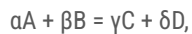


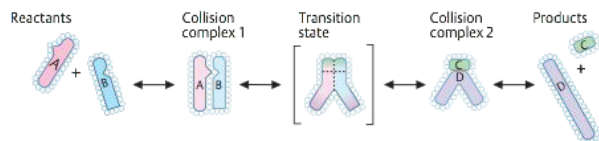
## przebieg reakcji

Dla reakcji:

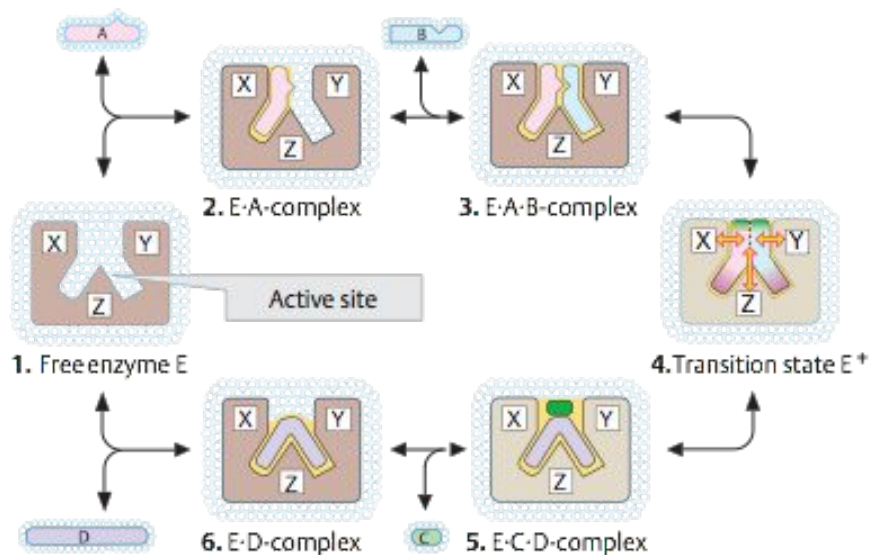


- substraty A i B znajdujące się w roztworze wodnym są otoczone cząsteczkami wody (powłoczka hydratacyjna).

Poruszają się w różnych kierunkach cząsteczki te mogą przereagować tylko jeżeli zderzą się ze sobą w odpowiedniej orientacji – co następuje rzadko.

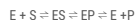


## aspekty katalizy enzymatycznej



## moc katalityczna

Enzymy nie zmieniają równowagi chemicznej reakcji tylko powodują jej przyspieszenie. Równanie najprostszej reakcji enzymatycznej ma postać:



Bariera energetyczna pomiędzy S a P jest energią potrzebną do:

- przemieszczenia reagujących grup,
- tworzenia przejściowych,
- niestabilnych zmian ładunków cząsteczek,
- rearanżacji wiązań i innych przemian niezbędnych do zajścia reakcji.

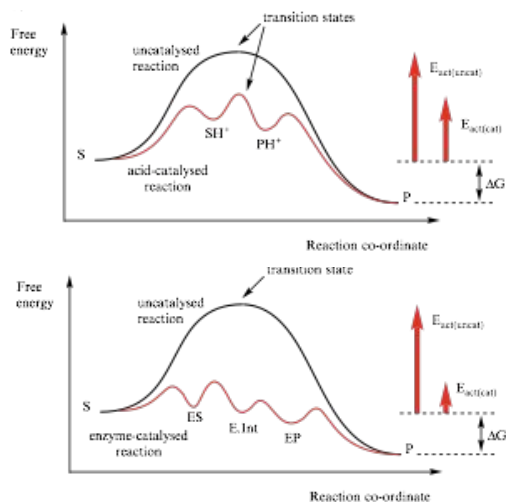
Wszystko to obrazuje pik na wykresie energii związanej z reakcją enzymatyczną

Wierzchołek tego piku jest punktem w którym rozpad kompleksu z enzymem do S i E lub P i E jest równie prawdopodobne – punkt ten nazywamy stanem przejściowym.

