

VÝZNAM NEKOVALENTNÍCH INTERAKCÍ V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMECH

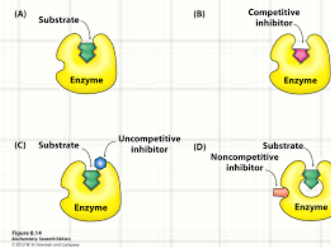
Iveta Třísková

Biologické jevy závislé na nekovalentních interakcích

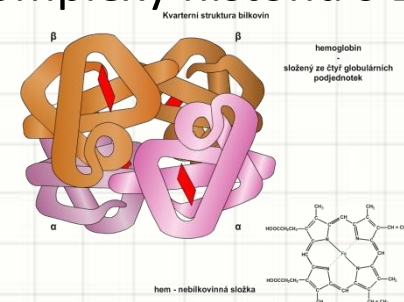
- 1) **biopolymery** (bílkoviny, nukleové kyseliny) – základní strukturní i funkční aparát biologických systémů – lineární polymery tvořené stavebními jednotkami (AMK, nukleotidy) svinuty do trojrozměrného tvaru – tzv. **nativní struktura** - o svinutí lineárního řetězce do správné podoby rozhodují slabé meziatomové interakce **nekovalentní** povahy (intramolekulární, intermolekulární)
- 2) **přenos informace**:
 - a) **přenos genetické informace** ve směru DNA → RNA → protein, kdy rozhodující roli hraje párování komplementárních bází prostřednictvím vodíkových vazeb
 - b) **přenos informace mezi buňkami** pomocí hormonů a neurotransmiterů, které se komplexem nekovalentních interakcí váží na receptorové struktury
 - c) **chemická komunikace mezi organismy**
 - d) **imunita**

Biologické jevy závislé na nekovalentních interakcích

- 3) **enzymová katalýza** – vazba substrátu do aktivního místa enzymu, jeho správné umístění ve vztahu ke katalytickým skupinám a sled konformačních změn v molekule enzymu podmíněny souborem nekovalentních interakcí mezi enzymem a substrátem



- 4) na nekovalentních interakcích založeny i všechny biologické děje, jejichž podstatou je **vznik nadmolekulárních útvarů** (kvarterní struktura bílkovin, multienzymové jednotky, nukleosomové komplexy histonů s DNA, ribosomy, lipoproteinové částice, biomembrány)



Proč nekovalentní interakce?

- ✓ Vznik a rozštěpení kovalentních vazeb (vysoká vazebná energie či vysoké aktivační energie rozpadu) – **IREVERSIBILNÍ** děje
- ✓ Pro biologické děje je nutné, aby intramolekulární či intermolekulární interakce zůstaly **REVERSIBILNÍ**

PROČ?

- ❖ vnitřní dynamika molekul biopolymerů
- ❖ oddělování a spojování vazebných míst při přenosu informace
- ❖ oddělení molekuly z vazebného místa enzymu
- ❖ u nadmolekulových útvarů korelace mezi pevností vazeb a biologickou funkcí

Typy nekovalentních interakcí v živých systémech

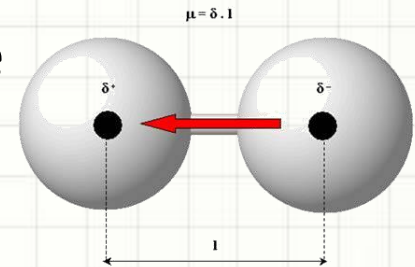
Typ interakce	Příklad	Vazebná energie* (kJ/mol)
Vodíkové vazby: voda (led)	-O- H...O=	17
Peptidové vazby	=N H...O=C	15
Mezi neutrální a nabitou skupinou	-COO ⁻ ...HO -CH ₂	15
Elektrostatické interakce** ion-ion	-COO ⁻ ... ⁺ H ₃ N-	20-30
Interakce dvou permanentních dipólů	$\begin{array}{c} \\ \text{C}^{\delta+} = \text{O}^{\delta-} \dots \text{C}^{\delta+} = \text{O}^{\delta-} \\ \qquad \qquad \qquad \end{array}$	2
Londonovy disperzní inetrakce	Mezi dvěma alifatickými atomy C	0,11
Patrové interakce	Mezi dvěma aromatickými kruhy Phe	6
Hydrofobní interakce	Mezi dvěma methylovými skupinami	1,2
	Mezi dvěma postranními řetězci valinu	6

*Pro srovnání, střední hodnota energie vazby C-H v molekule methanu je 416 kJ·mol⁻¹

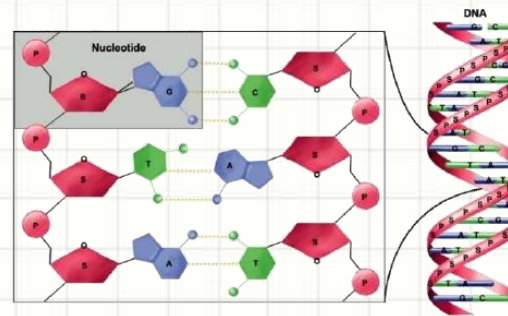
** Pro prostředí s hodnotou relativní permitivity 4, pibližně odpovídající nepolárnímu prostředí uvnitř bílkovinné globule

