

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 12

13 maja, 2025

fizyka enzymów – część 2

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

On the Temperature Dependence of Enzyme-Catalyzed Rates

V. L. Arcus, E. J. Prentice, J. K. Hobbs, A. J. Mulholland, M W. Van der Kamp, C. R. Pudney, E. J. Parker, and L. A. Schipper
Biochemistry, 55:1681-1688 (2016)

Jedną z kluczowych zmiennych określających szybkość każdej reakcji jest temperatura. W przypadku układów biologicznych wpływ temperatury jest powiązany z niezliczonymi (i często przeciwstawnymi) wpływami, na przykład, katalizy enzymatycznej, stabilności białek i regulacji zależnej od temperatury.

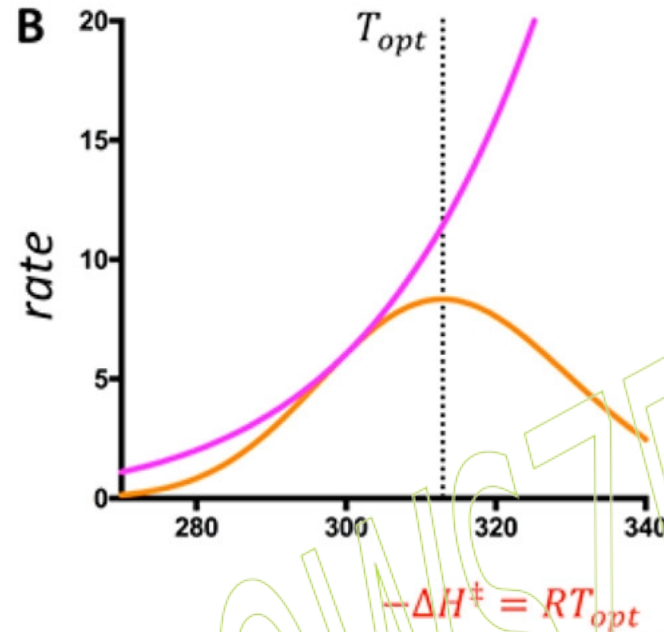
Szybkość dowolnej reakcji chemicznej jest funkcją temperatury (T) i różnicy energii pomiędzy reagentami a stanem przejściowym, tzw. energii aktywacji (E_a). Arrhenius jako pierwszy sformalizował tę zależność w XIX wieku (na podstawie obserwacji empirycznych) swoim słynnym równaniem (**równanie Arrheniusa**)

$$k(T) = A \exp(-E_a / RT)$$

gdzie k jest stałą szybkości a R stałą gazową. Na początku 20 wieku rozwój teorii stanu przejściowego (TST) przez Eyring'a, Polanyi'ego i innych doprowadził do sformułowania **równania Eyring'a** na stałe szybkości reakcji pierwszego i drugiego rzędu.

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} \exp(-\Delta G^\ddagger / RT)$$

gdzie $\Delta G^\ddagger$ jest zmianą energii swobodnej Gibbs'a między reagentem(ami) i stanem przejściowym, k_B oraz h to stała Boltzmann'a i stała Planck'a, odpowiednio, a κ jest współczynnikiem przejścia, zwykle dla prostoty przyjętym za równy 1. To doprowadziło do zrozumienia i sformułowania na gruncie mechaniki statystycznej wyrażenia zaproponowanego przez Arrhenius'a. **Równania Arrhenius'a i Eyring'a są zamieszczane w nowoczesnych podręcznikach (bio)chemii i przedstawiają bardzo dobry opis zależności od temperatury wielu procesów chemicznych.**



Przewidywana zależność od temperatury szybkości reakcji enzymatycznej według równania Eyring'a (fioletowy, równanie *).

Obserwowane zależności od temperatury szybkości reakcji enzymatycznej są często takie jak pokazuje wykres pomarańczowy. Taką zależność przewiduje równanie ** wyprowadzone w modelu MMRT (macromolecular rate theory, teoria szybkości makromolekularnej). Optymalna temperatura w modelu MMRT jest pokazana przez pionową kropkowaną linię.

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger}{R} \quad (*)$$

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R} \quad (**)$$

Na wykładzie 6 zetkneliśmy się z paraboliczną zależnością energii swobodnej Gibbsa denaturacji białek od temperatury, $\Delta G(T)$. Tu mamy paraboliczną zależność $\Delta G^\ddagger(T)$. W obu przypadkach paraboliczne zależności od temperatury wynikają z różnicy ciepła właściwego między odpowiednimi formami białka/enzymu.

Na podstawie badań kalorymetrycznych Privalov ustalił, że ciepło właściwe w stałym ciśnieniu rozwiniętej formy białek jest większe niż formy zwiniętej. Zakładając, że Δc_p jest niezależne od temperatury, możemy przewidzieć istnienie formy zdenaturowanej przez zimno.

Wyprowadzenie wzoru na zależność $G_D - G_N$ od temperatury:

$$\Delta G = G_{\text{denatured}} - G_{\text{native}}$$

$$dH = T dS + V dp$$

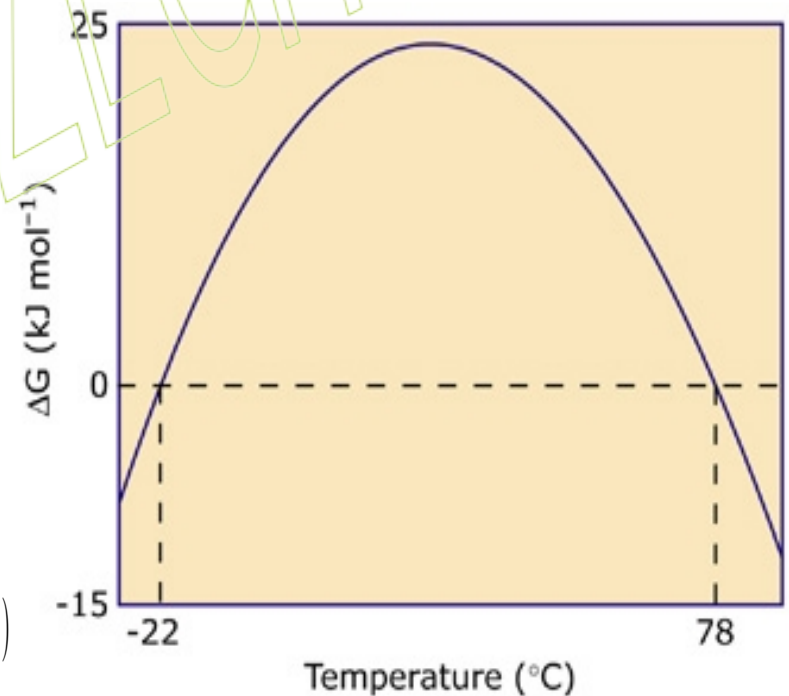
$$(dH)_p = T dS \Rightarrow c_p = T \left(\frac{dS}{dT} \right)_p \quad c_p = \left(\frac{dH}{dT} \right)_p$$

$$\Delta X = X^U - X^F$$

$$d(\Delta H)_p = \Delta c_p dT \Rightarrow \Delta H(T) - \Delta H(T_{\text{ref}}) = \Delta c_p (T - T_{\text{ref}})$$

$$d(\Delta S)_p = (\Delta c_p / T) dT \Rightarrow \Delta S(T) - \Delta S(T_{\text{ref}}) = \Delta c_p \ln(T / T_{\text{ref}})$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_{\text{ref}}) - T \Delta S(T_{\text{ref}}) + \Delta c_p (T - T_{\text{ref}} - T \ln(T / T_{\text{ref}}))$$



Pojemność cieplna (ciepło właściwe)

Pojemność cieplna lub pojemność termiczna to fizyczna właściwość materii, zdefiniowana jako ilość energii na sposób ciepła, która ma zostać dostarczona do układu, aby spowodować jednostkową zmianę jego temperatury. Jednostką pojemności cieplnej w układzie SI jest dżul na kelwin (J/K).

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{\Delta Q}{\Delta T}$$

Ekwipartycja energii: Twierdzenie o ekwipartycji energii stwierdza, że cząsteczki w równowadze termicznej mają tę samą średnią energię związaną z każdym niezależnym stopniem swobody ich ruchu i że energia na każdy stopień swobody wynosi $\frac{1}{2} kT$ na cząsteczkę ($\frac{1}{2} RT$ na mol).

Dla trzech translacyjnych stopni swobody, co napotykamy na przykład w idealnym gazie jednoatomowym, mamy $(3/2) kT$ na cząsteczkę lub $(3/2)RT$ na mol.

W przypadku gazów wieloatomowych wzrost energii wewnętrznej związany z ogrzewaniem takich gazów dodaje energię do rotacyjnych i być może wibracyjnych stopni swobody. Każdy mod wibracyjny otrzyma $kT/2$ dla energii kinetycznej i $kT/2$ dla energii potencjalnej.

Pojemność cieplna (ciepło właściwe) makromolekuł:

Energia wewnętrzna układu jest podzielona na mody translacyjny, rotacyjny, wibracyjny i elektronowy.

