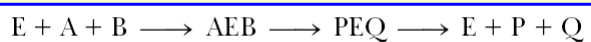


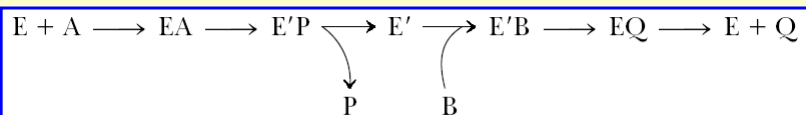
Vícesubstrátové reakce

- v enzymové reakci se účastní dva nebo více substrátů, dvousubstrátové nejčastější
- sekvenční mechanismus

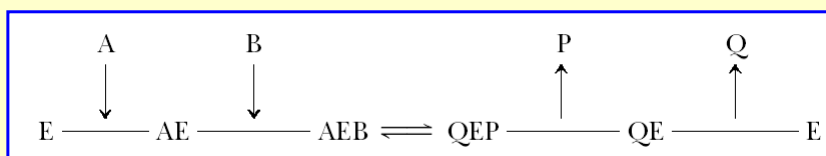


- uspořádaný (napřed se váže A, pak B)
- náhodný (jako první se může vázat buď A, nebo B)

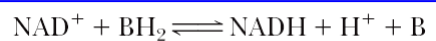
- ping-pongový mechanismus



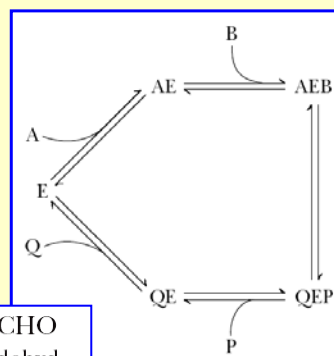
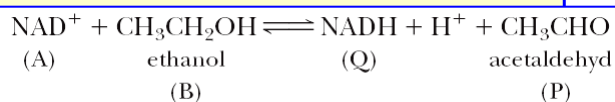
Sekvenční uspořádaný mechanismus



- Clelandova zjednodušená znázornění
- typické pro reakce dehydrogenas:



- jako první substrát se váže NAD^+ , ethanol se na volný enzym neváže



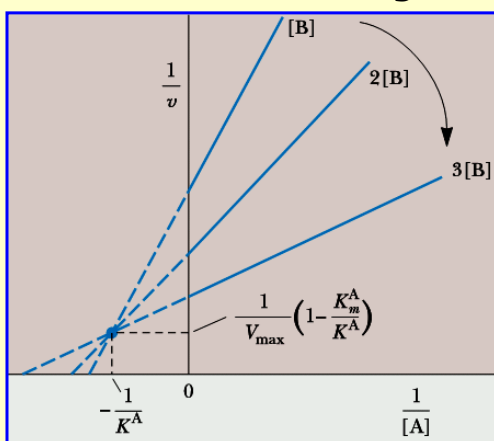
Sekvenční uspořádaný

$$v = \frac{V_{\max} [A][B]}{K_A K_{m,B} + K_{m,B} [A] + K_{m,A} [B] + [A][B]}$$

- K_A ... rovnovážná disociační konstanta pro reakci $E + E = EA$ (vznik binárního komplexu)
- $K_{m,A}$ a $K_{m,B}$... Michaelisovy konstanty pro substráty A a B
- V_{\max} ... maximální rychlost pro $[A] \rightarrow \infty$ a současně $[B] \rightarrow \infty$

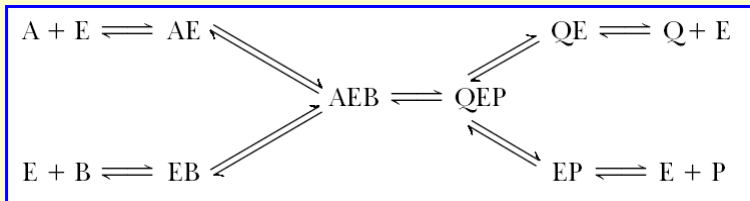
$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,A}}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_A K_{m,B}}{K_{m,A} [B]} \right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_{m,B}}{[B]} \right)$$