Rozdělení a charakterizace nekovalentních interakcí

- Elektrostatické (coulombické) interakce



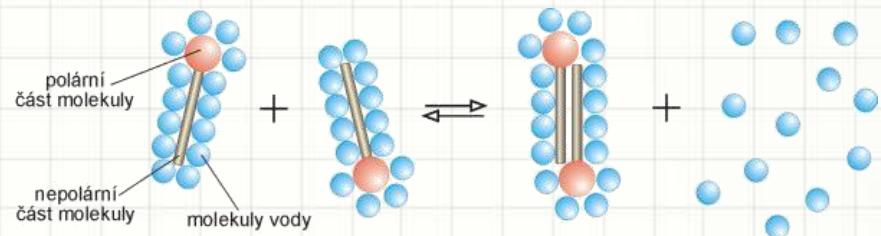
- Vodíkové vazby



párování bázi: G-C a A-T

- Van der Waalsovy interakce

- Hydrofobní interakce



Elektrostatické interakce

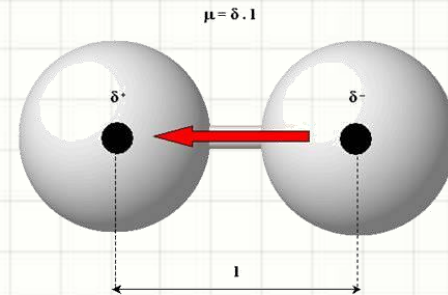
- Interakce, které se řídí Coulombovým zákonem

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \cdot \frac{q_1q_2}{r^2}$$

ϵ_0 : permitivita vakua ($8,854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)

ϵ : relativní permitivita prostředí

- Dvě podskupiny: jak ovlivňují stabilitu terciární struktury bílkovin
 - *Klasické (nespecifické) elektrostatické interakce*
 - *Specifické elektrostatické interakce*



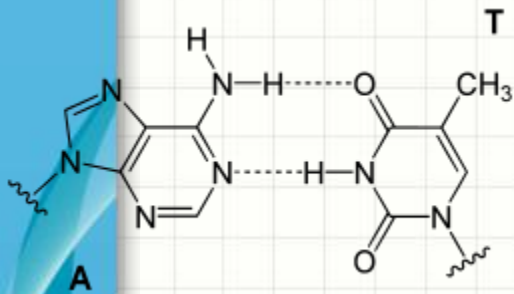
Klasické (nespecifické) elektrostatické interakce

- **Bílkovina** - polyelektrolyt nesoucí ve svém řetězci nabitě funkční skupiny, jejichž náboj závisí na pH; vliv náboje se projeví v extrémních hodnotách pH – v molekule převažují kladné náboje (kyselá oblast) nebo záporné (zásaditá) oblast – **elektrostatické odpuzování**; tento efekt mizí pouze v okolí isoelektrického pH
- s klesajícím nebo rostoucím pH destabilizující vliv na nativní bílkovinu (ve sbalené struktuře se zvyšuje hustota náboje jednoho znaménka) → dochází k rozbalení nativní struktury v silně kyselé nebo zásadité oblasti – souhlasně nabitě skupiny se od sebe vzdálí

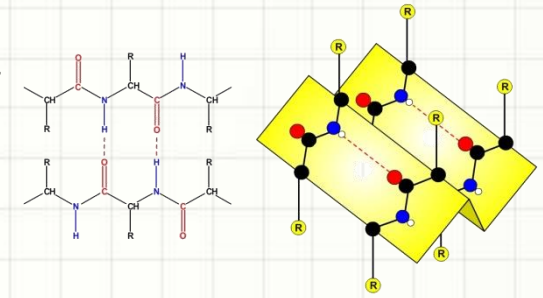


Specifické elektrostatické interakce

- Iontové páry (solné můstky)
- opačně nabitě skupiny v sousedství → **elektrostatické interakce** → výsledná elektrostatická síla má stabilizující vliv na nativní strukturu bílkoviny
- **solný můstek** má ještě další význam – elektrochemie – vodivé spojení dvou poločlánků pomocí nasyceného roztoku elektrolytu



Vodíkové vazby



- **klasický model:** slabě kyselý donor D-H interaguje prostřednictvím atomu vodíku s volným elektronovým párem akceptoru A → uspořádání D-H...A; obvykle lineární, ale existuje i pojem ohnutá vodíková vazba – není rigidní struktura
- nejdůležitější biogenní atomy schopné podílet se na vodíkové vazbě: O, N a S
- vodíkové vazby ovlivňují strukturu vody
- Význam vodíkových vazeb pro strukturu a stabilitu bílkovin:
- 1) **intramolekulární vodíkové vazby:** zpevňující detaily sekundárních struktur, helixů nebo skládaných listů
- 2) **intermolekulární vodíkové vazby** s okolními molekulami vody

Intermolekulární vodíkové vazby

- molekula vody má zde výjimečnou schopnost poskytnout dva atomy vodíku a dva volné elektronové páry atomu kyslíku – donory (resp. akceptory) pro vodíkové vazby
- tvorba vodíkových vazeb s nativní molekulou bílkoviny i její rozbalenou formou (stabilizace proti sbalení)