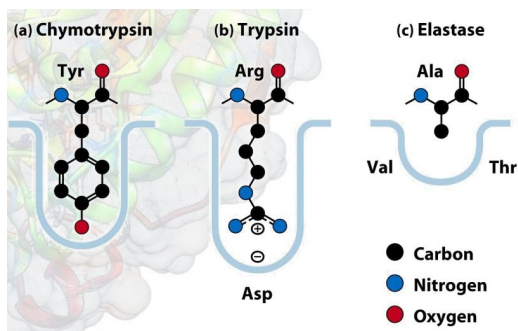
Jest to stan energetyczny a nie żaden pośredni etap reakcji, czy związek pośredni – jest to płynny moment, w którym zrywanie wiązań, tworzenie wiązań czy przenoszenie ładunków dochodzi do takiego momentu, gdzie równie prawdopodobne jest uzyskanie S jak i P.

Różnica między energią (potencjałem) produktu i substratu do energii aktywacji  $\Delta G^\ddagger$  – energię tą można obniżyć poprzez dodanie katalizatora – enzymu

Katalizator zwiększa szybkość reakcji poprzez obniżenie energii aktywacji.



## specyficzność enzymów



- Każdy enzym jest specyficzny w działaniu i katalizuje tylko jedną lub kilka powiązanych reakcji chemicznych.
- Specyficzność enzymów jest wynikiem unikalnej struktury i kształtu aktywnego miejsca, w którym substrat łączy się z enzymem.
- Aktywne miejsce enzymu ma specyficzne grupy funkcyjne, które oddziałują z substratem i umożliwiają przeprowadzenie reakcji chemicznej.
- Specyficzność enzymów jest kluczowa dla utrzymania homeostazy organizmu, ponieważ każda reakcja musi być przeprowadzana z dokładnością i skutecznością.
- Specyficzność enzymów może być modyfikowana przez zmiany warunków fizycznych i chemicznych, takich jak pH, temperatura, ilość substratu i inhibitorów.
- Przykładem specyficzności substratowej są trzy proteazy: trypsyna, chymotrypsyna oraz elastaza – katalizują tę samą reakcję hydrolizy wiązania peptydowego, lecz dokonują tego na różnych odcinkach łańcucha polipeptydowego substratu.

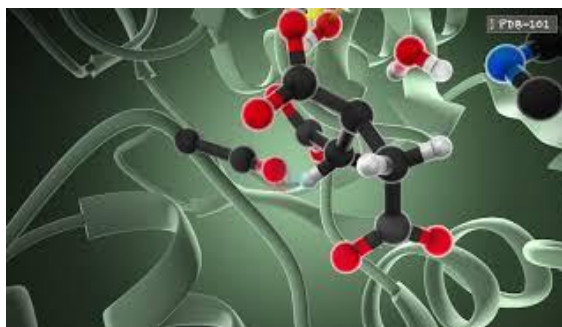
## regulacja aktywności enzymatycznej

To które reakcje chemiczne i z jaką szybkością zachodzą w organizmie można regulować na różne sposoby, aby zaspokoić potrzeby metaboliczne komórki. Nie wszystkie enzymy w organizmie człowieka są poddawane regulacji.

- Główne rodzaje regulacji aktywności enzymów:
  - Regulacja allosteryczna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez wiązanie cząsteczki w innym miejscu niż miejsce aktywne enzymu. Wiązanie cząsteczki może aktywować lub hamować enzym.
  - Regulacja izosteryczna: Aktywność enzymu jest regulowana w miejscu aktywnym poprzez związanie określonych aktywatorów/inhibitorów reakcji
  - Modyfikacja kowalencyjna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez dodanie lub usunięcie grupy chemicznej, takiej jak np. grupa fosforanowa, metylowa, ubikwitynowa. Te modyfikacje mogą aktywować lub hamować enzym.
  - Proteolityczna aktywacja niektórych enzymów: proteolityczne odcięcie zbędnego fragmentu białkowego u niektórych enzymów powoduje jego aktywację.
- Reakcje chemiczne zachodzące w organizmie mogą być również regulowane poprzez kontrolę poziomu biosyntezy poszczególnych enzymów (operony, ryboprzełączniki, hormony, degradacja enzymów)
- Występowanie izozymów o różnej aktywności enzymatycznej pozwala kontrolować szybkość niektórych reakcji chemicznych
- Szybkość reakcji chemicznych w organizmie (i nie tylko) może być regulowana również poprzez zmiany stężeń substratów, stosunku stężeń substraty/produkty, zmiany dostępności kofaktorów, wartości pH, temperatury itd.