Kinetická analýza

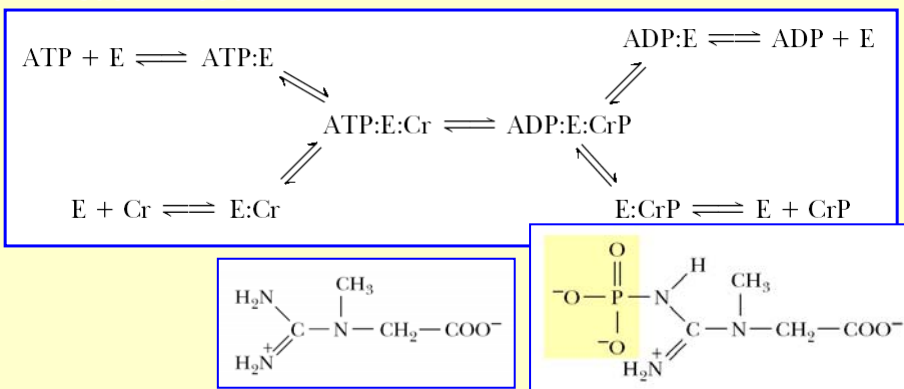


- primární LB grafy pro jeden substrát fixní (B), druhý variabilní - svazky přímek, pro které se určí směrnice, úseky
- sekundární grafy - výnosy směrnic, resp. úseků proti $1/[B]$, získají se přímkou, z nich se pak určí příslušné konstanty (složitě, lze najít v literatuře)

Sekvenční náhodný mechanismus



• kreatinkinasa



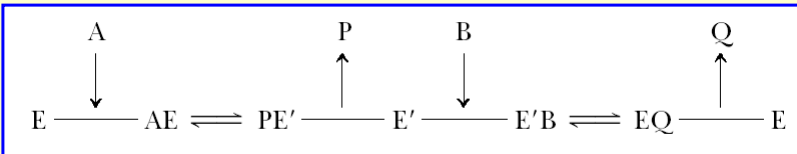
Sekvenční náhodný

$$v = \frac{V_{\max} [A][B]}{K_{m,A} K_{m,B} + K_{m,B} [A] + K_{m,A} [B] + [A][B]}$$

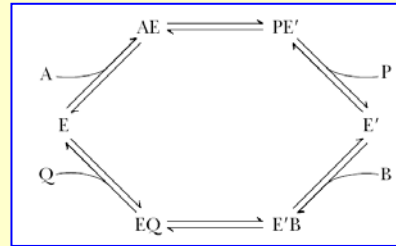
- oba primární grafy mají opět charakter svazků protínajících se přímkou
- interpretace pomocí reciproké formy

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,A}}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_{m,B}}{[B]} \right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_{m,B}}{[B]} \right)$$

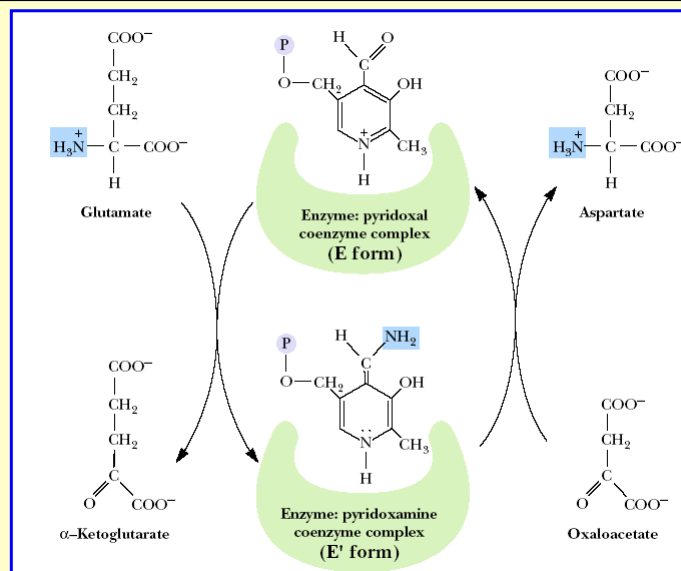
Ping-pongový mechanismus



- navázání prvního substrátu A
- uvolnění prvního produktu P
- vzniká pozměněná forma enzymu E'
- navázání druhého substrátu B
- uvolnění druhého produktu Q
- nevzniká ternární komplex