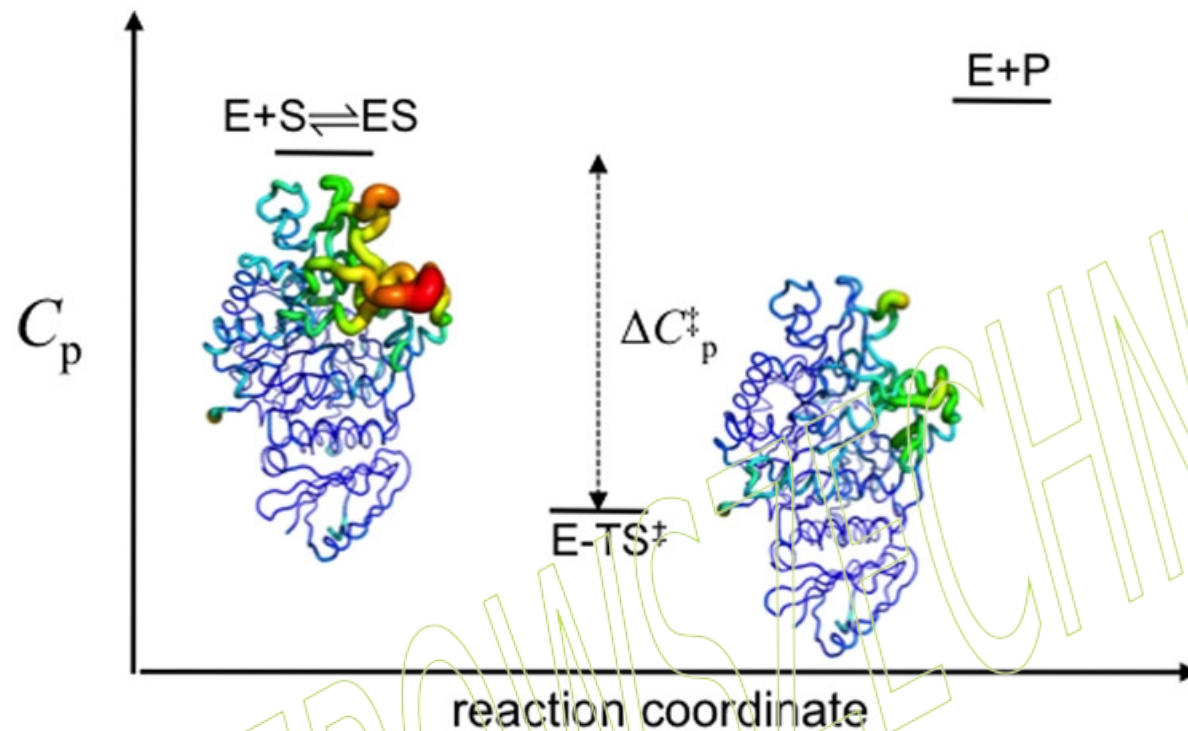
Pojemność cieplna C jest formalnie zmianą energii wewnętrznej wraz ze zmianą temperatury i jest miarą zdolności absorpcji energii w modach translacyjnych, rotacyjnych, wibracyjnych i elektronowych.

W przypadku systemów znajdujących się w wodzie o biologicznie istotnych temperaturach ($-20 < T < 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) mody elektronowe powyżej stanu podstawowego są generalnie niedostępne, a zatem mody elektronowe nie przyczyniają się w tym kontekście do pojemności cieplnej.

Eksperymentalnie wykazano, że największy udział w pojemności cieplnej złożonego białka w wodzie ma liczba dostępnych modów wibracyjnych.

Zmiana pojemności cieplnej, ΔC_p , dla układu makrocząsteczkowego znajdującego się w równowadze między dwoma stanami jest wówczas w największym stopniu spowodowana zmianą częstotliwości modów wibracyjnych cząsteczki między obydwoma stanami.

Najprostszy przykład makrocząsteczkowego ΔC_p można zobaczyć w wiązaniu białko-ligand: forma apo białka (P_{apo}) jest często bardziej elastyczna (tj. ma więcej modów wibracyjnych o niskiej częstotliwości) niż postać związana z ligandem (która ma zwiększoną sztywność i mniej trybów niskiej częstotliwości). Jeśli weźmiemy pod uwagę wkłady od samego białka, ΔC_p dla takiej interakcji jest na ogół ujemne.

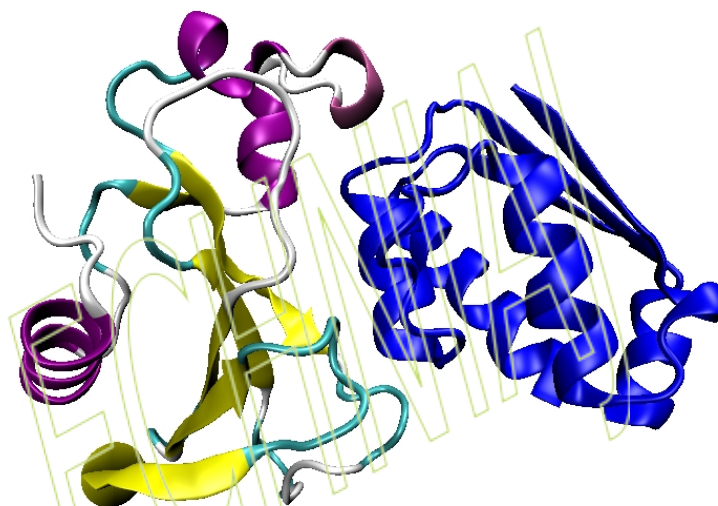


Wzrost szybkości reakcji enzymatycznej z temperaturą obserwowany aż do pewnej temperatury optymalnej (T_{opt}) jest powszechnie przypisywany klasycznemu zachowaniu się zgodnemu z przewidywaniami teorii Arrhenius'a, a obniżenie szybkości reakcji po przekroczeniu T_{opt} jest przypisywane denaturacji białka i/lub agregacji. Ta interpretacja utrzymuje się, mimo że wielu badaczy zauważa, że denaturacja nie jest wystarczająca, aby wyjaśnić spadek szybkości enzymatycznej powyżej T_{opt} .

Centralną częścią MMRT jest obserwacja, że reakcje katalizowane enzymatycznie zachodzą przy znaczących wartościach $\Delta C_p^\ddagger$, które są na ogół ujemne. Oznacza to, że pojemność cieplna (C_p) kompleksu enzym-substrat jest na ogół większa niż C_p kompleksu enzym-stan przejściowy. Zgodnie z klasycznym opisem katalizy enzymatycznej, ujemna wartość $\Delta C_p^\ddagger$ jest wynikiem stosunkowo słabego wiązania enzymu z substratem i bardzo ścisłego ze stanem przejściowym. Czyli, to zmiana pojemności cieplnej związana z katalizą enzymatyczną ($\Delta C_p^\ddagger$) i jej wpływ na zależność temperaturową $\Delta G^\ddagger$ określa zależność aktywności enzymu od temperatury.

Jednym z badanych enzymów była barnaza:

Barnaza: (nazwa bierze się od „BACterial” „RiboNucleASE”) to białko bakteryjne składające się ze 110 aminokwasów i wykazujące aktywność rybonukleazy. Jest syntetyzowany i wydzielany przez bakterię *Bacillus amyloliquefaciens*, ale jest śmiertelny dla komórki, jeśli ulega ekspresji bez inhibitora barstar. Inhibitor wiąże się z miejscem aktywnym rybonukleazy i je zamyka, zapobiegając uszkodzeniu przez barnazę RNA komórki po jego syntezie, ale przed wydzielaniem. Kompleks barnaza/barstar znany jest z niezwykle szybkiego wiązania białko-białko, z szybkością $10^8 \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$.



Wyznaczono aktywność enzymu barnazy i jej mutantu A43C/S80C na fluorogennym substracie nukleotydowym w funkcji temperatury. Otrzymane stałe szybkości reakcji fitowano do równania

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R}$$

Fitowania były przeprowadzone z temperaturą referencyjną równą $T_{\text{opt}} - 4$.

Wyniki badań zależności wydajności katalizy od temperatury dla dobrze zbadanego enzymu barnazy i jego stabilizowanego podwójnego mutantu A43C/S80C. Dla obu, kinetyka Michaelisa-Menten i szybkości rozwijania z temperaturą zostały dobrze udokumentowane.

Krzywizna widoczna na wykresie $\ln(k_{\text{cat}})$ w funkcji T dla typu dzikiego barnazy można zracjonalizować jako połączenie zachowania podobnego do Arrheniusa w temperaturach poniżej 312 K (T_{opt}) i denaturacji powyżej 312 K (punkt środkowy temperaturowego rozwijania termicznego, T_m , dla barnazy wynosi 326 K).

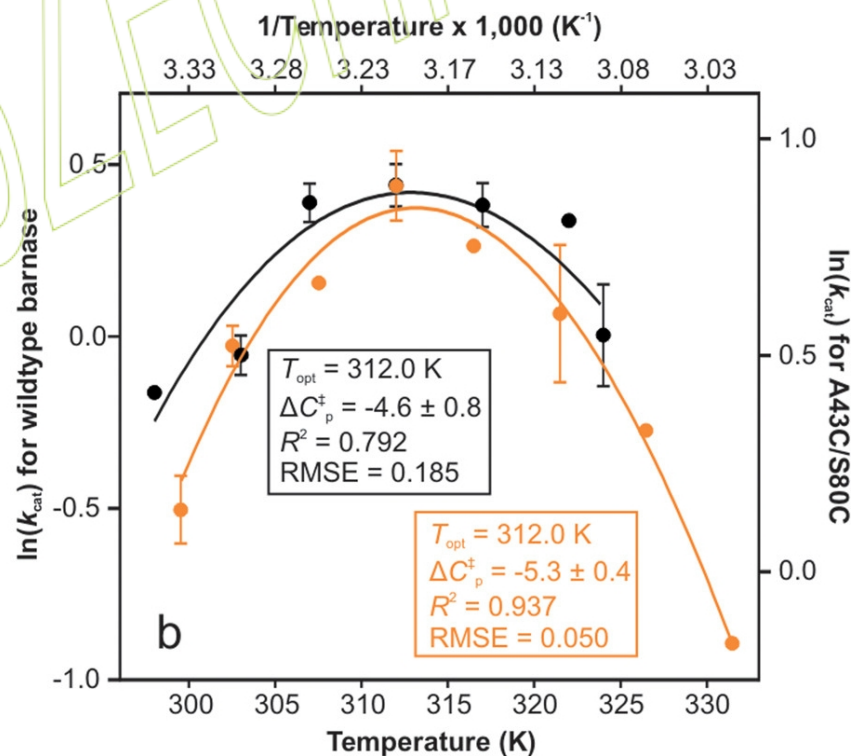
Jednakże nie może to wyjaśniać krzywizny A43C/S80C, który zawiera stabilizujące wiązanie disiarczkowe i ma zwiększoną T_m (331 K). Chociaż mutant ten został ustabilizowany, krzywizna $\ln(k_{\text{cat}})$ w zależności od temperatury pozostaje i nie ma wzrostu T_{opt} .