Vodíkové vazby

- nejsou dominantními pro stabilizaci molekuly bílkoviny; naopak významnější pro denaturovanou (rozbalenou) formu
- po vytvoření trojrozměrné nativní struktury (pro vodu nepropustné) – stabilizující vliv vodíkové vazby
- vliv rozpouštědla na vodíkové vazby v molekule bílkoviny: záleží na interakci přidané sloučeniny s bílkovinou: např. **kyselina mravenčí**: váže se na peptidovou vazbu, rozbalení řetězce
- **malé alifatické alkoholy** – podporují tvorbu helixu
- **alkoholová denaturace** - destabilizace molekuly jako celku; stabilizace pouze jejích helixů
 - vodíkové vazby nejsou dominantní při vzniku nativní struktury, ale jakmile se tato struktura vytvoří, přispívají k její stabilitě
 - **bílkoviny x NK** – u NK vodíkové vazby součástí rozpoznávacího mechanismu mezi bázemi

Van der Waalsovy interakce

- a) Interakce permanentní dipól – permanentní dipól

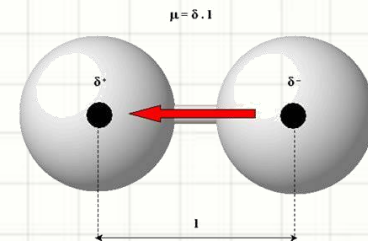
(interakce van der Waalsovy-Debyeovy)

- dipolární charakter molekul; v permanentním dipólu převažuje v jedné části molekuly (funkční skupiny) dílčí kladný náboj q_+ , na opačné části kompenzován stejně velkým dílčím záporným nábojem q_- .
- **dipólový moment:** $\mu = q \cdot l$ (1D – Debye); $1D = 3,3 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}^{-1}$
- Př. dipólový moment vody $\mu = 1,84 \text{ D}$, plynný chlorovodík $1,03 \text{ D}$
- orientace dvou dipólů navzájem opačnými konci k sobě – **interakce**
- energie interakce E_{d-d} dána vztahem:

$$E_{d-d} = - \frac{2 \mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^6}$$

μ_1, μ_2 : elektrické dipólové momenty; ϵ_0 : permitivita vakua; r : vzdálenost; k : Boltzmannova konstanta

- Četný výskyt těchto interakcí v biomolekulách



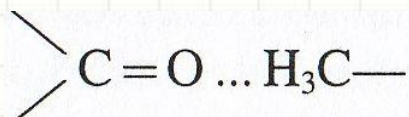
Van der Waalsovy interakce

- b) Interakce permanentní dipól – indukovaný dipól
(interakce van der Waalsovy – Keesomovy)
- podstatně slabší interakce, než interakce permanentní dipól – permanentní dipól
- Molekula, která je dipólem, indukuje dipól v jiné molekule
- Energie interakce E_{d-id} je poté dána vztahem:

$$E_{d-id} = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2 + \alpha_1 \mu_2^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6}$$

μ_1, μ_2 : elektrické dipólové momenty; ϵ_0 : permitivita vakua; r : vzdálenost; α : polarizovatelnost molekuly

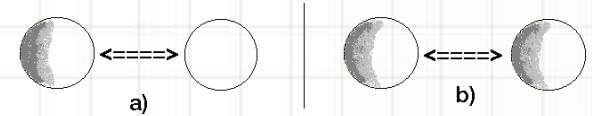
- Př. karbonylová skupina indukující dipól v methylové skupině. V ní je indukována převaha kladného náboje na vodících, záporného na atomu uhlíku



Van der Waalsovy interakce

- c) Londonovy disperzní interakce

(interakce van der Waalsovy – Londonovy)



- Nastává i tehdy pokud žádná z molekul není permanentním dipólem
- Disperzní energie $E_{disp.}$ je dána přibližným vztahem:

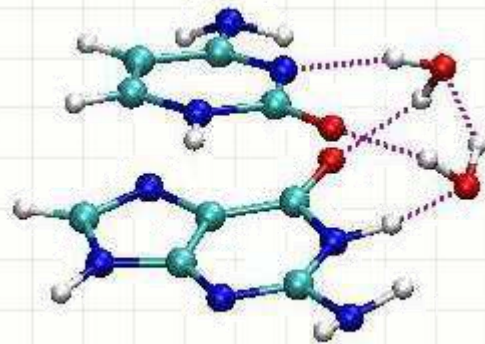
$$E_{disp.} \approx - \frac{3I_1I_2}{2(4\pi\epsilon_0)^2(I_1 + I_2)} \cdot \frac{\alpha_1\alpha_2}{r^6}$$

I_1, I_2 : ionizační energie molekuly; ϵ_0 : permitivita vakua;
 r : vzdálenost; α : polarizovatelnost molekuly

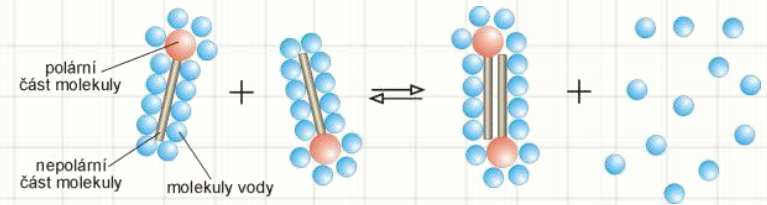
- Velmi slabé, zcela nespecifické interakce – při těsném přiblížení, k němuž dochází v jádrech bílkovinných struktur, může každý atom interagovat se svými nejbližšími „nekovalentními“ sousedy – obrovská četnost interakcí, nezanedbatelný vliv na stabilitu struktury bílkovin
- Značný podíl v interakcích bílkoviny se stericky komplementárními ligandy
- Př.: interakce v molekule bílkoviny – dvě methylové skupiny
-CH₃...H₃C- v daném postavení. Jedna z nich zde může mít dočasně převažující záporný náboj na uhlíku, druhá na vodících