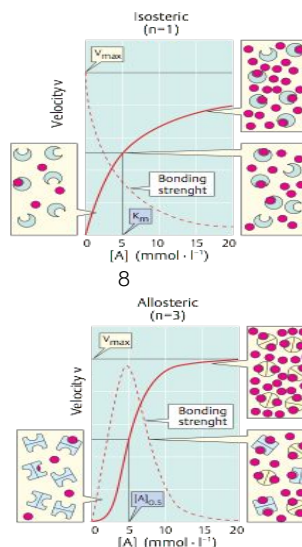
## kinetyka enzymów

- Kinetyka enzymatyczna zajmuje się badaniem przebiegu reakcji (przede wszystkim szybkości) biochemicznych z udziałem katalizatorów, którymi w tym przypadku są enzymy.
- Określenie kluczowych parametrów kinetycznych w różnych warunkach pozwala dowiedzieć się jak szybko działa enzym, jak mocno wiąże substraty aby stworzyć kompleks enzym-substrat (ES), który jest kluczowy dla katalizy, ale również jak bardzo specyficzny jest enzym w stosunku do struktury substratu i jak wpływają na jego działanie różne związki: inhibitory i aktywatory katalizy.
- Szybkość reakcji katalizowanej enzymatycznie zależy od szeregu czynników. Najważniejsze to:
  - Stężenie substratu/enzymu/produktu
  - Temperatura
  - pH środowiska
  - Obecność i stężenie kofaktorów
  - Obecność i stężenie aktywatorów
  - Obecność i stężenie inhibitorów



## kinetyka enzymów

- Enzymy mogą występować w wielu konformacjach, które różnią się właściwościami katalitycznymi i których udział w całkowitej liczbie cząsteczek enzymu zmienia się w zależności od obecności substratu lub ligandów.
- Enzymy allosteryczne występują zazwyczaj jako oligomery i charakteryzują się sigmoidalną krzywą wysycenia substratem, co uniemożliwia opisanie ich równaniem M-M. W przypadku enzymów allosterycznych wydajność wiązania substratu wzrasta wraz ze wzrostem  $[A]$ , ponieważ wolny enzym występuje w „słabo-wiążącej” konformacji i zostaje przekształcony w „silnie-wiążącą” pod wpływem połączenia z A.
- Oczywiście może do tego dojść tylko przy wysokim stężeniu A, przy braku wolnych miejsc do jego wiązania siła wiązania ponownie spada, zatem powinowactwo enzymów allosterycznych nie jest stałe i zależy od typu i stężenia ligandu
- Enzymy izosteryczne występują tylko w jednej formie i wydajność wiązania substratu wzrasta stale wraz z wzrastającym  $[A]$ , ponieważ liczba wolnych cząsteczek enzymu sukcesywnie maleje.



## szybkość reakcji

Równanie Arrheniusa

równanie, podane przez szwedzkiego chemika Svantea Arrheniusa, wyrażające zależność stałej szybkości reakcji od temperatury.

Stała szybkości k zależy od:

- częstotliwości zderzeń między cząsteczkami (A),
- temperatury (T),
- energii aktywacji (E<sub>a</sub>) reakcji chemicznej.

Enzymy zatem obniżając energię aktywacji reakcji wpływają bezpośrednio na stałą szybkości reakcji podwyższając ją.