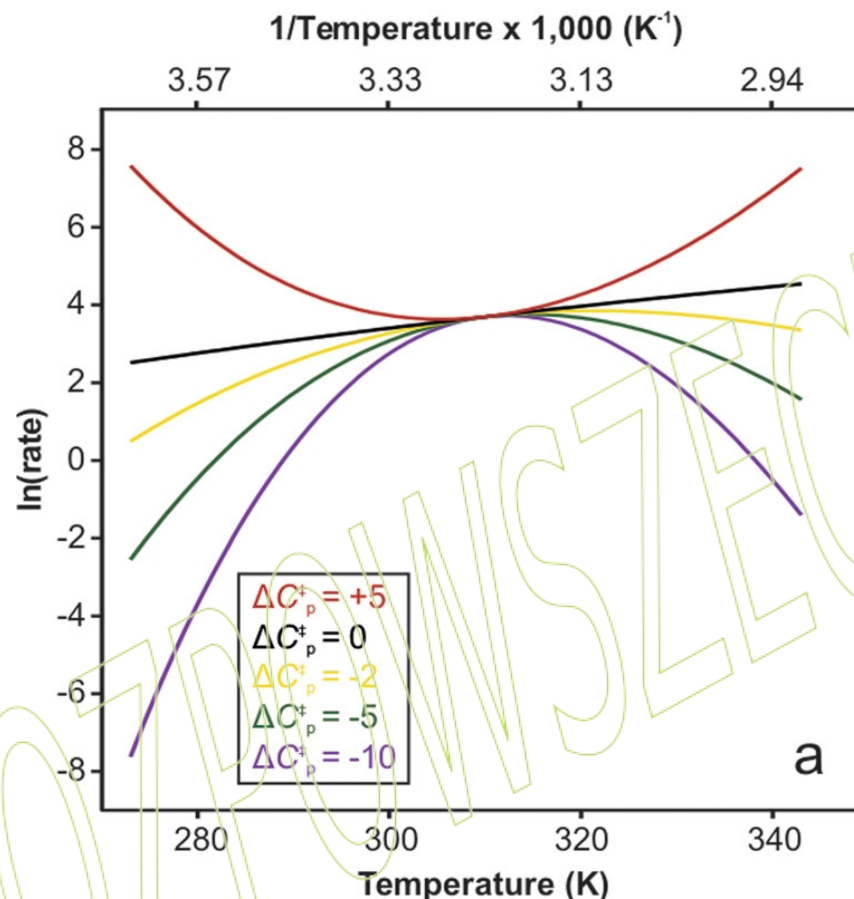
Niepowodzenie modelu podręcznikowego (Arrhenius + denaturacja) w wyjaśnieniu T_{opt} A43C/S80C można po prostu rozwiązać, biorąc pod uwagę ujemną wartość $\Delta C_p^\ddagger$ dla katalizy.

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R} \quad (*)$$

Dopasowanie równania (*) do danych dotyczących szybkości temperatury dla barnazy typu dzikiego i A43C/S80C daje podobne, duże i ujemne wartości $\Delta C_p^\ddagger$ odpowiednio $-4,6 \pm 0,8$ i $-5,3 \pm 0,4$ kJ mol⁻¹ K⁻¹.

Zauważamy, że te duże, ujemne wartości $\Delta C_p^\ddagger$ odnoszą się do układu reakcyjnego jako całości, który obejmuje zarówno reagenty, jak i enzym. Nie spodziewalibyśmy się tak dużych wartości wyłącznie dla prostych reakcji organicznych.

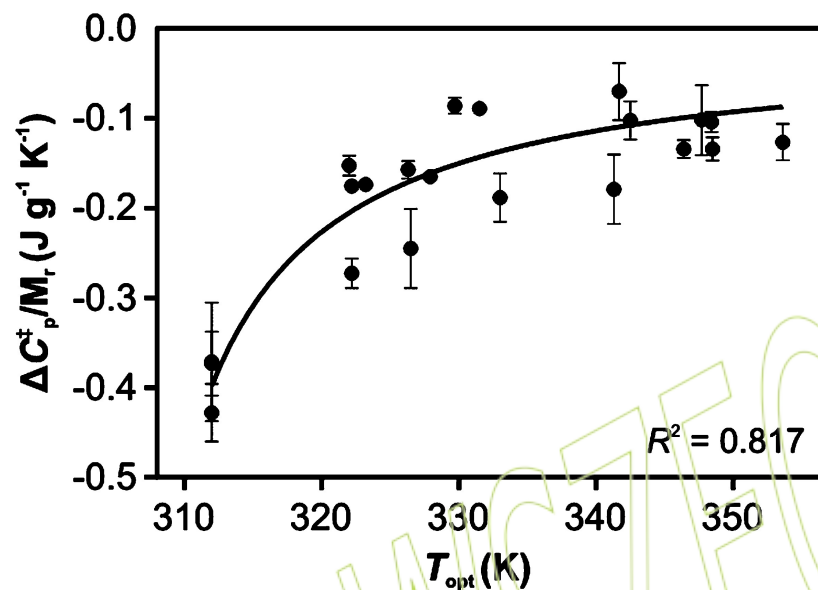




Wpływ $\Delta C_p^\ddagger$ na temperaturową zależność szybkości reakcji – schematyczne przedstawienie zależności między temperaturą i szybkością modelowane za pomocą równania

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R}$$

przy założeniu różnych wartości $\Delta C_p^\ddagger$.



Korelacja między T_{opt} i $\Delta C_p^{\ddagger}$ dla enzymów badanych w ACS Chem. Biol., 8:2388-2393 (2013), wynikająca ze stosowania równania

$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^{\ddagger} + \Delta C_p^{\ddagger} (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^{\ddagger} + \Delta C_p^{\ddagger} (\ln T - \ln T_0)}{R}$$

w analizie kinetyki. Łącząc w jednej analizie wartości $\Delta C_p^{\ddagger}$ otrzymane dla różnych enzymów należy zmienić jednostki na $\text{J g}^{-1} \text{K}^{-1}$ przez podzielenie przez M_r enzymu (liczba modów wibracyjnych dających wkład do $\Delta C_p^{\ddagger}$ w białkach jest, jak wykazano w innych badaniach, liniowo skorelowana z M_r). Linia ciągła reprezentuje dopasowanie równania

$$-\Delta C_p^{\ddagger} = \frac{\Delta H_{T_0}^{\ddagger} + R T_{opt}}{T_{opt} - T_0}$$

do danych z użyciem $T_0 = 306 \text{ K}$. Słupki błędów, jeśli są widoczne, reprezentują SE w $\Delta C_p^{\ddagger}/M_r$. Równanie na $\Delta C_p^{\ddagger}$ otrzymuje się z przyrównania $\delta k/\delta T = 0$ (gdzie $k(T)$ to równania Eyring'a z wprowadzoną wielkością $\Delta C_p^{\ddagger}$ pokazane na poprzednim slajdzie).

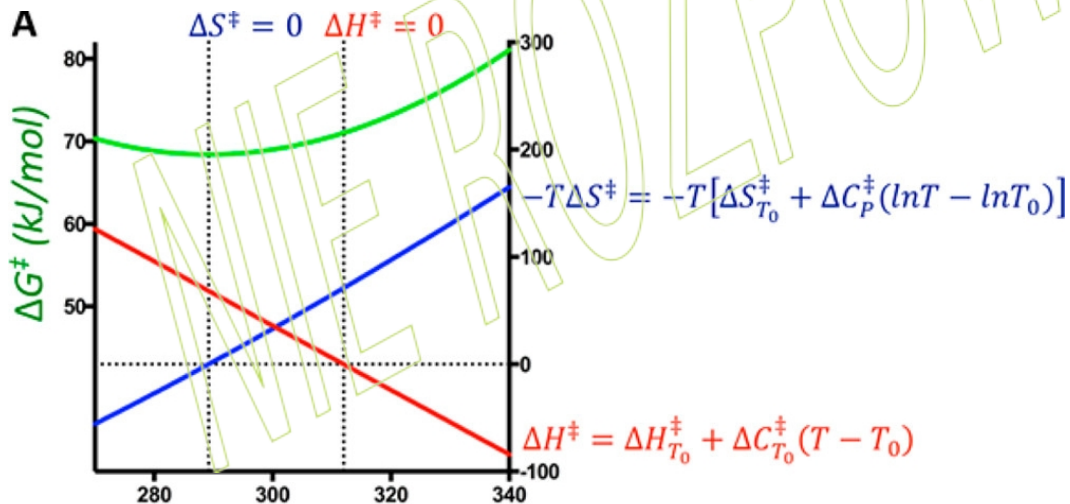
Wprowadzenie wyrazu $\Delta C_p^\ddagger$ do równania Eyring'a ma istotne implikacje dla przewidywanej zależności szybkości katalizowanej enzymatycznie od temperatury, gdyż wprowadza to silną zależność $\Delta H^\ddagger$ i $\Delta S^\ddagger$ od temperatury.