Van der Waalsovy interakce

- d) $\pi - \pi$ interakce (patrové interakce)
- Vzájemná interakce π – elektronových systémů, které jsou lokalizovány nad i pod aromatickými kruhy
- Stabilizace dihelixů DNA i některých úseků RNA



Hydrofobní interakce



- Klíčový význam pro stabilitu bílkovinné molekuly
- Dnes stále předmětem výzkumu
- Podstata – jedním z partnerů v těchto interakcích je voda
- **Aminokyseliny (AMK) s hydrofobním postranním řetězcem :** fenylalanin, leucin...
- **AMK s hydrofilním postranním řetězcem:** kyselina glutamová, asparagová, lysin...
- Pokusy s jednoduchými sloučeninami – tendence hydrofobních sloučenin vytvářet ve vodě agregáty (snížení kontaktu s „nepřátelským“ rozpouštědlem, vytvoření termodynamicky stabilních struktur)
- Bílkoviny : hydrofobní AMK soustředěny uprostřed klubka (globule) – vytváří zde tzv. **hydrofobní jádro** („hydrophobic core“)

Co jsou hydrofobní interakce a jak jsou řízeny?

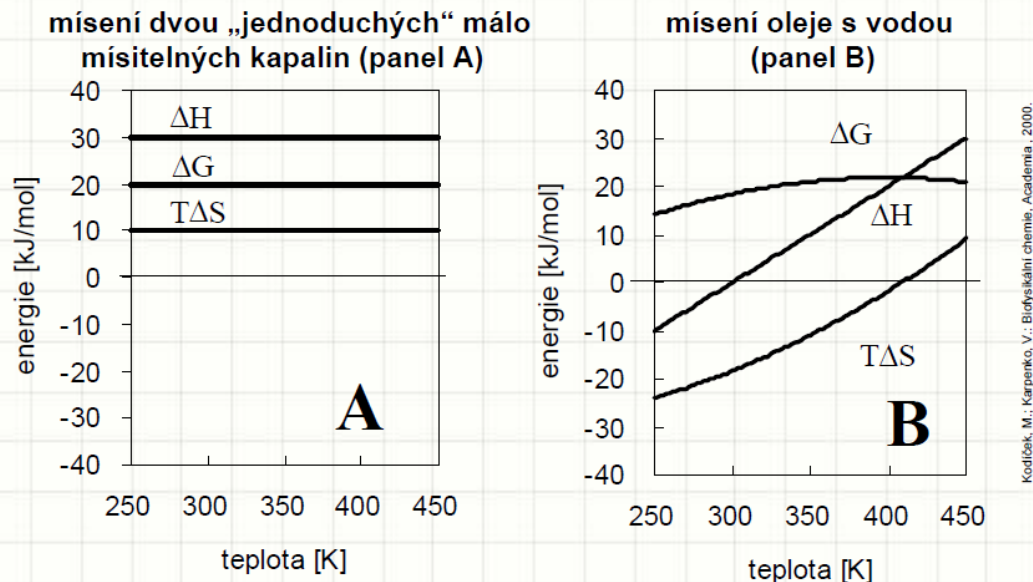
- Tři základní přístupy:
- 1) **hydrofobita** – přenos nepolární sloučeniny do vodného roztoku; hydrofobní je ta částice, která dává přednost nepolárnímu prostředí před vodným
- 2) **hydrofobita** – přenos nepolární sloučeniny do vodného prostředí pouze tehdy, pokud se přitom pozoruje charakteristická teplotní závislost termodynamických veličin
- 3) **hydrofobita** vztahována k určitým typům modelů, jejichž obecným rysem je vyšší uspořádanost molekul vody v okolí molekul rozpuštěné látky

Teplotní závislost hydrofobních interakcí – jak se liší od normálních roztoků?

- Vycházíme z formulace **ad 2)**
- Představa ideálního roztoku – kapalně složky A a B, při mísení A do B nedochází k výrazné změně struktury kapaliny B a energie interakce dvojic molekul A-A, A-B a B-B jsou stejné
- Většina systémů odlišná od ideálního chování: extrémní případ dvě nemísitelné kapaliny A a B - Gibbsova energie přenosu B do A ($\Delta G > 0$) má velký kladný enthalpický člen (ΔH) vyšší než entropický ($T \Delta S$) (je kladný vždy) – viz. obrázek A \rightarrow malá změna tepelné kapacity $c_p \rightarrow$ změna enthalpie a entropického členu nezávisí na teplotě; ani změna Gibbsovy energie na teplotě nezávisí.