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

$k$  – stała szybkości reakcji,

$A$  – czynnik przedeksponencjalny związany z częstością zderzeń skutecznych w danej reakcji

$e$  – podstawa logarytmu naturalnego,

$E_a$  – energia aktywacji reakcji (J · mol<sup>-1</sup>),

$T$  – temperatura (K),

$R$  – uniwersalna stała gazowa wynosząca 8,31446261815324 J · mol<sup>-1</sup> · K<sup>-1</sup>.



## przebieg reakcji enzymatycznej

Na całkowitą szybkość takiej reakcji wpływać będą wszystkie jej poszczególne procesy:

- szybkość tworzenia się kompleksu ES jak również szybkość rozpadu kompleksu ES w kierunku substratów
- szybkość rozpadu kompleksu ES w kierunku produktów

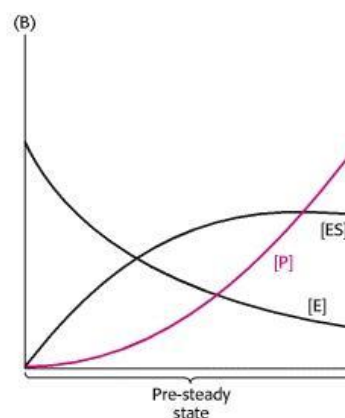
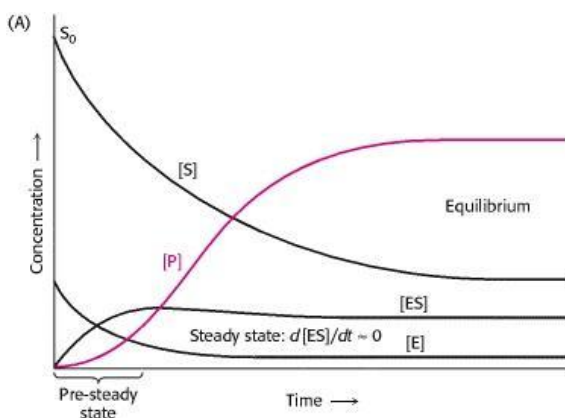
Oczywiście stopień w jakim dany proces będzie wpływać na całkowitą szybkość reakcji nie jest taki sam i zależy od szybkości danego procesu (np. proces rozpadu ES z powrotem do substratów może być często zdecydowanie wolniejszy niż proces tworzenia kompleksu ES). Co więcej, szybkość reakcji jest najbardziej ograniczana i stąd też limitowana przez jej najwolniejszy etap.

Równanie szybkości tworzenia się produktów wyglądać będzie następująco:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$$