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R}} e^{-\frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT}}$$

$$\ln k = \ln \frac{\kappa k_B T}{h} - \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R}$$

Konsekwencją jest to, że $\Delta G^\ddagger$ jest zakrzywione jako funkcja temperatury i krzywizna jest określona przez wielkość $\Delta C_p^\ddagger$ (aby to zilustrować Rysunek A pokazuje wynik przyjęcia $\Delta C_p^\ddagger = -3.0 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

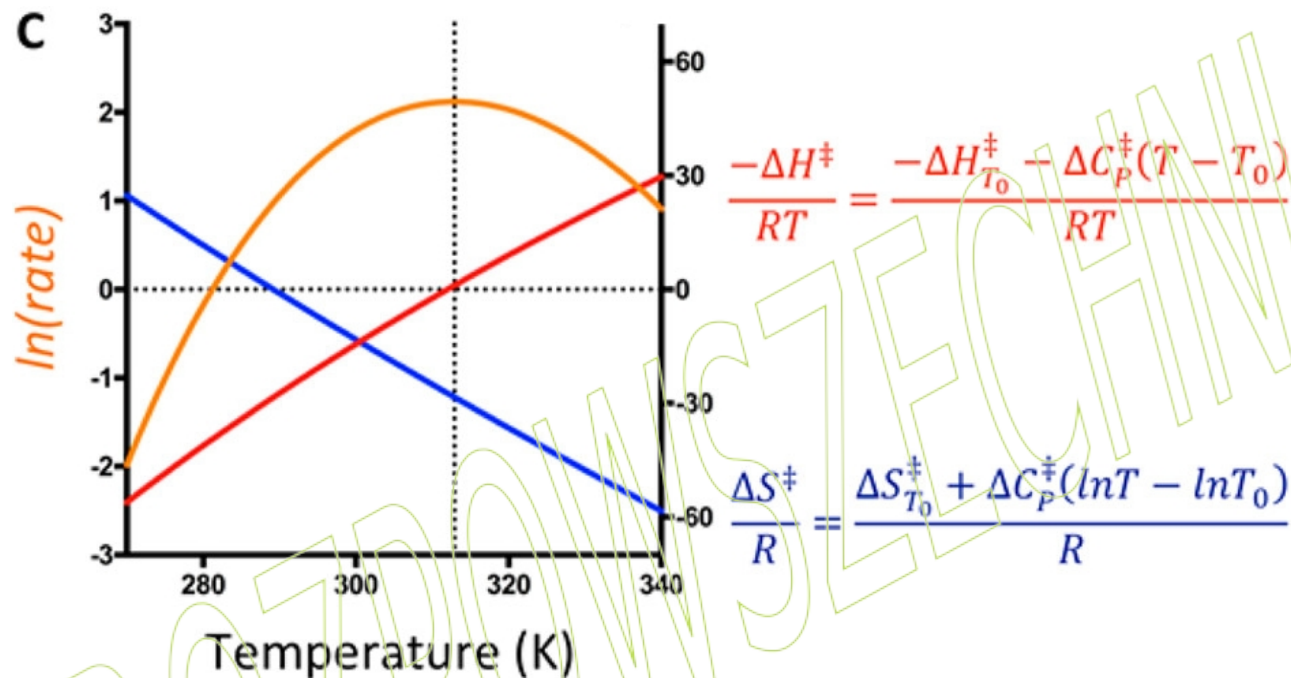
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0) - T \left[\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0) \right]$$



(A) Temperaturowa zależność $\Delta G^\ddagger$ (oś y po lewej stronie) jest pokazana w kolorze zielonym. Indywidualne wkłady do $\Delta G^\ddagger$ od entalpii i entropii są pokazane w kolorach czerwonym i niebieskim, odpowiednio (oś y po prawej stronie).

Pionowe linie kropkowane pokazują temperatury, dla których $\Delta S^\ddagger = 0$ i $\Delta H^\ddagger = 0$.

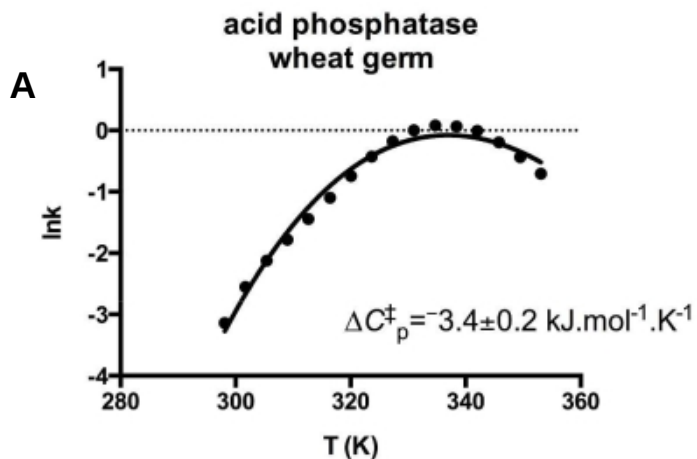
$\Delta G^\ddagger$ ma minimum gdy $\Delta S^\ddagger = 0$. Wartość $\Delta C_p^\ddagger$ przyjęto $-3.0 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.



(C) Temperaturowa zależność szybkości reakcji, $\ln(\text{szybkość})$ wedle modelu MMRT (kolor pomarańczowy, lewa oś y) iand indywidualne wkłady do $\ln(\text{szybkość})$ pochodzące od entalpii ($-\Delta H^\ddagger/RT$) i entropii ($\Delta S^\ddagger/R$), linie czerwona i niebieska, odpowiednia (prawa oś y). Pionowa kropkowana linia pokazuje T_{opt} and $-\Delta H^\ddagger = RT_{\text{opt}}$.

Wynika z tego, że dla $\Delta C_p^\ddagger < 0$, szybkość reakcji katalizowanej przez enzym początkowo rośnie ze wzrostem temperatury. Wzrost zachodzi do osiągnięcia temperatury optymalnej (T_{opt}) po czym szybkość reakcji spada, w przeciwieństwie do przewidywań prostej kinetyki Arrheniusa i Eyringa.

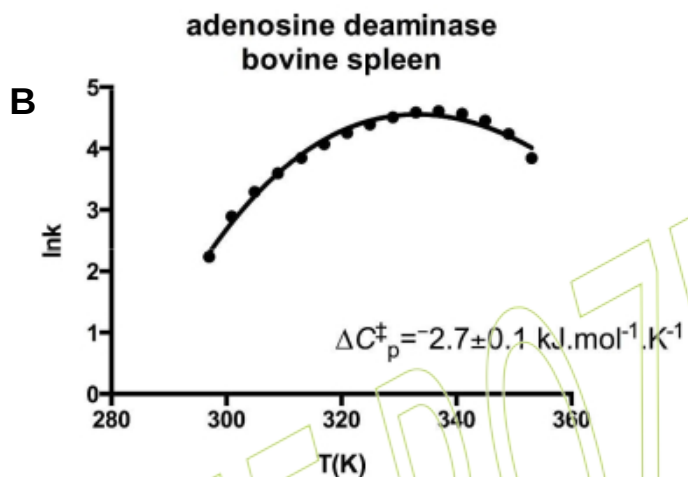
Wzrost szybkości reakcji ze wzrostem temperatury aż do osiągnięcia T_{opt} wynika z członu entalpowego ($-\Delta H^\ddagger/RT$). Jednakże, znaczenie tego członu jest powoli zmniejszane przez człon entropowy ($\Delta S^\ddagger/R$) co w temperaturach powyżej T_{opt} prowadzi do zmniejszenia szybkości reakcji.



Przykłady fitowania równania (*) do danych doświadczalnych opublikowanych w pracach:

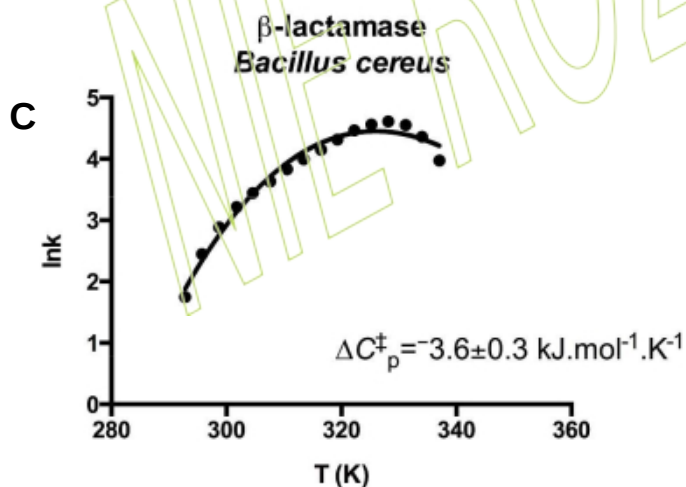
(1) Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., and Eissenthal, R. (2007) The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem J* 402, 331.

(2) Peterson, M. E., Eissenthal, R., Danson, M. J., Spence, A., and Daniel, R. M. (2004) A new intrinsic thermal parameter for enzymes reveals true temperature optima. *J. Biol. Chem.* 279, 20717–20722.



A. Kwaśne fosfatazy (APaza) to rodzina enzymów, które niespecyficznie katalizują hydrolizę monoestrów i bezwodników kwasu fosforowego w celu wytworzenia nieorganicznego fosforanu przy optymalnym pH wynoszącym od 4 do 7.

B. Deaminaza adenozyiny jest enzymem biorącym udział w metabolizmie puryn. Jest niezbędna do rozkładu adenozyiny z pożywienia i do obrotu kwasów nukleinowych w tkankach.