Schematické znázornění

- ▶ charakteristickým rysem je velká hodnota Δc_p přenosu nepolární sloučeniny do vody



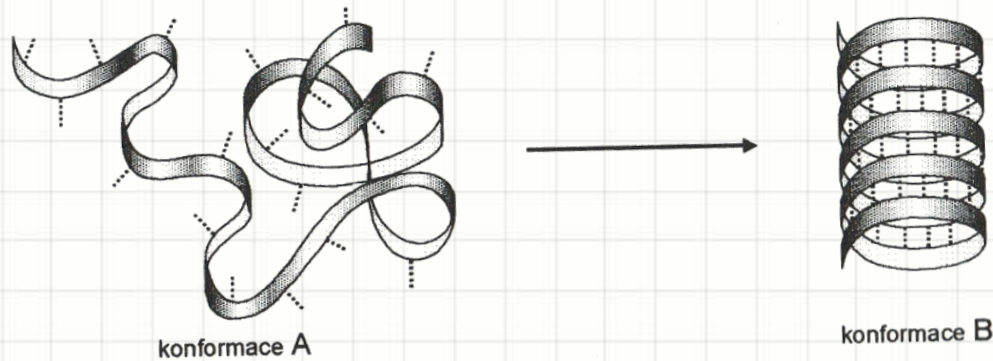
Schematické zobrazení teplotní závislosti energetických veličin pro mísení dvou jednoduchých málo mísitelných kapalin (panel A) a pro mísení oleje (nepolární sloučenina) s vodou (panel B)

Panel A: malá změna tepelné kapacity (Δc_p) \rightarrow změna enthalpie a entropického členu nezávisí na teplotě; ani změna Gibbsovy energie na teplotě nezávisí.

Panel B: velká a kladná změna tepelné kapacity \rightarrow závislost změn enthalpie a entropie na teplotě, hodnota ΔG se s teplotou mění nelineárně-prochází maximem a na obě strany klesá; při 140 °C (minimální rozpustnost nepolární látky ve vodě) – nejpozitivnější ΔG – největší hydrofobita

Hydrofobní interakce

- I polární skupiny (peptidová vazba) se mohou podílet na vzniku hydrofobní vazby



Poly $-L - Ala$ (viz. schéma)-homopolymer tvořen opakující se sekvencí $[(-NH - CH(CH_3) - CO -)]$, kde skupiny $>C=O$ a $>NH$ jsou partnery pro vznik vodíkových můstků (neuspořádaná konformace **A**). Může také vzniknout α - helikální struktura (konformace **B**), kde $>C=O$ a $>NH$ jsou vysyceny tvorbou intramolekulárních vodíkových můstků

Obecné znaky prostorového uspořádání biopolymerů

- Lineární řetězce biopolymerů s výjimkou mRNA, částečně zásobních polysacharidů uspořádány do unikátního prostorového tvaru, který podmiňuje jejich biologickou funkci
- Dva fenomény:
 - 1) biopolymery vybudovány z chirálních stavebních jednotek
 - 2) prostorové uspořádání molekul není určeno pouze geometrickým uspořádáním center, z nichž vycházejí jednotlivé kovalentní vazby . Jednoduché vazby se mohou volně otáčet a molekula zaujímá různé konformace

Zákonitosti prostorového uspořádání biopolymerů

- a) **prostorové uspořádání biopolymeru** zakódováno v jeho kovalentní struktuře – řetězec polymeru svinut tak, aby jeho konformační Gibbsova energie byla co nejmenší
- b) **hierarchické prostorové** uspořádání biopolymerních řetězců – sekundární, supersekundární, doménová, terciární, kvarterní a nadmolekulární struktura
- c) **prostorové uspořádání biopolymerů** závisí na interakcích s okolím:
 - 1) **hydrofobní interakce** (podstatná role pro energetiku svinování polymerů) závislé na struktuře a entropických vlastnostech rozpouštědla
 - 2) **hydratace povrchových struktur** biologických makromolekul ve vodných prostředích → komplexy hydrofilní skupina – voda (posunovány směrem k asociaci díky vysoké koncentraci vody)

Zákonitosti prostorového uspořádání biopolymerů

- d) **kooperativita struktury biopolymerů** – makromolekuly tvoří kompaktní vysoce stěsnané částice, které jsou svými povrchovými strukturami oddělené od okolí.
- **Průměrná kooperativita** – pravděpodobnost s jakou změní $(n+1)$ tý zbytek (amk, nukleotid) svou konformaci jako důsledek změny konformace zbytku n -tého
- Zcela nekooperativní systémy – nulová pravděpodobnost (náhodná změna konformací); naopak ideální krystal je struktura, která má při tání kooperativitu rovnu 1 (roztaje celý krystal)
- Molekuly biopolymerů (DNA a rozpustné bílkoviny) se blíží chování ideálního krystalu
- Významnou charakteristikou kooperativity je náhlá změna prostorového uspořádání (denaturace biopolymerů)
- e) **biopolymery jako konformačně – dynamické struktury** (molekulová dynamika): funkce makromolekul spojena se změnami jejich prostorového uspořádání – posuny podjednotek na úrovni kvarterní struktury (hemoglobin, allosterické enzymy); změny terciární struktury (jednoduché enzymy, receptory); silné konformační změny spojené s transkripcí nebo replikací DNA

Stabilita, svinování a denaturace biopolymerů

- ztráta nativní konformace biopolymeru pod vlivem denaturačního tlaku (zvýšení teploty; iontové síly; změna pH; přítomnost denaturačních činidel – močovina, guanidinydrochlorid) a přechod do jiné konformace
- **denaturace:** každá *podstatná změna prostorového uspořádání* biopolymeru, která vede ke ztrátě jeho *biologické aktivity*
- *1) Podstatná změna prostorového uspořádání:* vlivem denaturačního tlaku mění biopolymery svou konformaci; **ideální** fyzikálně – chemická **denaturace** (plně denaturovaný stav) – **tzv. neuspořádané (statistické) klubko** (random coil); vyloučení všech nekovalentních stabilizujících interakcí a stejně jsou pravděpodobné všechny konformace neodporující van der Waalovým prostorovým požadavkům pro jednotlivé atomy či skupiny; existence denaturovaných stavů, kde biopolymer nemá již nativní strukturu (nemůže plnit svou biologickou funkci), ale jeho struktura je do určité míry stabilizovaná → **neúplně denaturované stavy**
- 2) Nevratné změny kovalentní struktury vyvolané UV zářením, fotooxidací, chemickou modifikací – nejsou zahrnuty do kategorie fyzikálně-chemické denaturace, ale jsou příčinou ztráty biologických funkcí

