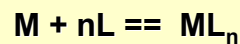


Kooperativní efekty

- kooperativita - interakce biomakromolekuly (obvykle tvořené z podjednotek) se 2 a více ligandy
- vazba prvního ligandu usnadní (znesnadní) vazbu dalšího ligandu - pozitivní (negativní) kooperativita
- 1910 - objevil Hill pozitivní kooperativitu při vazbě kyslíku na hemoglobin
- alosterie - vlastnost biomolekuly změnit strukturu při vazbě ligandu do nesubstrátového místa

Hillova rovnice



$$K = \frac{[M][L]^n}{[ML_n]}$$

- frakční saturace Y :

$$Y = \frac{[ML_n]}{[ML_n] + [M]} = \frac{1}{1 + \frac{[M]}{[ML_n]}} = \frac{1}{1 + \frac{K}{[L]^n}} = \frac{[L]^n}{K + [L]^n}$$

upravit:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[L]^n}{K}$$

a log:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log[L] - \log K$$

- **Hillův graf** ... výnos $\log[Y/(1-Y)]$ proti $\log[L]$
- jeho směrnice ... **Hillův koeficient** n_H
- **pozitivní** kooperativita ... $n_H > 1$ (max. hodnota koeficientu udává minimální počet interagujících podjednotek n) (n a n_H jsou různé pojmy!)
- **negativní** kooperativita ... $n_H < 1$

Rozšíření teorie na enzymy

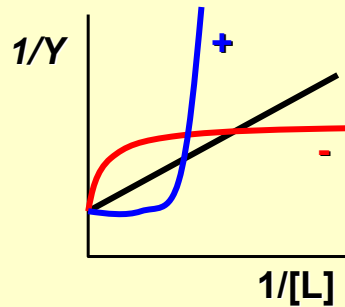
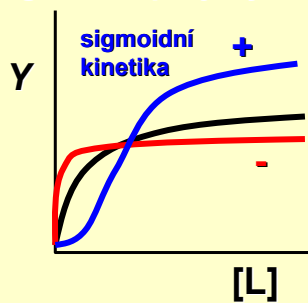
$$K = \frac{[E][S]^n}{[ES_n]}$$

- 1963 Monod: $E + nS \rightleftharpoons ES_n$
studium kinetiky na základě počáteční rychlosti enzymové reakce

$$Y = \frac{[ES_n]}{[E]_0} = \frac{v}{V_{\max}}$$

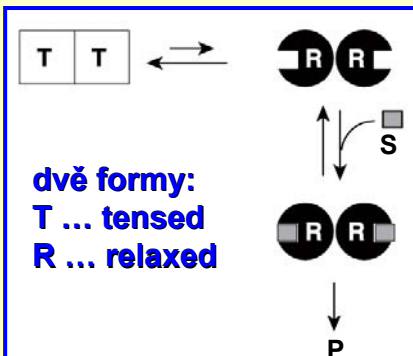
$$\log\left(\frac{v}{V_{\max} - v}\right) = n \log[S] - \log K$$

- grafické projevy:



MWN model (Monod, Wyman, Changeaux)

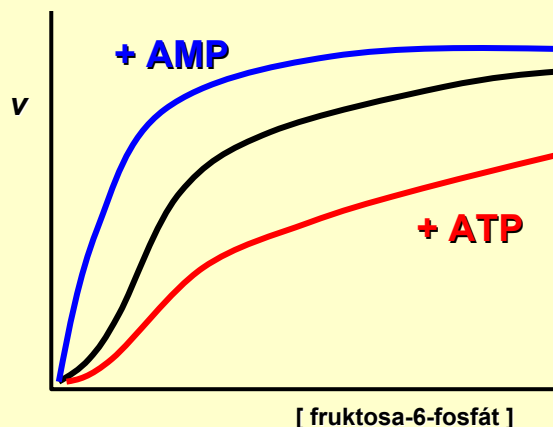
- každá podjednotka enzymu má buď vysokou (R) nebo nízkou (T) afinitu k substrátu
- v molekule enzymu mají vždy všechny podjednotky stejnou konformaci (všechny v T, nebo všechny v R)
- bez substrátu převládá T, přejde-li v přítomnosti substrátu jedna z nich na R, tak se stanou všechny R
- přechody mezi T a R stavy mohou způsobit i jiné efektorové molekuly:



- alosterický inhibitor
- aktivátor (heterotropní)

Příklad alosterie - fosfofruktokinasa

- fruktosa-6-fosfát + ATP \rightleftharpoons fruktosa-1,6-bisfosfát + ADP
- alosterický aktivátor - AMP
- alosterický inhibitor - ATP
- ukázka přímého výnosu reakční rychlosti:



Analýza pomocí Scatchardova výnosu

- enzym **M** tvořen z n podjednotek **m** (tj. $M \sim m_n$), každá m má 1 vazebné místo pro ligand **L** (substrát, inhibitor, aktivátor, ...)
- probíhá postupná interakce s ligandem:
 $m_n + L \rightleftharpoons m_nL$ $m_nL + L \rightleftharpoons m_nL_2$... $m_nL_{n-1} + L \rightleftharpoons m_nL_n$
- experimentální studium:
 - směs volného enzymu (výchozí koncentrace $[E]_0$) a volného ligandu ($[L]_0$)
 - nechá se ustavit rovnováha a určí se koncentrace volného ligandu $[L]$
 - koncentrace vázaného ligandu je pak $[L]_v = [L]_0 - [L]$
 - koncentrace zbylých volných vazebných míst za rovnováhy:
 $[m] = [m]_0 - [L]_v = n[M]_0 - [L]_v$
- **průměrný rozsah vazby r** (platí: $0 < r < n$), je to vlastně podíl koncentrace obsazených vazebných míst a celkové koncentrace enzymu, tj. $r = [L]_v/[M]_0$

Vazebná místa v M se neovlivňují

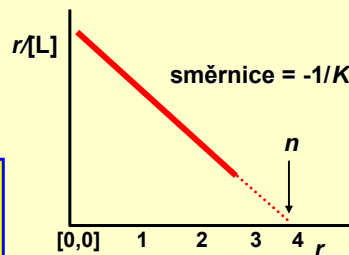
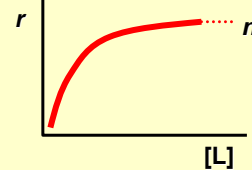
- Ize uvažovat jedinou rovnováhu:
 $m + L \rightleftharpoons mL$ a příslušnou disoc. konstantu:
- Ize upravit pomocí předchozích definovaných koncentrací aj.:

$$K = \frac{[m][L]}{[mL]}$$

$$K = \frac{(n[M]_0 - [L]_v)}{[L]_v} [L] = \left(\frac{n}{r} - 1 \right) [L]$$

$$r = \frac{n[L]}{K + [L]}$$

- dále Ize modifikovat do tvaru analogického saturační kinetice enzymové reakce:
- vyhodnocují se linearizací dle Scatcharda:

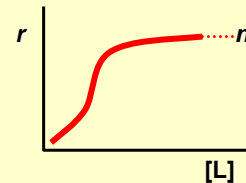
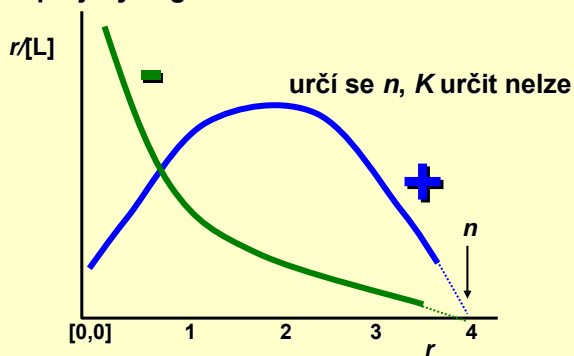


$$\frac{r}{[L]} = -\frac{1}{K} r + \frac{n}{K}$$

výsledek:
počet podjednotek n
disociační konstanta K

Vazebná místa se ovlivňují

- projevy: sigmoidní kinetika



vyhodnocení - použije se Hillova rovnice
upraví se na tvar: zlogaritmuje:

$$r = \frac{n[L]^{n_H}}{(\alpha K) + [L]^{n_H}}$$

$$\frac{r}{n-r} = \frac{[L]^{n_H}}{(\alpha K)}$$

$$\log\left(\frac{r}{n-r}\right) = n_H \log[L] - \log K$$

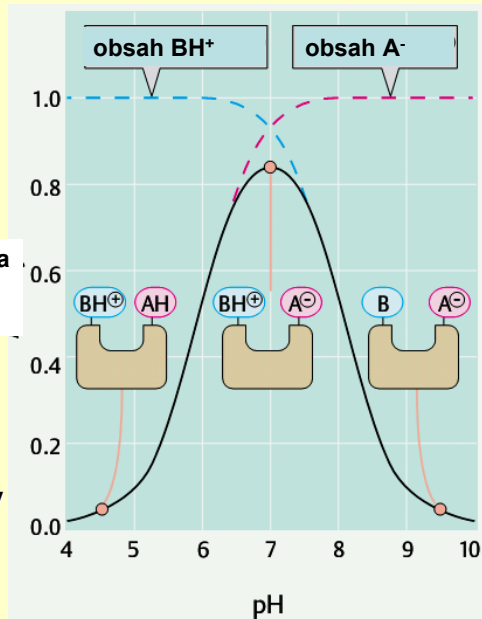
Vliv pH na aktivitu

- důvod: disociace skupin účastnících se enzymové reakce

kombinace disociačních závislostí pak určuje konečný vliv na aktivitu

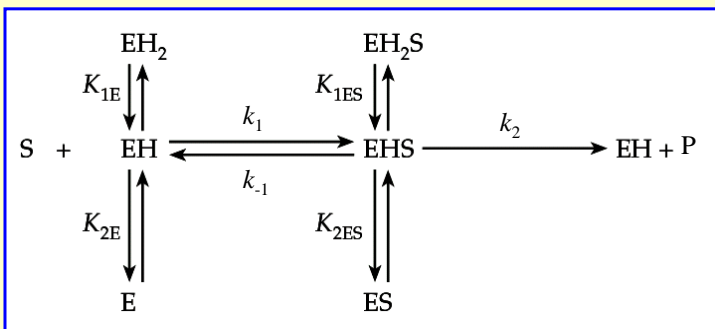
interpretace na úrovni kinetiky pomocí vlivu na parametry K_m a V_{max}

aktivita



Vliv pH na enzymovou reakci

- molekuly enzymu, substrátu i komplexu enzym-substrát obsahují disociující skupiny
- ve vodném prostředí za daného pH vystupují jako různé formy lišící se množstvím vázaných protonů (např. enzym je přítomen ve formách EH_2 , EH a E)
- ze všech daných forem však pouze jedna forma substrátu reaguje s jednou formou enzymu (zde EH) za vzniku komplexu enzym-substrát
- pouze jedna z forem komplexu (zde EHS) pak reaguje na produkt



- podíl žádané formy (např. EH) lze vyjádřit jako:

$$f_{EH} = \frac{[EH]}{[E] + [EH] + [EH_2]} = \frac{1}{\frac{[E]}{[EH]} + 1 + \frac{[EH_2]}{[EH]}} = \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_{1E}} + 1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]}}$$

- obdobný vztah platí i pro EHS a nebo pro substrát, pokud disocijuje
- po zlogaritmování lze pak uvažovat krajní hodnoty výsledného výrazu pro různé meze pH:

$$\log f_{EH} = -\log \left(\frac{[H^+]}{K_{1E}} + 1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]} \right)$$

$= \text{pH} - \log K_{1E}$ pH nízké
 ≈ 0 pH kolem 7
 $= -\text{pH} + \log K_{2E}$ pH vysoké

- lze dále odvodit, že:

$$V'_{\max} = V_{\max} f_{EHS}$$

$$K'_m = K_m \frac{f_{EHS}}{f_{EH}}$$

- a dále po zlogaritmování: $\log V'_{\max} = \log V_{\max} + \log f_{EHS}$

pX = -logX)

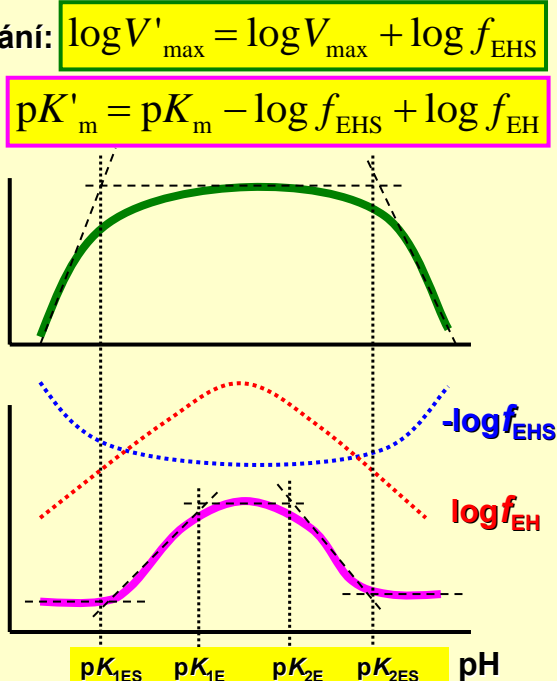
- lze interpretovat závislosti obou parametrů na pH