## przebieg reakcji enzymatycznej



## model Michaelis-Menten

Leonor Michaelis

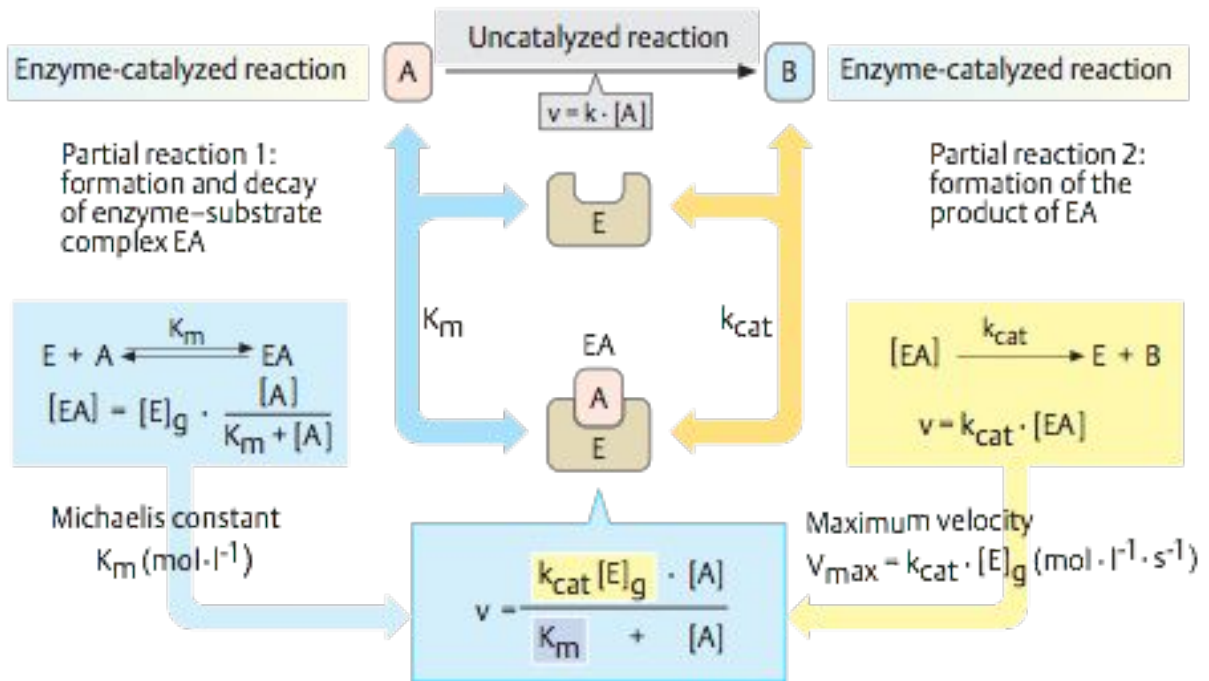


**Born** 16 January 1875  
Berlin, German Empire  
**Died** 8 October 1949 (aged 74)  
New York City, United States  
**Nationality** German

Maud Leonora Menten



**Born** 20 March 1879  
**Died** July 17, 1960 (aged 81)  
Leamington, Ontario, Canada  
**Nationality** Canadian



## Kinetyka enzymów

Fizjologiczna interpretacja stałej Michaelisa

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Równanie Michaelisa-Menten

- Parametr  $K_M$  znany jest jako **stała Michaelisa**, a jego wartość zależy od konkretnego enzymu. Wartość  $K_M$  może jednak również zmieniać się w zależności od warunków otoczenia takich jak np. temperatura czy pH.
- Stała Michaelisa opisuje stężenie substratu, które jest wymagane, aby osiągnąć dokładnie połowę szybkości maksymalnej reakcji. Ten fakt oznacza również, że jest to stężenie substratu przy którym dokładnie połowa cząsteczek enzymu jest związana z substratem w kompleksie ES.



Przy  $[S] = K_M$ :

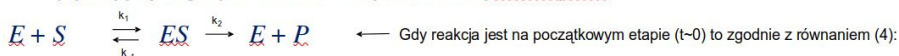
$$V_0 = \frac{V_{max}}{2}$$

$$[ES] = \frac{[E]_0}{2}$$

# Kinetyka enzymów

## Fizjologiczna interpretacja stałej Michaelisa

- Stać Michaelisa może być również interpretowana w odniesieniu do poszczególnych stałych szybkości, które pojawiają się w ogólnym schemacie reakcji katalizowanej enzymatycznie:



$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

- Aby lepiej dostrzec inne znaczenie stałej Michaelisa musimy poczynić pewne założenie. Przyjmijmy, że dla powyższego schematu reakcja dysocjacji kompleksu ES do substratów jest znacznie szybsza niż rozpadu kompleksu ES w kierunku produktów. W takich warunkach  $k_{-1} \gg k_2$  i w równaniu (4) stałą szybkości  $k_2$  można pominąć:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$$

W takiej sytuacji  $K_M$  opisuje stałą równowagi dysocjacji kompleksu ES:



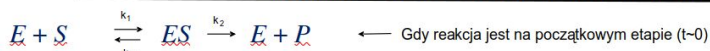
W stanie równowagi możemy zapisać:

$$k_{-1} [ES] = k_1 [E][S] \quad \Rightarrow \quad \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_{eq} = K_M$$