AST (ping-pong)

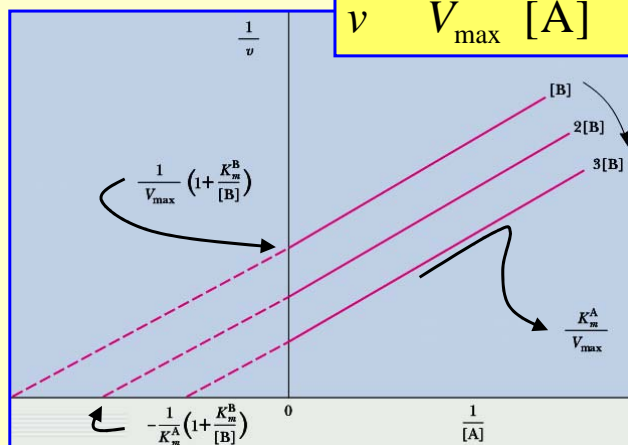


- glutamát:aspartátaminotransferasa

Ping-pongový

$$v = \frac{V_{\max} [A][B]}{K_{m,B}[A] + K_{m,A}[B] + [A][B]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,A}}{V_{\max}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_{m,B}}{[B]} \right)$$

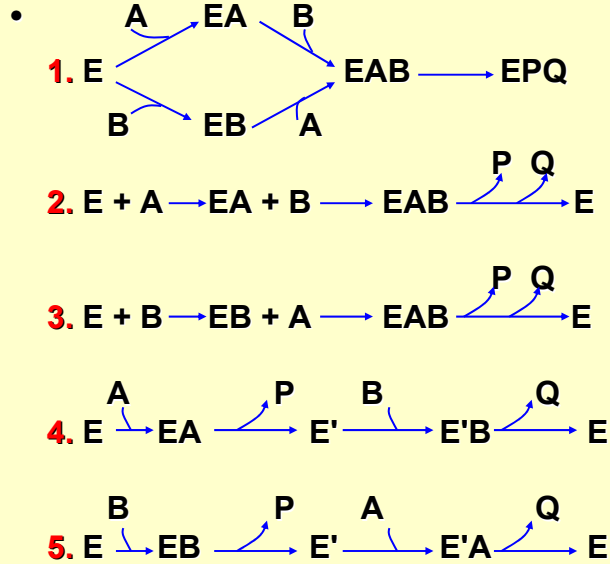


- primární výnos pro první substrát (A) má charakter **rovnoběžek**

Jak určit typ mechanismu

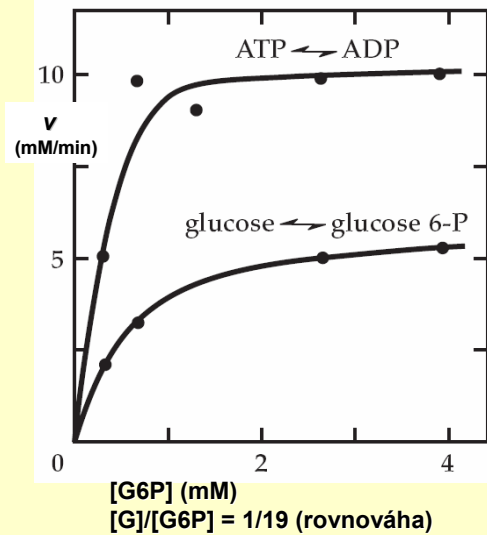
- rychlost isotopové výměny (viz minule)
- studium kinetiky reakce se substráty
 - primární grafy - pokud dostaneme pro jeden ze substrátů rovnoběžky, tak se tento substrát váže první a jedná se o ping-pongový mechanismus
 - pokud oba prim. grafy mají tvar protínajících se přímek - jedná se o sekvenční náhodný či uspořádaný mechanismus
- studium vlivu inhibice produkty
 - do reakční směsi se přidá v nadbytku jeden z produktů, a zkoumá se jeho inhibice každému z obou substrátů
 - formy enzymu, na které se váží substrát a inhibitor, jsou: shodné ... kompetitivní inhibice
různé, oddělené reversibilními kroky ... směsná inhibice
různé, oddělené ireversibilními kroky ... akompetitivní inhibice