Stabilita, svinování a denaturace biopolymerů

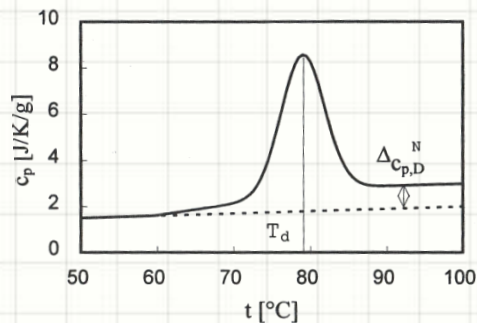
- 3) Ztráta biologické aktivity: konformační změny spojené s rozpletením DNA při replikaci nebo transkripci; vazba nekompetitivního inhibitoru na enzym (**nelze mluvit o denaturaci**)
- přechod mezi nativním a denaturovaným stavem biopolymeru lze v důsledku kooperativity popsat rovnováhou: $N \leftrightarrow D$, charakterisovanou rovnovážnou konstantou K_D dle vztahu:
$$K_D = \frac{[D]}{[N]}$$
- denaturační dvoustavový přechod výsledkem souhry protichůdných stabilizujících a destabilizujících stavů
- **stabilizující:** všechny typy nekovalentních interakcí, van der Waalsovy a vodíkové vazby
- **destabilizující:** růst entropie v důsledku poklesu neuspořádanosti molekuly bílkoviny jako celku; se vznikem náhodně svinutého řetězce roste počet možných konformací; hydratační obal v okolí nepolárních skupin
- denaturační přechod biopolymerů $N \leftrightarrow D$ dobře experimentálně přístupný (cirkulární dichroismus, fluorescence, absorpční spektrofotometrie, viskozimetrie)

Svinování bílkoviny

- **C. Levinthal** – pokus o prokázání, že svinování není náhodný proces; předpoklad, že v proteinu s n AMK má každý z $2n$ torzních úhlů 3 možné stabilní konformace – protein (peptidový řetězec) má 10^n možných konformerů
- Ve skutečnosti: mnohem více konformerů, neboť Levinthalova úvaha pomíjí postranní řetězce
- Př.: *Kdyby bílkovina o 100 AMK zkoušela při svém vzniku všechny možné konformace rychlostí 10^{13} konformací/sec, pak by všechny dostupné možnosti byly otestovány za 10^{87} sec. Stáří vesmíru je však pouze cca $6 \cdot 10^{17}$ sec. → **Levinthalův paradox** → konformace vzniká cíleně ve více krocích*
- Na počátku vznik krátkých periodických segmentů (α -helixy, β -struktury) (8-15 AMK, v rychlém sledu vznikají a zase zanikají); zůstávají pouze ty úseky se strukturou podobnou nativní, a kolem nich se peptidový řetězec formuje do konečné podoby
- Bílkoviny s doménovou strukturou procházejí po spojení více domén, podobou „roztavené globule“ („molten globule“) (hydrofobní postranní řetězce jsou v kontaktu s rozpouštědlem)
- Následují malé konformační změny → nativní struktura

Kalorimetrie bílkovin

- Energetická bilance nekovalentních interakcí
- Kalorimetrie – jediná experimentální technika umožňující získat přímo termodynamická data
- Teplotní (tepelná) denaturace bílkovin – nejběžnější biofyzikálně – chemické měření (jasná souvislost mezi enthalpií a teplotou)
- Informaci o energetické podstatě struktury bílkoviny lze získat pouhou změnou teploty dle vztahu: $c_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p$ **Definice tepelné kapacity při konstantním tlaku**
- **Diferenciální skenovací mikrokolorimetrie** (differential scanning microcalorimeters, DSM) – eliminace vlivu tepelné kapacity rozpouštědla



Záznam DSM (závislost specifické tepelné kapacity při konstantním tlaku) lysozymu z vaječného bílku při pH 4,5

Diferenciální mikrok calorimetr

- Dvě identické cely (Au kapiláry) – při měření se jedna cela naplní roztokem bílkoviny, druhá stejným objemem použitého rozpouštědla; kontinuální zahřívání na stejnou teplotu
- Mikrok calorimetry poskytují údaje o rozdílu tepelných kapacit obou cel vzhledem ke standardu (použité rozpouštědlo)