$\log V'_{\max}$

- aproximací závislosti pak lze určit hodnoty pK disociujících skupin

- informace o aktivním místě enzymu

$\text{p}K'_m$

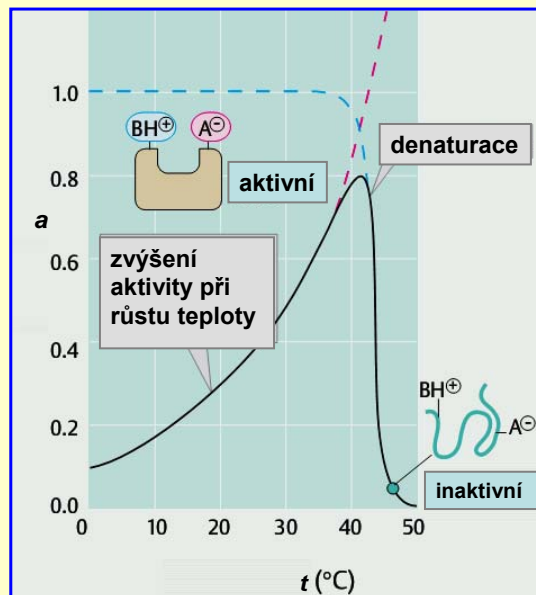


Interpretace

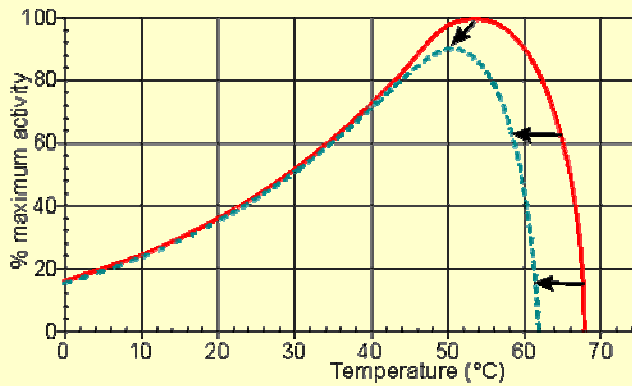
- nalezené hodnoty pK pro skupiny v aktivním místě se porovnají s tabelovanými rozsahy pK pro známé aminokyseliny
- při shodě lze usuzovat, že v aktivním místě se vyskytuje daná aminokyselina
- praktický význam zjištění pH optima - nalezení nejvhodnějších podmínek pro enzymovou reakci - dosažení nejvyššího výtěžku

Vliv teploty na enzymovou reakci

- obecně chemické reakce běží rychleji při zvýšení teploty
- na druhou stranu biomolekuly při vyšší teplotě ztrácí aktivní konformaci a denaturují (náhodná struktura klubka)
- výsledkem je existence individuálního teplotního optima pro každý enzym

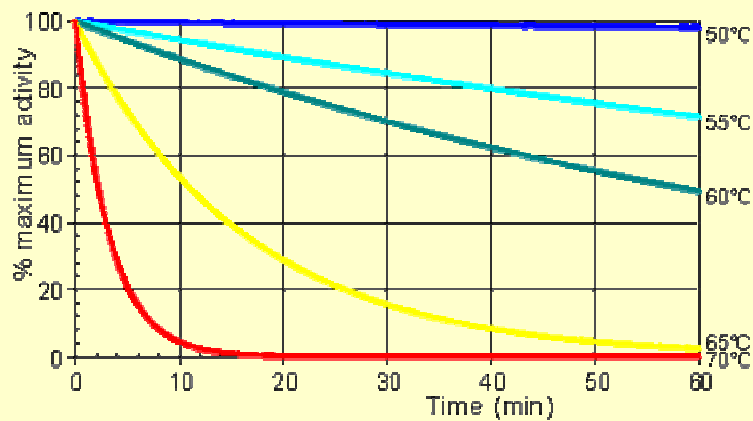


Vliv doby inkubace



- **kratší inkubační čas** při enz. reakci vede k posunu teplotního optima k vyšším teplotám
- **delší čas inkubace** za dané teploty má opačný vliv

Vliv teploty na stabilitu



- při vyšší teplotě ztrácí enzym aktivitu mnohem rychleji
- pokles je velmi strmý v důsledku rel. vysoké ΔG 200 až 300 kJ/mol, takže po překročení kritické teploty je denaturace velmi rychlá

Vliv teploty na kin. konstanty

- kinetické rychlostní konstanty
- Arrheniova rovnice:

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

- rovnovážné konstanty
- van't Hoffova rovnice:

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + \Delta S$$

- často v alternativním tvaru:

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = \Delta H \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

Praktické aspekty

- enzymy uchováváme v chladu
- dlouhodobě zmražené, vyvarovat se opakovanému zmražování a rozmražování
- přidat kryoprotektivní činidla (glycerol, polyoly - manitol)
- přesné (1%) měření rychlosti vyžaduje teplotu lepší než 0.1 °C
- teplotní kvocient Q_{10} - kolikrát se zvýší reakční rychlost, jestliže teplota vzroste o 10 °C (obvykle kolem 2)