Možné mechanizmy



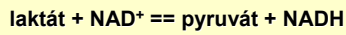
Rychlost isotopové výměny - náhodný

- reakce hexokinasy:
- $$\text{glukosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glukosa-6P} + \text{ADP}$$
- rychlost výměny rad. značené glukosy* a G6P (resp. ATP* a ADP) v závislosti na koncentraci G6P, za rovnováhy reakce
 - monotonní nárůst obou rychlostí výměn svědčí o **náhodném sekvenčním mechanismu**
 - bez jednoho z reaktantů výměna neprobíhá - oba jsou potřebné



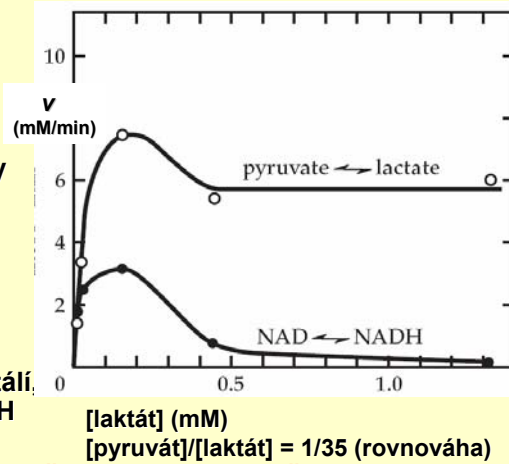
Rychlost isotopové výměny - sekvenční

- reakce laktátdehydrogenasy

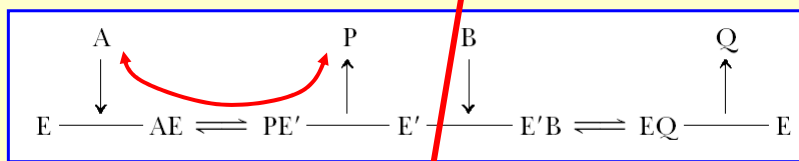


- obě výměny vychází z nulového stavu, prochází lokálním maximem, poté se výměna pyruvát* - laktát ustálí, avšak výměna NAD** - NADH prakticky ustane

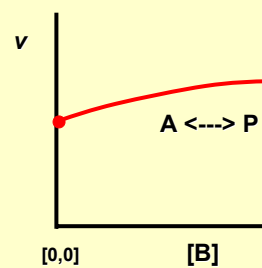
- mechanismus je **sekvenčně uspořádaný, první se váže NAD⁺**, pak laktát, uvolní se pyruvát, nakonec NADH
- nadbytek laktátu vede k tomu, že enzym je převážně přítomen ve formě ternárního komplexu (EAB resp. EPQ), a v roztoku není přítomná volná forma E nutná pro vazbu NAD⁺ resp. NADH - tato výměna poklesne



Rychlost isotopové výměny - ping-pong



- izotopová výměna může probíhat i v tom případě, že schází druhý substrát



- **studium vlivu externích inhibitorů**

- inhibitor se volí tak, aby kompetoval s jedním ze substrátů (A a I_A - jsou strukturně podobné) = váží se oba na stejnou formu enzymu
- pak se zkoumá, jaký je projev inhibice vůči druhému substrátu B:
- akompetitivní - napřed se váže substrát B, pak substrát A
- směsná, resp. nekompetitivní - napřed se váže substrát A, pak substrát B