Provedení experimentu DSM

- 1) dokonale stejný objem roztoků; chyba v náplni kalorimetrických cel nesmí přesáhnout 10^{-6} ml; nepřítomnost bublinek plynu (měření při přetlaku dusíku)
- 2) zředěné roztoky bílkovin (eliminace interakcí mezi molekulami bílkovin)
- 3) volba pufru: vhodné jsou takové pufrы, jejichž disociační tepla jsou co nejmenší, aby příliš neovlivňovala naměřené hodnoty ΔH
- 4) bílkovina musí být v daném rozpouštědle rozpustná v celém zkoumaném teplotním rozsahu; přechody bílkoviny mezi různými konformačními stavy vyvolané rostoucí teplotou by měly být reversibilní – nejlépe malé bílkoviny s molekulovou hmotností do 40 kDa s jednou doménou
- 5) v těchto kalorimetrech nelze dosáhnout dokonalou tepelnou rovnováhu; roztok není možné míchat – problém – roztok bílkoviny má vyšší viskozitu než voda a mechanickým mícháním by vznikalo nekontrolovatelné množství Jouleova tepla, které by mohlo přesáhnout naměřený tepelný efekt
- 6) kontinuální měření tepelné kapacity
- 7) výhodou kapilární cely: teplotu lze po dosažení zvolené hodnoty opět definovaně snižovat – je možné zabývat se reversibilitou denaturačního přechodu
- Metoda přináší dobré výsledky i při studiu tepelné stability nukleových kyselin (ostrý denaturační přechod)

Interakce bílkovin s ligandy

- Molekula bílkoviny na sebe většinou dočasně a více či méně specificky váže ligandy (enzym substráty a efekторы; receptor agonisty; transportní bílkoviny přenášené látky)
- Nevytváří se kovalentní vazba bílkovina – ligand (vratná vazba)
- Ligand – molekula nebo ion, pro kterou je na molekule bílkoviny vhodné vazebné centrum; nejjednodušší ligandy – ionty H^+ a OH^- (velmi specifická interakce s bílkovinou → jednoznačně definované disociovatelné funkční skupiny); vysoce specifická interakce enzym – substrát
- typické ligandy – malé anorganické ionty, které mohou elektrostaticky interagovat s jakoukoli opačně nabitou skupinou v molekule bílkoviny nebo s polárním uskupením → přidáme – li k roztoku bílkoviny elektrolyt, lze předpokládat, že jeho ionty se budou vázat na bílkovinu

Interakce bílkovin s ligandy

- Prof. G. Scatchard – shrnutí problematiky týkající se interakcí biopolymer – ligand do čtyř otázek:

1) Kolik?

2) Jak pevně? (hodnota vazebné konstanty)

3) Kde?

4) Proč?

Ad 1) a 2) lze vysvětlit fyzikálně – chemickými metodami

Ad 3) buď triviální (vazba kyslíku na hemoglobin); často je třeba znát prostorové uspořádání molekuly biopolymeru-sterické i energetické možnosti jednotlivých vazebných center

Ad 4) nestačí pouze znalost struktury interagujících partnerů, ale je třeba se zamyslet nad funkčními vztahy v celém organismu

Interakce bílkovin s ligandy

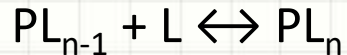
- Bílkovina (P) s jedním vazebným místem pro ligand (L), ustavení rovnováhy $P + L \leftrightarrow PL$
- Asociační konstanta K_A , převrácená hodnota K_D

$$K_A = \frac{[PL]}{[L][P]} = \frac{1}{K_D}$$

- Bílkovina s n vazebnými centry pro ligand



.....



Interakce bílkovin s ligandy

- Pokud se **vazebná místa neovlivňují**: lze stanovit rozsah vazby r

$$r = \frac{\text{moly vázaného } L}{\text{celkem molů } P}$$

- a stupeň asociace β (vyjadřuje frakci vazebných míst obsazených ligandem)

$$\beta = \frac{\text{moly vázaného } L}{\text{vazebná místa v systému}} = \frac{C_L - [L]}{nC_p} = \frac{r}{n}$$

C_L a C_p : výchozí koncentrace ligandu a bílkoviny; $[L]$: koncentrace volného ligandu v rovnovážném systému

- Pro asociační konstantu K_A platí: $\frac{\text{frakce obsazených míst}}{\text{frakce volných míst}} = \frac{\beta}{1 - \beta} = K_A [L]$

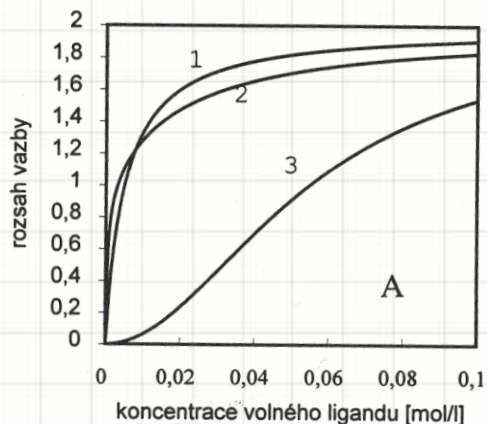
Interakce bílkovin s ligandy

- kombinací předchozích vztahů získáme:
$$\frac{\frac{r}{n}}{1 - \frac{r}{n}} = K_A [L]$$
- a z toho rovnice vazebné izotermy:
$$r = \frac{nK_A [L]}{1 + K_A [L]}$$
- Scatchardův výnos $r/[L]$ proti r
$$\frac{r}{[L]} = nK_A - K_A r$$

