K_X}\right) + 2X^3\right] L^2}$$

ή

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) \beta X^3 L}{(1+GX)^4 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) \beta^2 X^3 - 2G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) \beta^5 X L}$$

ΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗ (α)



(β)

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^3 L^2 + 12G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X^2 L^4 + 12G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 X L^6 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^4 L^8}{(1+GX)^4 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^3 L^2 + 6G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X^2 L^4 + 4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 X L^6 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^4 L^8}$$

ή

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 \left(X + \frac{K_L L^2}{K_X}\right)^3}{(1+GX)^4 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 \left[4X^3 + 6\left(\frac{K_L}{K_X}\right) X^2 L^2 + 4\left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 X L^4 + \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^3 L^6\right]}$$

Παραδεχόμαστε ότι ισχύει:

$$X + \frac{K_L L^2}{K_X} \approx 10^{-4} + \frac{10^{-4} \cdot 10^{-8}}{10^{-4}} = X$$

Καί τότε έχουμε :

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right) L^2 X^3}{(1+GX)^4 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 \beta \left[4X^3 + 6\left(\frac{K_L}{K_X}\right) \beta^2 X^2 + 4\left(\frac{K_L}{K_X}\right)^6 \beta^4 X + \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^9 \beta^6\right] L}$$

ή

$$N_{Lt} = \frac{4G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 \beta X^3}{\frac{1}{L} (1+GX)^4 + G^4 \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^2 \beta \left[4X^3 + 6\left(\frac{K_L}{K_X}\right) \beta^2 X^2 + 4\left(\frac{K_L}{K_X}\right)^6 \beta^4 X + \left(\frac{K_L}{K_X}\right)^9 \beta^6\right]}$$

ΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗ (β)

Από την ομογραφική (α), πόλος της  $N_{Lt}$  είναι η τιμή του  $L$ , που μηδενίζει το παρονομαστή. Είναι η :

$$L_{op} = \frac{K_X^3 (1 + K_{BB} K_X K_t X)^4}{2K_{BB}^4 K_X^4 K_t^8 K_L^8 \beta^5 X} + \frac{2K_X^2 X^2}{K_L^5 \beta^3}$$

Λύνεται η ομογραφική (β) ως προς  $L$  και παίρνει τη μορφή :

$$L = \frac{N_{Lt} (1 + GX)^4}{G^4 \left( \frac{K_L^2}{K_X} \right) \beta^4 X^3 - N_{Lt} \left( 4X^3 + 6 \left( \frac{K_L^3}{K_X} \right) \beta^2 X^2 + 4 \left( \frac{K_L^6}{K_X} \right) \beta^4 X + \left( \frac{K_L^9}{K_X} \right) \beta^6 \right)}$$

Από την ομογραφική (β) και τα άμεσα παραπάνω, πόλος της  $N_{Lt}$  είναι η τιμή του  $N_{Lt}$ , που μηδενίζει το παρονομαστή. Είναι η :

$$N_{Lt_{op}} = \frac{4X^3}{4X^3 + 6 \left( \frac{K_L^3}{K_X} \right) \beta^2 X^2 + 4 \left( \frac{K_L^6}{K_X} \right) \beta^4 X + \left( \frac{K_L^9}{K_X} \right) \beta^6}$$

Οι τιμές  $L_{op}$  και  $N_{Lt_{op}}$  δίνουν τρεις θέσεις των πόλων της ομογραφικής 22 (α-β) και με βάση αυτές σχεδιάστηκε το Διάγραμμα 24 της σελ. 95.



## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ἡ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση εἶναι ἓνα ἀλλοστερικό ἐνζυμο. Ἐχει δομή τετραμεροῦς μέ τέσσερες, περίπου ὁμοιες, ὑπομονάδες. Διακρίνονται δύο εἶδη ὑπομονάδων, Η καί Μ καί ἔτσι σχηματίζονται πέντε εἶδη ἰσοένζυμων, τά  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $HM_3$ ,  $M_4$ , πού βρίσκονται στούς μύες τῶν ζῶων. Στή φύση, ἐπίσης, ἔχει βρεθεῖ καί ἓνα ἄλλο ἰσοένζυμο Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης τό  $X_4$  μέ ὑπομονάδες Χ, πού εἶναι παρόμοιες, ὡς πρός τίς ἰδιότητες, μέ τίς ὑπομονάδες Η.