- Zatem kiedy  $k_{-1} \gg k_2$ , stała Michaelisa opisuje prawdopodobieństwo dysocjacji kompleksu enzym-substrat:
  - Jeśli wartość  $K_M$  jest duża to enzym słabo wiąże substrat i istnieje duże prawdopodobieństwo dysocjacji substratu z miejsca aktywnego enzymu
  - Jeśli wartość  $K_M$  jest mała to enzym mocno wiąże substrat i istnieje małe prawdopodobieństwo dysocjacji substratu z miejsca aktywnego enzymu
- Podsumowując, stała  $K_M$  może być poniekąd narzędziem do oceny powinowactwa enzymu do substratu

# Kinetyka enzymów

## Szybkość maksymalna reakcji i liczba obrotowa enzymu



- Równaniem szybkości tworzenia się produktu jest równanie (1):  

$$V_0 = k_2 [ES]$$
- Kiedy wszystkie miejsca aktywne enzymu wypełnione są substratem, wtedy  $[ES] = [E]_0$ . W takiej sytuacji reakcja przebiega z maksymalną szybkością  $V_{max}$   

$$V_{max} = k_2 [E]_0$$
- Szybkość maksymalna enzymu opisuje również największą liczbę cząsteczek substratu, która może zostać przekonwertowana w produkt w określonej jednostce czasu (jednostka szybkości maksymalnej reakcji ma wymiar liczby moli/stężenia powstającego produktu w czasie).
- Przekształcając powyższe równanie do  $k_2$  otrzymujemy wyrażenie na liczbę obrotową enzymu (oznaczane również  $k_{cat}$ ), która mówi nam o maksymalnej liczbie cząsteczek substratu konwertowanych do produktów w określonej jednostce czasu przez jedno miejsce aktywne jednego enzymu.  

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$$

Dla przykładu:

Załóżmy, że prowadzimy reakcję chemiczną katalizowaną enzymem, którego stężenie całkowite wynosi 0,1 M. Dla takiego stężenia enzymu (zakładając jego pełne wysycenie substratem) maksymalna szybkość reakcji wynosi 60 000 M/s. Zatem:

$$k_{cat} = \frac{60\,000 \text{ M/s}}{0,1 \text{ M}} = 600\,000 \text{ s}^{-1}$$

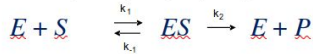
W tym przypadku jedno miejsce aktywne jest zdolne do konwersji 600 000 cząsteczek substratu na sekundę! (anhidraza węglanowa)

Obliczając odwrotność liczby obrotowej enzymu dowiemy się z kolei ile czasu trwa konwersja jednego substratu w produkt:

$$\frac{1}{k_{cat}} = \frac{1}{600\,000 \text{ s}^{-1}} = 1,67 \times 10^{-6} \text{ s} = 1,67 \mu\text{s}$$

## Kinetyka enzymów – wydajność katalityczna enzymów

- Przebieg reakcji enzymatycznej można schematycznie rozpisać następująco gdy (t=0):



- Gdy założymy nieodwracalność (w związku z analizowaniem reakcji w t=0) reakcji rozpadu ES w kierunku produktów to szybkość tworzenia się produktu można wyrazić równaniem (1):

$$V_0 = k_{kat} [ES]$$

- Natomiast zgodnie z równaniem (5):

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

- Podstawiając równanie (5) do (1) otrzymujemy:

$$V_0 = \frac{k_{kat}}{K_M} [E][S]$$

- Równanie to pozwala zrozumieć w jaki sposób enzymy działają w warunkach fizjologicznych czyli kiedy  $[S] \ll K_M$

$$\text{Kiedy } [S] \ll K_M \quad \text{to} \quad [E]_0 = [E] + [ES] \approx [E]$$

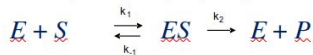
Zatem:

$$V_0 = \frac{k_{kat}}{K_M} [E]_0 [S]$$

- Zgodnie z tym równaniem, szybkość reakcji enzymatycznych zachodzących w warunkach fizjologicznych zależy od:
  - Stężenia substratu
  - Stężenia enzymu
  - Stosunku  $\frac{k_{kat}}{K_M}$ , który jest stałą w równaniu