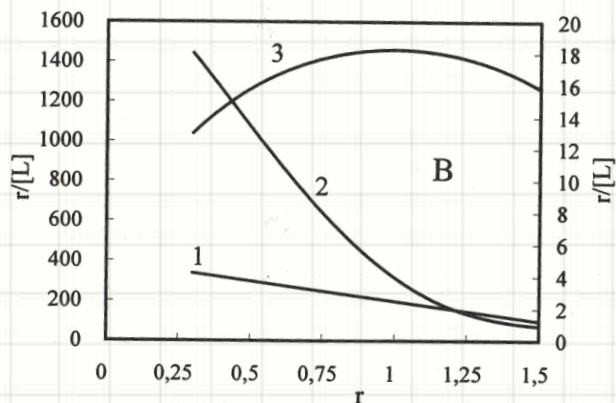
Scatchardův výnos

- V případě neovlivňujících se vazebných center získáme přímku (panel B, křivka 1), jejíž směrnice je rovna záporné hodnotě společné asociační konstanty K_A , úsek na ose $r/[L]$ součinu K_A a počtu vazebných center n a úsek na ose r přímo hodnotě n
- Lze se setkat i s tím, že uvedená Scatchardova závislost není lineární – obtížnější vyhodnocení, může mít dva různé jevy:
 - 1) Křivka je prohnutá směrem nahoru** (panel B, křivka 2) – molekula bílkoviny nese více druhů vazebných center, které se liší vnitřní asociační konstantou; v každé skupině se však dají centra považovat za navzájem nezávislá
- Nejčastěji se setkáváme se dvěma typy vazebných center, ojediněle se třemi (lidský albumin)

Scatchardův výnos



Panel A: Závislost rozsahu vazby r na koncentraci volného ligandu $[L]$ pro různé vazebné modely. 1 – biopolymer obsahuje 2 ekvivalentní vazebná centra, $K_D = 5 \cdot 10^{-3}$; 2 – biopolymer obsahuje dva typy vazebných center, $n_1 = n_2 = 1$, $K_{D,1} = 5 \cdot 10^{-4}$, $K_{D,2} = 2 \cdot 10^{-2}$; 3- vazebná místa pozitivně kooperují, $n = 2$, $k = 0,07047$, $\alpha_H = 2$



Panel B: Scatchardův výnos ($r/[L]$ proti r) pro tytéž vazebné závislosti; pro křivku 3 platí pravá osa

Interakce bílkovin s ligandy

- 2) Křivka je prohnutá směrem dolů nebo prochází maximem (panel B, křivka 3) - vazebná centra nejsou nezávislá, tedy jestliže navázání/uvolnění jednoho ligandu mění afinitu bílkoviny vzhledem k následující molekule L. Jeden typ vazebných center, jimž nemůžeme přiřadit jedinou asociační konstantu; vycházíme ze základního stavu charakterizovaného konstantou k_0 pro situaci, kdy $r = 0$. Změna hodnoty r mění hodnotu k .

- Lze vyjádřit vztahem:

$$k = k_0 e^{-\phi(r)} \quad \phi(r) \text{ vyjadřuje vliv interakce mezi vazebnými místy; při } r = 0, \phi(r) = 0$$

- U těchto kooperativních systémů (vyskytují se v biologických systémech velmi často) se volí semiempirické vztahy:

$$r = \frac{nk^{\alpha_H} [L]^{\alpha_H}}{1 + k^{\alpha_H} [L]^{\alpha_H}}$$

α_H : Hillova konstanta

- platí, že $1 \leq \alpha_H \leq n$
- $\alpha_H = n \rightarrow$ dokonale kooperativní systém
- $\alpha_H = 1 \rightarrow$ absence kooperativity

Interakce bílkovin s ligandy

- chování bílkoviny závisí na pH, což je významné při studiu interakce nabitých ligandů, a zkoumané děje závisí na teplotě
- několik základních možností pro studium interakcí:
 - a) řada bílkovin mění své fyzikální vlastnosti při vazbě na nosič; může dojít ke změně absorpčních vlastností v UV/Vis oblasti spektra, změně fluorescence či chiroptických vlastností. Pokud známe hodnoty této veličiny pro ligand v roztoku a ligand navázaný i celkovou koncentraci ligandu, lze snadno zjistit koncentraci volného ligandu $[L]$ a rozsah vazby r
 - b) studium interakcí dvou makromolekulárních látek v roztoku – metody citlivě reagující na změnu relativní molekulové hmotnosti: polarizace fluorescence, elektroforetické a ultracentrifugační techniky
 - c) metoda izotermální titrační kalorimetrie (ITC; analogie DSC) – do jednoho ze dvou kompartmentů obsahujících stejnou koncentraci makromolekuly se postupně přidává určité množství ligandu a měří se množství tepla uvolněného nebo spotřebovaného v důsledku vazby ligandu na makromolekulu. Přímo experimentálně lze získat hodnoty vazebných konstant, reakčních entalpií a počtu navázaných molekul ligandu

Interakce bílkovin s ligandy

- d) metoda dialyzačních rovnováh pro zjištění závislosti r na $[L]$ -využití dialyzačních komůrek. Konstruované nádoby, kde dva prostory (stejného objemu) jsou odděleny polopropustnou membránou, přes kterou prochází pouze rozpouštědlo a nízkomolekulární látky (ligand), ale makromolekuly neprochází. Na začátku pokusu se do jednoho prostoru A umístí roztok ligandu a do druhého prostoru B roztok makromolekulárního nosiče. Po ustavení rovnováhy jsou stejné koncentrace volného ligandu v obou částech nádoby → stačí určit koncentraci ligandu v prostoru bez nosiče a ze znalosti celkového množství ligandu snadno vypočteme rozsah vazby