Ἐχουν γίνεῖ πολλές ἐργασίες γιά νά βρεθεῖ ἡ δομή τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης. Τό ἐνζυμο, ἀποτελεῖται ἀπό 1065 ἀμινοξέα περίπου ( τό 93,5 % τῆς πρωτεΐνης ) μέ τό σημαντικό ἀμινοξύ Κυστεΐνη.

Ἡ Γαλακτική Ἀφυδρογονάση καταλύει τήν ὀξειδοαναγωγική ἀντίδραση τῆς μετατροπῆς τοῦ Γαλακτικοῦ ὀξέος πρός Πυροσταφυλικό καί ἀντίστροφα, μέ συνένζυμο τό  $NAD^+$  καί  $NADH$ . Ἡ δράση τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης ἀναστέλλεται ταχύτατα καί ἀπό ἐλάχιστες συγκεντρώσεις σουλφυδρυλοαντιδραστηρίων, ἐνώ μή εἰδικοί ἀναστολεῖς ἀπενεργοποιοῦν τό ἐνζυμο σέ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τό ἐνζυμο διατηρεῖ τήν ἐνεργότητά του σέ ἀραιά διαλύματα του σέ  $pH=7$  καί σέ ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Ἡ κινητική συμπεριφορά τῶν ἀλλοστερικῶν καί γενικότερα τῶν πολυμερῶν πρωτεϊνῶν περιγράφεται ἀπό δύο μοντέλα, πού ἔχουν κύρια παρουσιαστεῖ.

Εἶναι τό "συμμετρικό μοντέλο" τῶν Monod-Wyman-Changeux, καί τό "γενικευμένο μοντέλο" τῶν Koshland-Nemethy-Filmer (K.N.F.).

Μέ βάση τό "γενικευμένο μοντέλο" τῶν K.N.F. ἔχουν μελετηθεῖ οἱ συνδέσεις μικρῶν ὑποκαταστατῶν σέ ἀλλοστερικές πρωτεΐνες. Οἱ συνδέσεις αὐτές καλοῦνται "συνεργατικές συνδέσεις".

Χρησιμοποιῶντας τίς θεωρητικές αὐτές σκέψεις γιά τίς "συνεργατικές συνδέσεις" μπορούμε νά παράγουμε σχέσεις, πού περιγράφουν τό μηχανισμό σύνδεσης μικρῶν ὑποκαταστατῶν π.χ.



υποστρωμάτων-αναστολέων-ένεργοποιητών,σέ άλλοστερικές πρωτεΐνες μέ άρκετή άκρίβεια καί μέ μεταβλητές,πού εύκολα προσδιορίζονται.

Στό πειραματικό μέρος έγινε μέτρηση τής ταχύτητας τής αντίδρασης μετατροπής του πυροσταφυλικού σέ Γαλακτικό μέ συνένζυμο NADH ,όταν αναστέλλεται ή δράση τής Γαλακτικής 'Αφυδρογονάσης μέ αναστολείς σάν τό όξαλικό όξύ,τό μυρμηκικό όξύ καί τό  $HgCl_2$  .

Οί μετρήσεις έδειξαν ότι οί καμπύλες κορεσμού ακολουθοϋν μιá ιδιόρρυθμη γραμμή,πού άποτελεΐται άπό τέσσερες συνεχόμενες υπερβολές μέ σημεία άσυνέχειας.Αυτή ή παρατήρηση δέν έγινε μέ τή χρήση του  $HgCl_2$  διότι τό ένζυμο άπενεργοποιεΐται μέ έλάχιστες συγκεντρώσεις αναστολέα.

'Η θεωρητική έπεξεργασία τών σχέσεων,πού παράγονται μέ βάση τις"συνεργατικές συνδέσεις",για τή περίπτωση πού έξετάζουμε μās οδηγεί σέ συναρτήσεις,πού ή γραφική τους άπεικόνιση είναι σάν αυτή τών πειραματικών μας καμπυλών.

'Εξήγηση γι'αυτή τήν "άνώμαλη" συμπεριφορά δόθηκε μέ βάση τό άλλοστερικό πρότυπο τών K.N.F. 'Οφείλονται σέ ένδοϋπομοναδικές άλληλοεπιδράσεις,πού διαφοροποιοϋν τις θερμοδυναμικές σταθερές ίσορροπίας καί για τά μόρια του υποστρώματος καί για τά μόρια του αναστολέα,πού είναι συνδεδεμένα σέ κάθε μόριο του ένζυμου.