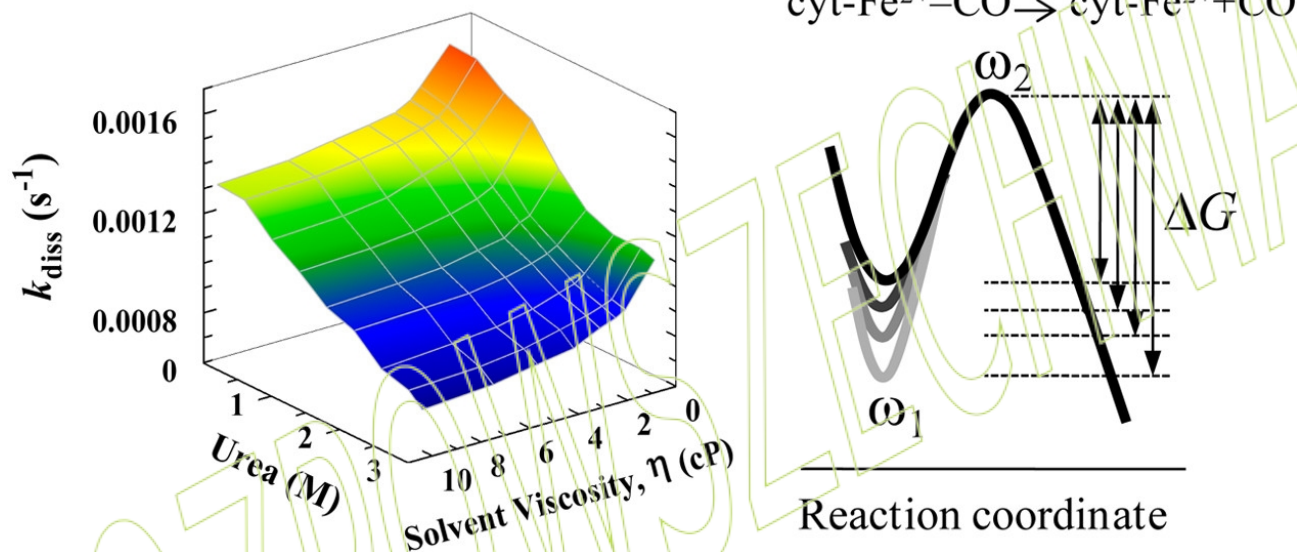


C. Beta-laktamazy (β -laktamazy) to enzymy wytwarzane przez bakterie, które zapewniają wielolekooporność na antybiotyki beta-laktamowe, takie jak penicyliny, cefalosporyny, cefamycyny, monobaktamy i karbapenemy (ertapenem).

Viscosity Dependence of Some Protein and Enzyme Reaction Rates: Seventy-Five Years after Kramers

Pulikallu Sashi and Abani K. Bhuyan
Biochemistry, 54:4453-4461 (2015)

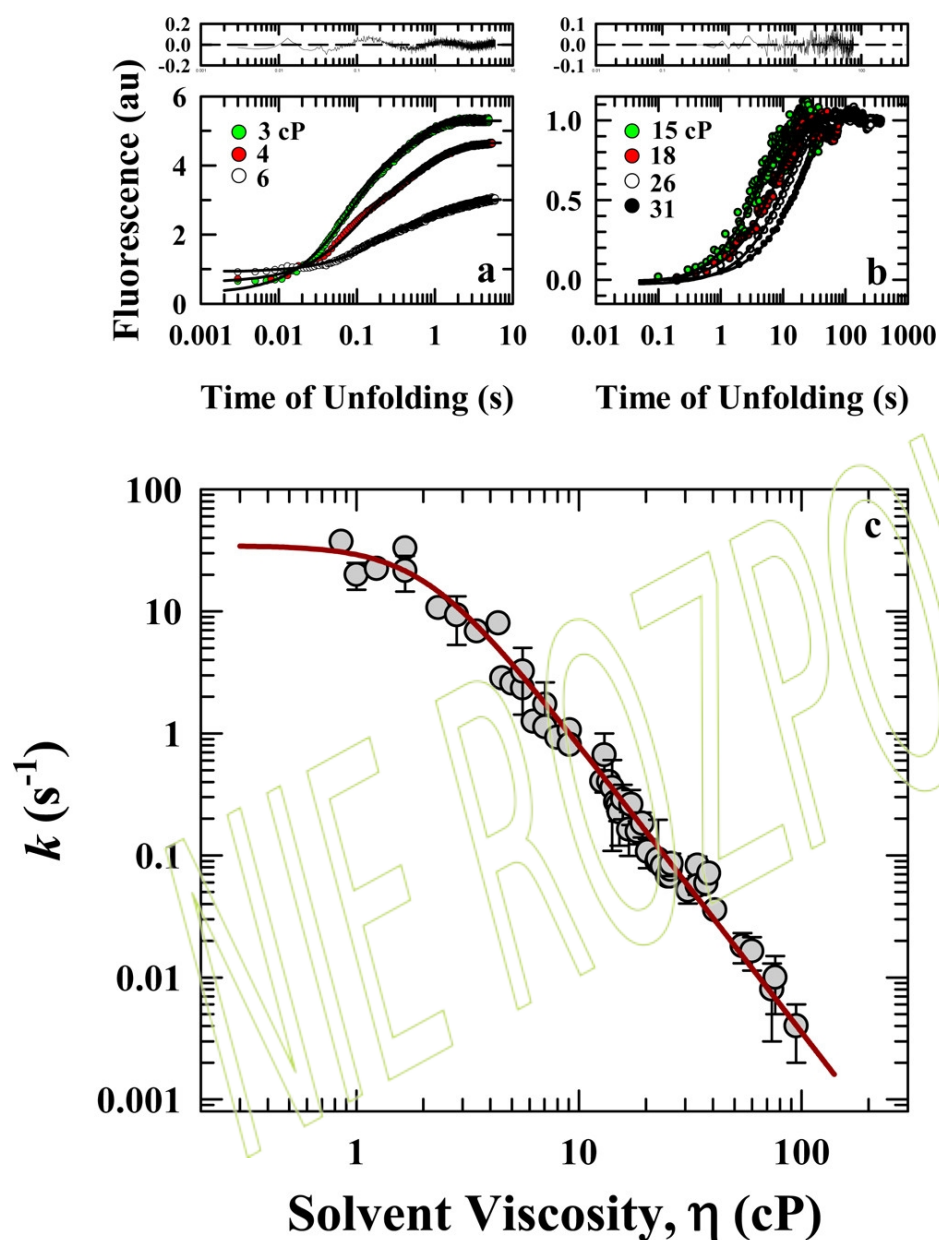
H. A. Kramers, Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, Physica 7:284-304 (1940)



Teoria szybkości Kramersa jest kamieniem milowym w badaniach reakcji chemicznych, ale nadal istnieją wątpliwości dotyczące podstawowego zrozumienia szybkości reakcji dużych cząsteczek w fazie skondensowanej, w lepkiem środowisku. Badania eksperymentalne teorii Kramersa opierają się na pomiarach zależności szybkości reakcji skalowania odwrotności lepkości rozpuszczalnika, która często jest utożsamiana ze współczynnikiem tarcia objętościowego w oparciu o proste zależności hydrodynamiczne. Oprócz trudności w wyodrębnieniu szczegółów prefaktorów z danych eksperymentalnych, nie jest jasne, dlaczego w wielu badanych reakcjach obserwuje się znaczne odchylenia ich szybkości od liniowego związku z odwrotnością lepkości, $k \propto \eta^{-1}$.

W pracy tej opisano wpływ tarcia rozpuszczalnika generowanego przez glicerol na szybkość trzech różnych reakcji białkowych, m. in. indukowanego guanidyną rozwijania cytochromu c.

Aby określić, jak bardzo szybkość rozwijania białka odpowiada przewidywaniom wzoru Kramersa, zmierzono stałą szybkości rozwijania cytochromu c przy 3, 8 M GdnHCl w obecności zmiennego poziomu gliceryny.



Rozwijanie struktury cytochromu c w 15 mM buforze fosforanowym (pH 7) po dodaniu 3,8 M GdnHCl. Pokazano przykłady krzywych postępu reakcji po mieszaniu

(a) w spektrometrze zatrzymanego przepływu i b) manualnym mieszaniu przy wskazanych wartościach lepkości. Linie ciągłe przechodzące przez dane reprezentują dopasowania dwuwykładnicze, gdzie mniejsza faza stanowiąca ~10% całkowitej amplitudy jest uwzględniona w celu poprawy jakości dopasowań.

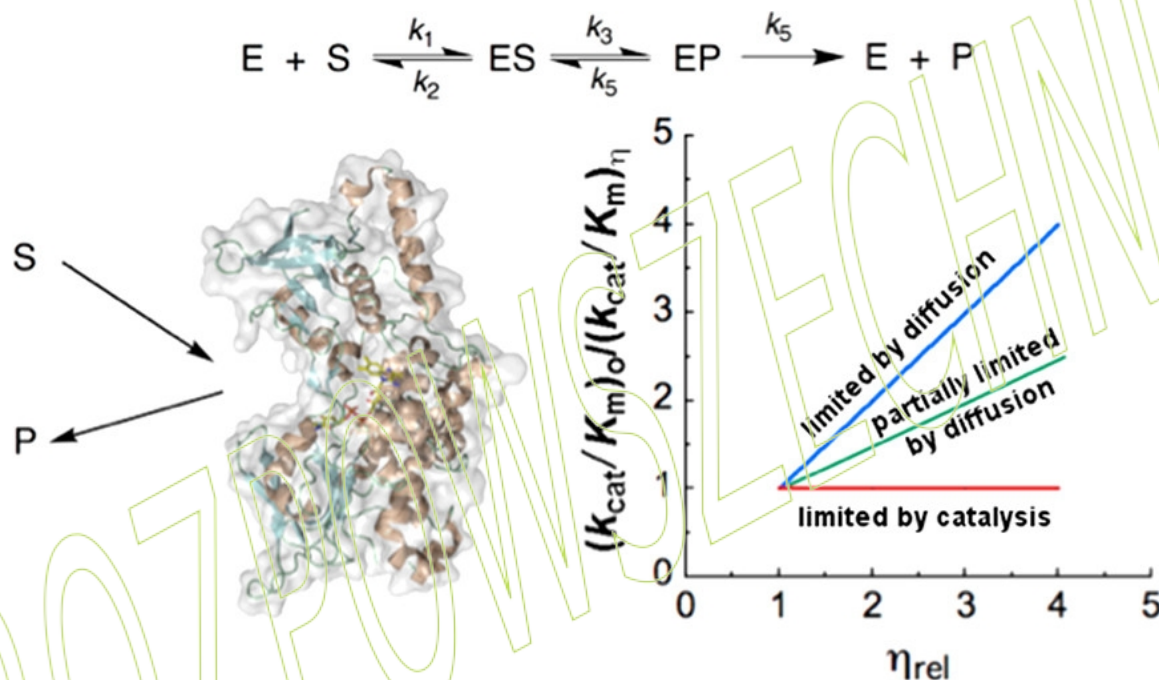
(c) Stała szybkości głównej fazy rozwijania w funkcji lepkości rozpuszczalnika. Linia ciągła to dopasowanie do równania 2 z parametrami dopasowania $C = 1,3 \times 10^{10}$ cP s⁻¹, $n = 2.4$, $\sigma = 5.3 \pm 0.4$ cP, i $\Delta G = 10.4$ kcal mol⁻¹. Słupki błędów wygenerowano w wyniku wielokrotnych powtórzeń eksperymentów.

$$k = \frac{A}{\eta} \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (1); \quad k = \frac{C}{\eta^n + \sigma} \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (2)$$

Wartość n jest tu znacznie większa niż wartości ułamkowe (≤ 1) podane wcześniej dla różnych reakcji białkowych, w tym fałdowania peptydu tworzącego helisę, asocjacji i dysocjacji ligandów, katalizy enzymatycznej i wydzielania komórkowego oraz reakcji przeniesienia elektronu, co sugeruje znacznie większe nadmierne tłumienie rozwijania cytochromu c.

Kinetic Solvent Viscosity Effects as Probes for Studying the Mechanisms of Enzyme Action

Giovanni Gadda, and Pablo Sobrado
Biochemistry, 57:3445-3453 (2018)

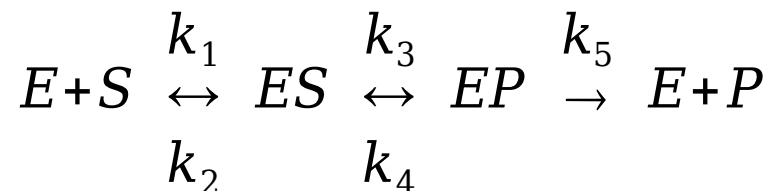


Niniejsza praca koncentruje się na wykorzystaniu kinetycznego wpływu lepkości rozpuszczalnika (KSVEs od kinetic solvent viscosity effects) do badania reakcji enzymatycznych. Technika ta jest łatwa do wdrożenia i wykorzystuje analizy kinetyczne w stanie ustalonym w celu sprawdzenia, czy wiązanie substratu jest kontrolowane przez dyfuzję i czy uwalnianie produktu jest etapem ograniczającym szybkość cyklu katalitycznego. Ponadto KSVE mogą zidentyfikować etapy izomeryzacji ważne dla katalizy. Zastosowanie KSVE w połączeniu z innymi technikami, takimi jak efekty izotopów kinetycznych, efekty pH i mutageneza ukierunkowana, może dostarczyć szczegółowego obrazu mechanizmu działania enzymu. Przedstawiamy podstawową teorię, ważne rozważania eksperymentalne i potencjalne wyniki oraz pokrótce omawiamy niektóre przykłady z literatury. Przedstawiono także wyprowadzenie równań istotnych dla analizy danych.

MIKROLEPKOŚĆ I MAKROLEPKOŚĆ ROZPUSZCZALNIKA

Lepkość rozpuszczalnika w roztworach wodnych można zwiększyć przez dodanie dodatków, przy czym najskuteczniejsze są związki polihydroksylowane. Istnieje ważne rozróżnienie pomiędzy mikrolepkością rozpuszczalnika i makrolepkością. Mikrolepkość rozpuszczalnika definiuje się jako opór ruchu cząsteczki w roztworze i jest istotnym parametrem fizyko-chemicznym w równaniu Stokesa-Einsteina. Makrolepkość rozpuszczalnika określa wolną objętość dostępną dla cząsteczki poruszającej się w roztworze. Ogólnie rzecz biorąc, w eksperymentach z KSVE stosuje się stosunkowo małe dodatki, takie jak glicerol, glukoza lub sacharoza, w celu zwiększenia mikrolepkości rozpuszczalnika. W przeciwieństwie do tego, dodatki polimerowe, takie jak Ficoll-400 lub glikol polietylenowy (PEG), są zwykle stosowane w celu zwiększenia makrolepkości rozpuszczalnika i mogą być stosowane jako kontrole dla KSVE, aby jednoznacznie wykazać, że obserwowany efekt lepkości rozpuszczalnika wynika z procesów dyfuzyjnych, a nie efektów zatłoczenia molekularnego. Zgodnie z tym badania wykazały, że dodatki o zwiększonej masie cząsteczkowej w mniejszym stopniu zmniejszają skuteczność katalityczną enzymów i spowalniają dyfuzję ligandów i procesy zwijania.

Autorzy rozważają schemat reakcji enzymatycznej w postaci:



i stwierdzają, że dla tego schematu reakcji:

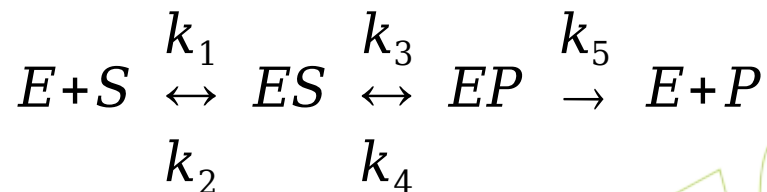
$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_3 k_5}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5} \quad k_{cat} = \frac{k_3 k_5}{k_3 + k_4 + k_5}$$

Porównajmy to z zapisami z wykładu poprzedniego:

$$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} EP \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} E+P$$

$$\frac{v}{c_E(0)} = \frac{\frac{k_2 k_3}{(k_{-2} + k_2 + k_3)} c_S(0)}{\frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_{-2} + k_2 + k_3)} + c_S(0)} \equiv \frac{k_{cat} c_S(0)}{K_m + c_S(0)}$$

Uważa się, że dyfuzja substratu i produktu do i z enzymu przy tworzeniu i rozpadzie kompleksów ES i EP jest odwrotnie proporcjonalna do tarcia wywieranego przez lepkość rozpuszczalnika



To sprawia, że stałe szybkości k_1 , k_2 i k_5 zależą od lepkości rozpuszczalnika. Na przykład:

$$k_1 = 4 \pi R^* (D_E + D_S) = 4 \pi (\sigma_E + \sigma_S) \left(\frac{kT}{6 \pi \eta \sigma_E} + \frac{kT}{6 \pi \eta \sigma_S} \right) = \frac{4 \pi k T}{6 \pi \eta} \left(\frac{\sigma_E + \sigma_S}{\sigma_E} + \frac{\sigma_E + \sigma_S}{\sigma_S} \right)$$

$$k_1 = \frac{2 k T}{3 \eta} \left(2 + \frac{\sigma_S}{\sigma_E} + \frac{\sigma_E}{\sigma_S} \right) \equiv k_1^\eta \Rightarrow k_1^\eta \eta = \frac{2 k T}{3} \left(2 + \frac{\sigma_S}{\sigma_E} + \frac{\sigma_E}{\sigma_S} \right)$$

Stąd wniosek autorów:

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_\eta = \frac{k_1^\eta k_3 k_5}{k_2^\eta (k_4 + k_5) + k_3 k_5}$$

$$(k_{cat})_\eta = \frac{k_3 k_5^\eta}{k_3 + k_4 + k_5^\eta}$$

Zauważmy, że autorzy ignorują zależność k_5 od lepkości w k_{cat}/K_m . Uwzględniają ją w wyrażeniu na k_{cat} . Z niezależności $k_1^\eta \cdot \eta$ i $k_2^\eta \cdot \eta$ od lepkości mamy:

$$k_1^0 \eta_0 = k_1^\eta \eta$$

$$k_2^0 \eta_0 = k_2^\eta \eta$$

$$\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta} = \frac{\frac{k_1^0 k_3 k_5}{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}}{\frac{k_1^\eta k_3 k_5}{k_2^\eta(k_4+k_5)+k_3 k_5}} = \frac{k_1^0}{k_1^\eta} \cdot \frac{k_2^\eta(k_4+k_5)+k_3 k_5}{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}$$

$$k_1^0 \eta_0 = k_1^\eta \eta \Rightarrow k_1^0 = k_1^\eta \cdot \frac{\eta}{\eta_0}$$

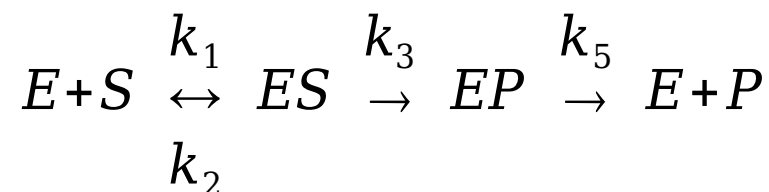
$$k_2^0 \eta_0 = k_2^\eta \eta \Rightarrow k_2^\eta = k_2^0 \cdot \frac{\eta_0}{\eta}$$

$$\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta} = \frac{k_1^\eta \cdot \frac{\eta}{\eta_0}}{k_1^\eta} \cdot \frac{\frac{\eta_0}{\eta} \cdot \frac{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}{k_2^0 \cdot (k_4+k_5)+k_3 k_5}}{\frac{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}{k_2^0 \cdot (k_4+k_5)+k_3 k_5}} = \frac{\eta}{\eta_0} \cdot \frac{\frac{\eta_0}{\eta} k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}$$

$$\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta} = \frac{k_3 k_5}{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} + \frac{k_2^0(k_4+k_5)}{k_2^0(k_4+k_5)+k_3 k_5}$$