Πιό συγκεκριμένα,τά προτότυπα εύρήματα αυτής τής έργασίας είναι τά παρακάτω:

- 1) 'Αντίδραση μετατροπής του πυροσταφυλικού σέ γαλακτικό μέ συνένζυμο NADH καί αναστολείς τό όξαλικό όξύ,τό μυρμηκικό όξύ καί τό  $HgCl_2$ . 'Η αντίδραση καταγράφηκε σά συνάρτηση  $v = \varphi(I)$  για όλες τις συγκεντρώσεις τών αντιδραστηρίων (υποστρώματος-αναστολέα),πού χρησιμοποιήθηκαν.
- 2) Οί διάφορες συναρτήσεις  $v = \varphi(I)$ ,πού πήραμε άπό τά πειράματα παρουσιάζουν μιá νέα μορφή.Δέν είναι άπλές υπερβολές,άλλά αποτελοϋνται άπό επί μέρους υπερβολές-ή μιá συνέχεια τής άλλης-τόσες όσες καί οί υπομονάδες του ένζυμου.



- 3) Από τή μορφή τους οί συναρτήσεις (καμπύλες)  $v = \varphi(I)$  δέν εἶναι δυνατό νά περιγραφούν μέ τίς σχέσεις, πού μέχρι τώρα χρησιμοποιούνταν. Γι' αὐτό φιάξαμε νέες σχέσεις (κανές νά περιγράψουν τίς καμπύλες τῶν πειραμάτων αὐτῆς τῆς ἐργασίας.
- 4) Γιά νά καταστρωθοῦν οί νέες μαθηματικές σχέσεις, πού θά μπορούσαν νά περιγράψουν τίς πειραματικές μας καμπύλες, χρησιμοποιήθηκαν οί μέχρι τώρα μαθηματικές σχέσεις, πού δόθηκαν γιά νά ἐξηγήσουν τή συμπεριφορά τοῦ μοντέλου K.N.F. Αὐτές ἐπεξεργάστηκαν μέ βάση τίς μέχρι τώρα τιμές τῶν διαφόρων παραμέτρων τῶν πειραμάτων, τῶν θεωριῶν γιά τό "γενικευμένο μοντέλο" τῶν K.N.F. καί τῶν πειραμάτων μας. Μέ ἀπλές μαθηματικές σχέσεις καταλήξαμε σέ σχέσεις (συναρτήσεις) τέτοιες, πού νά περιγράψουν μέ σαφήνεια τό φαινόμενο (τήν ὀξειδοαναγωγική ἀντίδραση τῆς μετατροπῆς τοῦ πυροσταφυλικοῦ σέ γαλακτικό σέ ἐνζυμικό σύστημα Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης) ἔτσι ὅπως, μέ λεπτομέρεια παρουσιάζεται ἀπό τά πειράματά μας.
- 5) Αὐτά ὁδηγοῦν στή διαμόρφωση μιᾶς νέας ἰδέας γιά τή συμπεριφορά τῆς Γαλακτικῆς Ἀφυδρογονάσης καί γενικότερα κάθε ἀλλοστερικοῦ ἐνζυμοῦ, ὅταν ἡ δράση του ἀναστέλλεται ἀπό μή εἰδικούς ἀναστολεῖς. Ἔχουν, ἐπίσης, πρακτική ἀξία διότι μέ τή νέα αὐτή μορφή τῶν καμπυλῶν μποροῦν νά μετρηθοῦν ἐπί μέρους "μικροσκοπικές σταθερές" διαστάσεως, ταχύτητας, κ.ἄ. τῶν ἐνζυμικῶν ὑπομονάδων, κάτι, πού δέν εἶναι δυνατό νά γίνει μέ τίς μορφές τῶν καμπυλῶν, ὅπως σχεδιάζονταν μέχρι τώρα.



## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Καπούλας Β.Μ., θέματα Βιοχημείας-Χημεία του Πρωτοπλάσματος  
σελ. 157 (1973)
- 2) Appela E. and Markert C.L., Biochem. Biophys. Res. Commun.  
6 , 171 (1961)
- 3) Blanco A. and Zingham W.H., Science 139 ; 601 (1963)
- 4) Zingham W.H., Blanco A. and Kupchy K.L., Science  
142 , 1303 (1963)
- 5) Costello L.A. and Kaplan N.O., Biochim. Biophys. Acta  
73 , 658 (1963)
- 6) Fritz R.J. and Jacobson K.B., Biochemistry, 4 , 282 (1965)
- 7) Stamboygh R. and Buckley J., J. of Biol. Chem., 242 , 4053 (1967)
- 8) Meyerhoff O., Arch ges. Physiol., 175 , 20 (1919)
- 9) Szent-Györgyi A., Biochem. Z., 157 , 50 (1925)
- 10) Banga J., Szent-Györgyi A., Vargha L.Z.,  
Physiol. Chem., 210 , 228 (1932)
- 11) Straub F.B., Biochem J., 34 , 383 (1940)
- 12) Neilands J.B., Methods in Engymology, 1 , 449 (1955)
- 13) Neilands J.B., Science, 115 , 143 (1952)
- 14) Neilands J.B., J. Biol. Chem., 199 , 373 (1952)
- 15) Meister A. , J. Biol. Chem., 184 , 117 (1950)
- 16) Hakala M.T. and Schwert G.W., Arch. Biochem. and Biophys.  
38 , 55 (1952)
- 17) Gibson D.M., Davisson E.O., Bachhawat B.K., Ray B.R. and  
Vestling C.S., J. Biol. Chem.,  
203 , 397 (1953)





- 18) Adams M.J. et al , J.Mol.Biol., 41 , 159 (1969)
- 19) Leberman R.,Smiley J.E.,Hess D.J.,Rossmann M.G.,  
46 , 217 (1969)
- 20) Hess D.J.and Rupley, Annual Review of Biochem.,  
40 , 1035 (1971)
- 21) Adams M.J.,Mc Pherson A.Jr.,Rossmann M.G.,Schwert R.W.,  
Wonacott A.J., J.Mol.Biol.,  
51 , 31 (1970)
- 22) Mc Pherson A.Jr., J.Mol.Biol., 51 , 39 (1970)
- 23) Hathaway G.,Criddle R.S., Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.  
56 , 680 (1966)
- 24) Criddle R.S.,Mc Murrey C.H.,Gutfreund A., Nature,  
220 , 1091 (1968)
- 25) Gutfreund A.,Cantwell R.,Mc Murrey C.H.,Criddle R.S.,  
Hathaway G., Biochem.J., 106 ,683 (1968)
- 26) Adams M.J.,et al., Nature , 227 , 1098 (1970)
- 27) Neilands J.B., J.Biol.Chem., 208 , 225 (1954)
- 28) Hakala M.T.,Glaid A.J.,Schwert G.W., Federation Proc.,  
12 , 213 (1953)
- 29) Hakala M.T.,Glaid A.J.,Schwert G.W., J.Biol.Chem.,  
221 , 191 (1956)
- 30) Lineweaver H.,Burk D., J.Am.Chem.Soc., 56 , 658 (1934)
- 31) Takenaka V.,Schwert G.W., J.Biol.Chem., 223 , 157 (1956)
- 32) Alberty R.A., J.Am.Chem.Soc., 75 , 1928 (1953)
- 33) Novoa W.B.,Winer A.D.,Glaid A.J.,Schwert G.W., J.Biol.Chem.,  
234 , 1143 (1958)
- 34) Kirtley M.E.,Koshland D.E.Jr., J.Biol.Chem.,  
242 , 4192 (1967)



- 35) Monod J., Wyman J. and Changeux J.P., J.Mol.Biol. 12, 88 (1965)
- 36) Grizolia S., Physiol.Rev., 44 , 657 (1964)
- 37) Koshland D.E.Jr., Nemethy G. and Filmer D.,  
Biochemistry , 5 , 365 (1968)
- 38) Pauling L., Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 21 , 186 (1935)
- 39) Michaelis L. and Menten M., Biochem.Z., 49 , 333 (1913)
- 40) Winer A.D., Schwert G.W., J.Biol.Chem., 231 , 1065 (1958)
- 41) Γ.Κωνσταντόπουλος , Διατριβή επί Διδακτορία , ΑΘΗΝΑΙ 1966  
μέ τίτλο "Συμβολή εις τήν διά νέας απλής  
φωτομετρικής μεθόδου μελέτη του  
καθορισμού τών τύπων τών άπτοσφαιρινών  
του πλάσματος".