Zatem $\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta}$ jest liniową funkcją $\frac{\eta}{\eta_0}$

Autorzy również rozważali schemat reakcji enzymatycznej w formie:



dla którego mamy:

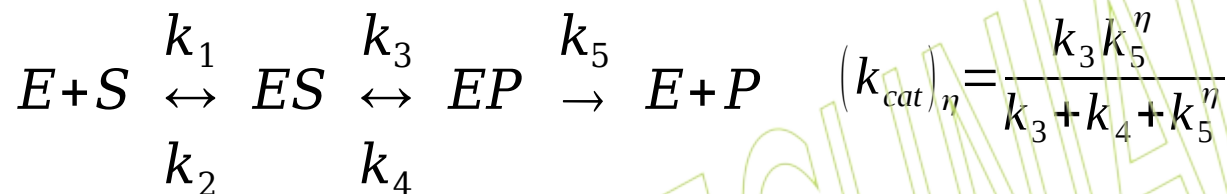
$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_3 k_5}{k_2 k_5 + k_3 k_5} = \frac{k_1 k_3}{k_2 + k_3} \quad k_{cat} = \frac{k_3 k_5}{k_3 + k_5}$$

i

$$\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta} = \frac{k_3 k_5}{k_2^0 k_5 + k_3 k_5} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} + \frac{k_2^0 k_5}{k_2^0 k_5 + k_3 k_5} = \frac{k_3}{k_2^0 + k_3} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} + \frac{k_2^0}{k_2^0 + k_3}$$

Można również rozważać $\frac{(k_{cat})_0}{(k_{cat})_\eta}$ dla obu schematów reakcji.

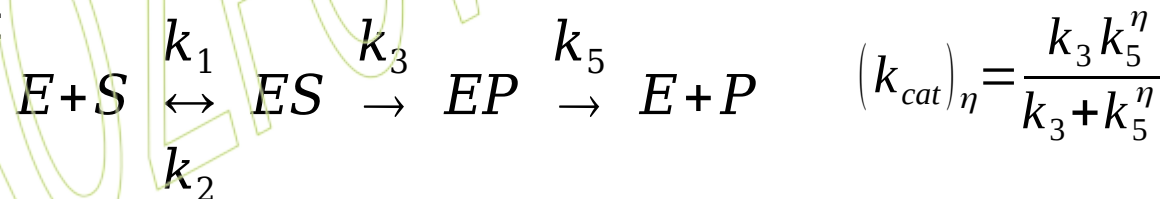
dla Schematu reakcji:



mamy:

$$\frac{(k_{cat})_0}{(k_{cat})_\eta} = \frac{\frac{k_3 k_5^0}{k_3 + k_4 + k_5^0}}{\frac{k_3 k_5^\eta}{k_3 + k_4 + k_5^\eta}} = \frac{k_3 k_5^0}{k_3 + k_4 + k_5^0} \cdot \frac{k_3 + k_4 + k_5^\eta}{k_3 k_5^\eta} = \frac{\eta}{\eta_0} \cdot \frac{k_3 + k_4 + k_5^0 \frac{\eta_0}{\eta}}{k_3 + k_4 + k_5^0} = \frac{k_3 + k_4}{k_3 + k_4 + k_5^0} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} + \frac{k_5^0}{k_3 + k_4 + k_5^0}$$

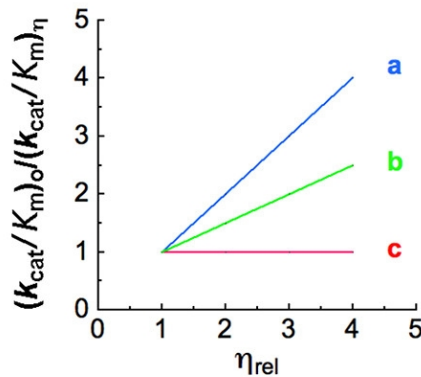
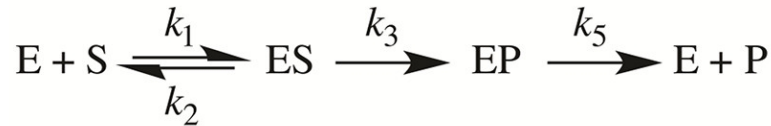
dla Schematu reakcji:



mamy:

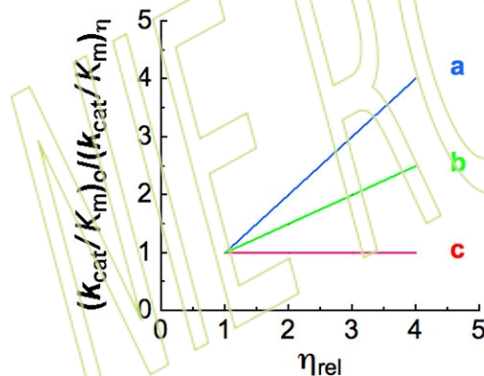
$$\frac{(k_{cat})_0}{(k_{cat})_\eta} = \frac{\frac{k_3 k_5^0}{k_3 + k_5^0}}{\frac{k_3 k_5^\eta}{k_3 + k_5^\eta}} = \frac{k_3 k_5^0}{k_3 + k_5^0} \cdot \frac{k_3 + k_5^\eta}{k_3 k_5^\eta} = \frac{k_3 + k_5^0 \frac{\eta_0}{\eta}}{k_3 + k_5^0} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{k_3}{k_3 + k_5^0} \cdot \frac{\eta}{\eta_0} + \frac{k_5^0}{k_3 + k_5^0}$$

A



case	slope (m)	requirement
a	$m = \frac{k_3}{k_3} = 1$	$k_2 \ll k_3$
b	$m = \frac{k_3}{k_2 + k_3}$	-
c	$m = \frac{k_3}{k_2} = 0$	$k_2 \gg k_3$

B



case	slope (m)	requirement
a	$m = \frac{k_3 k_5}{k_3 k_5} = 1$	$k_2 \ll k_3, k_4 \ll k_5$
b	$m = \frac{k_3 k_5}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5}$	-
c	$m = \frac{k_3 k_5}{k_2 k_4} = 0$	$k_2 \gg k_3, k_4 \gg k_5$

Wykresy $(k_{cat}/K_m)_o / (k_{cat}/K_m)_\eta$ w funkcji η_{rel} dla (A) nieodwracalnej i (B) odwracalnej reakcji enzymatycznej. Ogólny opis analityczny nachylenia podano w przypadku **b**, przy czym przypadki **a** i **c** reprezentują reakcje kontrolowane odpowiednio przez dyfuzję substratu i etap chemiczny.

Kinetic and Structural Characterization of Trypanosoma cruzi Hypoxanthine–Guanine–Xanthine Phosphoribosyltransferases and Repurposing of Transition-State Analogue Inhibitors

Kayla Glockzin, Kathleen M. Meneely, ..., Thomas D. Meek,* and Ardala Katzfuss*
Biochemistry 2023, 62, 2182–2201

Fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowo-ksantynowe (HGXPRT) to enzymy transferazy katalizujące tworzenie monofosforanów inozyny, guanozyny i ksantozyny z 5-fosfo-D-rybozo-1-pirofosforanu (PRPP) i zasad nukleinowych: hipoksantyny (Hx), guaniny (Gua) i ksantyny (Xan), odpowiednio. Enzymy te stanowią obiecujące cele w leczeniu zakażenia chorobą Chagasa (CD), wywoływaną przez pasożyta Trypanosoma cruzi, który jest przenoszony na zwierzęta i ludzi przez wektory-owadzie i występuje tylko w obu Amerykach (głównie na obszarach wiejskich Ameryki Łacińskiej, gdzie bieda jest powszechna).

Wpływ lepkości na kinetykę TcHGXPRT był określany przez pomiary prędkości początkowej przy zmieniającej się lepkości względnej (η_{rel}). Mieszaniny reakcyjne zawierające 0, 4, 8 lub 12% (v/v) gliceryny (mikrowiskozogen; $\eta_{rel} = 1-1.45$) albo 0, 0.5, 1, lub 2% (w/v) PEG10000 (makrowiskozogen; $\eta_{rel} = 1-1.46$) były użyte aby wyznaczyć ich wpływ na szybkości początkowe. Wartości lepkości kinematycznej, $\eta_{kinematic}$ były mierzone przy użyciu lepkościomierza kapilarnego Cannon-Fenske. Dynamiczne lepkości η były otrzymane z pomnożenia lepkości kinematycznych przez gęstość rozpuszczalnika. Unormowane parametry kinetyczne, tj.

$$\frac{(k_{cat}/K_m)_0}{(k_{cat}/K_m)_\eta} \quad \text{lub} \quad \frac{(k_{cat})_0}{(k_{cat})_\eta}$$

były analizowane tak samo jak opisano w Biochemistry, 57:3445-3453 (2018).



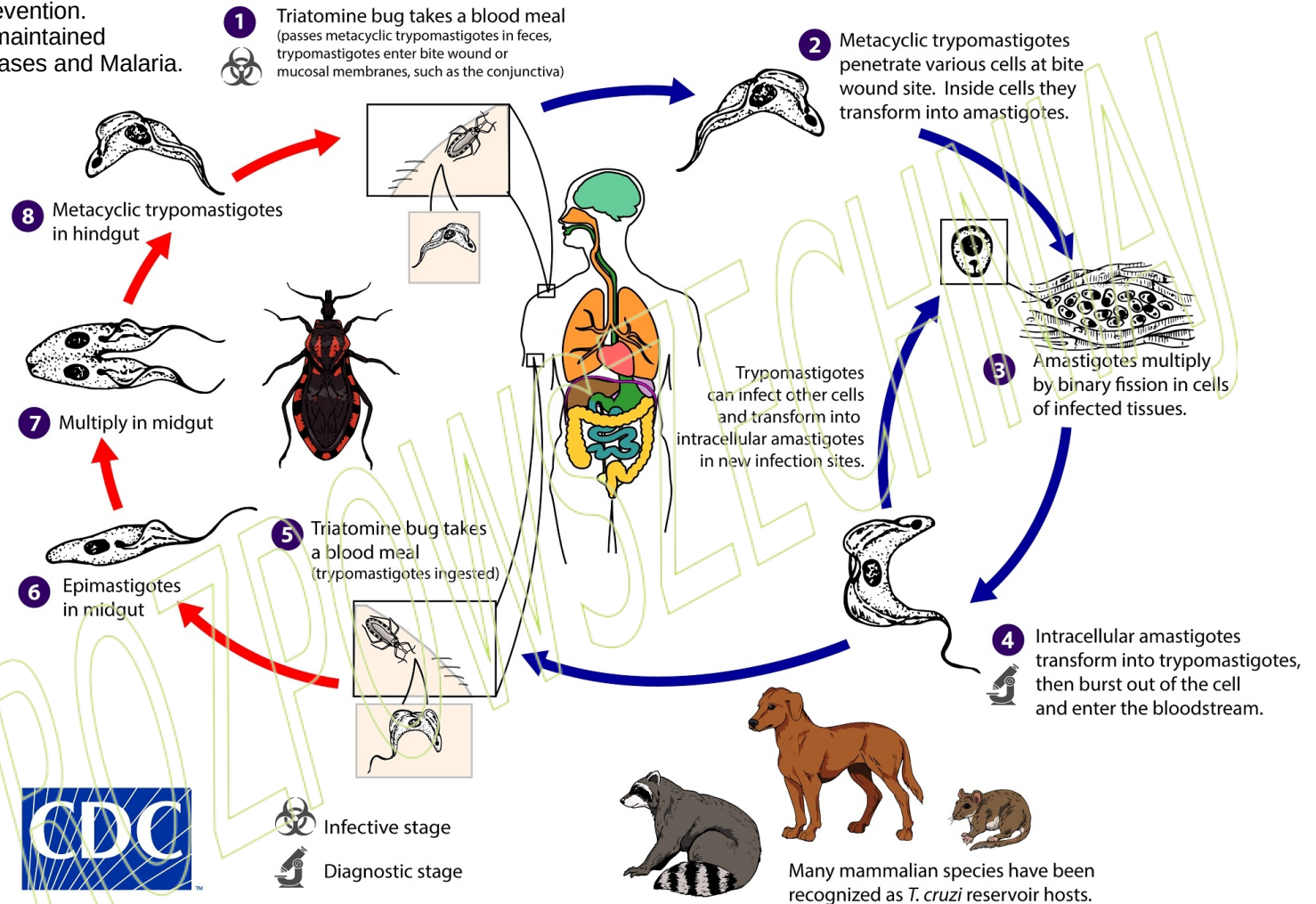
Trypanosoma cruzi



Centers of Disease Control and Prevention.
DPDx is a website developed and maintained
by CDC's Division of Parasitic Diseases and Malaria.

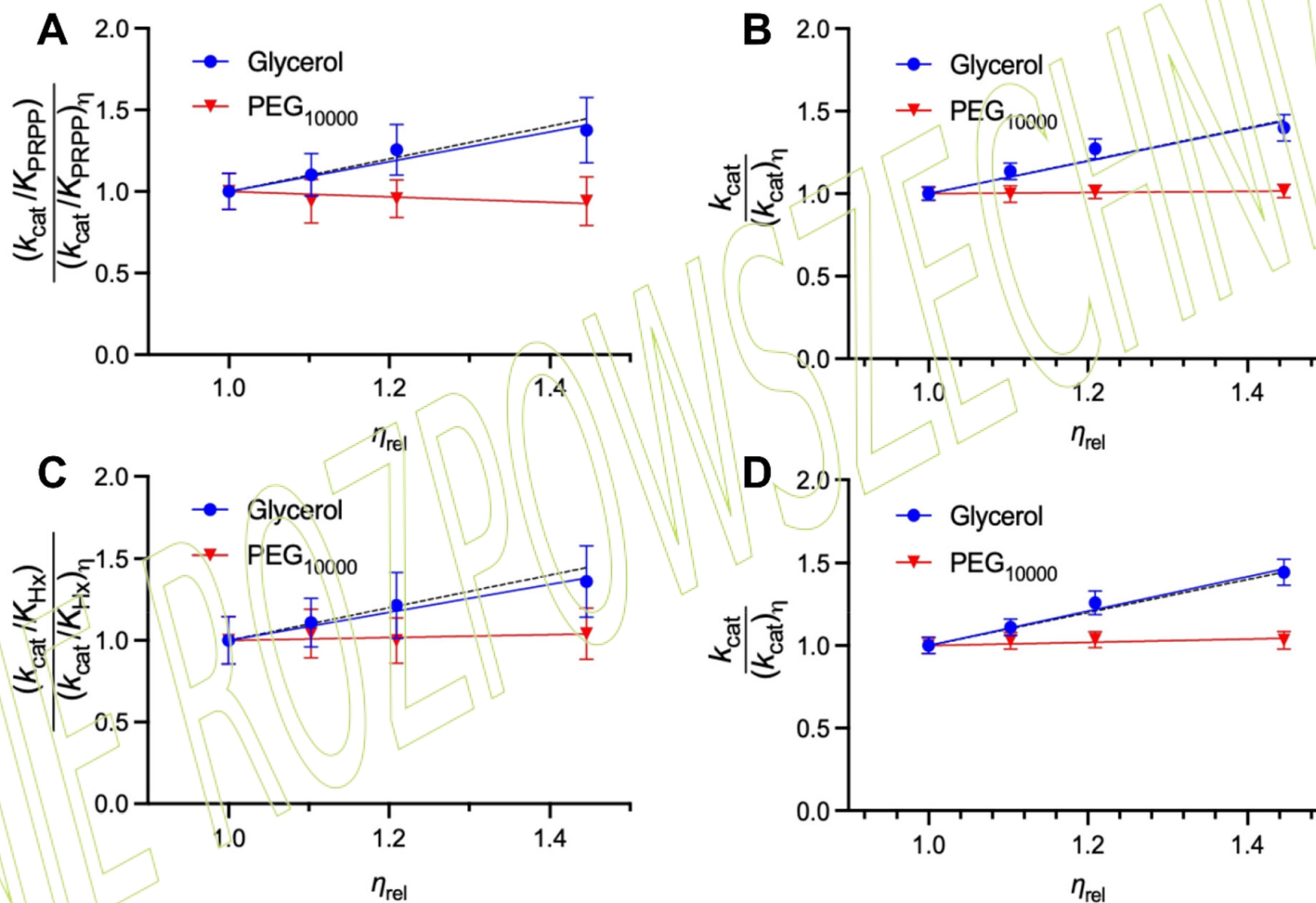
Triatomine Bug Stages

Mammalian Stages



Choroba Chagasa – choroba pasożytnicza wywoływana przez świdrowca *Trypanosoma cruzi*, przenoszona na człowieka i zwierzęta przez pluskwiaki z podrodziny *Triatominae*, z rodzaju *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*. Choroba Chagasa występuje endemicznie w Ameryce Południowej i Środkowej (choruje kilkanaście milionów ludzi, co roku umiera około 50 tysięcy). Spotykana jest niemal wyłącznie na obszarach wiejskich. Najczęstszym rezerwuarem w naturalnym środowisku są oposy i pancerniki, rzadziej gryzonie, małpy oraz zwierzęta domowe. Do zarażenia dochodzi głównie przez dostanie się wydalin krwio pijnego pluskwiaka przez uszkodzoną skórę człowieka lub rzadziej przez jego ukąszenie, także spożycie pokarmów zanieczyszczonych wydalninami pluskwiaków, przetaczanie krwi osoby zarażonej, drogą wertykalną z zarażonej matki na płód oraz z mlekiem matki na niemowlę.

Dane dotyczące szybkości początkowej zebrano przy nasycającym stężeniu Hx (120 μM) i zmiennych stężeniach PRPP (0–300 μM) lub przy nasycającym stężeniu PRPP (1 mM) i zmiennych stężeniach Hx (4,7–150 μM), przy stałych stężeniach wiskozogenu (glicerol: 0, 4, 8 i 12% v/v lub PEG₁₀₀₀₀: 0, 0,5, 1 i 2% w/v). Mikrowiskozogeny, takie jak glicerol, wpływają na dyfuzyjne etapy katalizy, podczas gdy makrowiskozogeny, takie jak PEG₁₀₀₀₀, służą jako kontrola zapewniająca, że obserwowane efekty wynikają z dyfuzji, a nie efektu objętości wyłączonej.



Wpływ lepkości na kinetykę TcHGXPRT, wartości (A) $k_{\text{cat}}/K_{\text{PRPP}}$ i (B) k_{cat} przy zmiennym stężeniu PRPP, i wartości (C) $k_{\text{cat}}/K_{\text{Hx}}$ i (D) k_{cat} przy zmiennym stężeniu Hx w obecności gliceryny (niebieskie kółka). Referencyjne linie przerywane (czarne) o nachylenie 1 są pokazane na każdym wykresie. Kinetyczne parametry nie zmieniały się znacząco przy rosnących stężeniach PEG₁₀₀₀₀ (czerwone trójkąty).