## Kinetyka enzymów – wydajność katalityczna enzymów

- Przebieg reakcji enzymatycznej można schematycznie rozpisać następująco gdy (t=0):



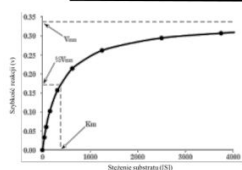
- Wydajność katalityczna enzymów zależy od stosunku  $\frac{k_{kat}}{K_M}$  :
  - $k_{kat}$  mówi nam jak dużo cząsteczek substratu ulega konwersji do produktów przez pojedyncze miejsce aktywne w określonej jednostce czasu
  - $K_M$  określa powinowactwo enzymu do substratu (mała wartość  $K_M$  oznacza silne wiązanie)
  - Stosunek tych dwóch parametrów może być zatem stosowany do oceny wydajności katalitycznej poszczególnych enzymów:

$$\frac{k_{kat}}{K_M}$$

Duża wartość stosunku tych dwóch stałych (jak najwyższe  $k_{kat}$  przy jak najniższym  $K_M$  wskazuje na wysoką wydajność katalityczną enzymu).

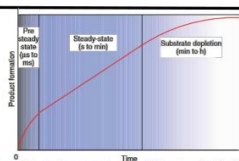


## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych



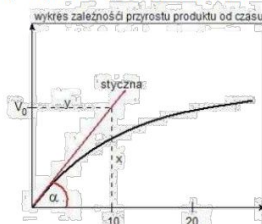
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Równanie Michaelisa-Menten



Schemat przedstawia krzywą postępu reakcji z uwzględnieniem 3 faz reakcji: okres przed ustaleniem się stanu stacjonarnego, stan stacjonarny oraz okres w którym zaczyna brakować substratu

- Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla konkretnego enzymu bardzo często polega na wykreśleniu zależności szybkości początkowej reakcji  $V_0$  od stężenia substratu (prawdziwe dla enzymów działających zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten).
- WAŻNE:** Poszczególne szybkości początkowe reakcji mierzy się najczęściej poprzez przeprowadzenie serii eksperymentów ze zmieniającym się stężeniem substratu.
- Aby skonstruować powyższy wykres, potrzebujemy ustalić wartości początkowych szybkości reakcji ( $V_0$ ) dla różnych stężeń substratów. W praktyce najczęściej wykonuje się serię eksperymentów, w których mierzy się przyrost produktu/ubytek substratu w czasie. Po wykreśleniu zależności zmiany stężenia  $\Delta C$  (lub  $\Delta n$ ) od czasu (krzywa postępu reakcji; ang. *progress curve*), obliczamy szybkość początkową na podstawie nachylenia stycznej do początkowego odcinka krzywej postępu reakcji.
- Przyrost produktu/ubytek substratu można mierzyć za pomocą różnych metod. W zależności od wybranej metody, bardzo często należy przeliczyć badany parametr na stężenie (np. w przypadku pomiarów absorbancji, po procesie należy przeliczyć uzyskane wartości tak aby dawały informację nie tyle na temat zmiany absorbancji w czasie, a zmiany stężenia w czasie.)



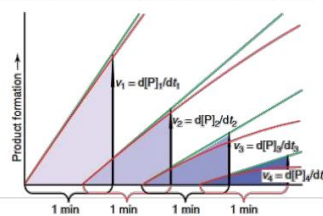
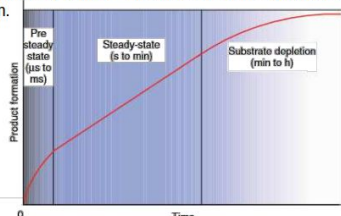
### Metoda wyznaczania

- Na wykresie zależności przyrostu produktu od czasu, należy wyznaczyć STYCZNĄ do krzywej wykresu.
- Należy zmierzyć kąt  $\alpha$  (pomiędzy krzywą wykresu, a wyznaczoną styczną).
- Obliczamy  $\tan$  (tangens) kąta  $\alpha$ , który równy jest wartości prędkości początkowej

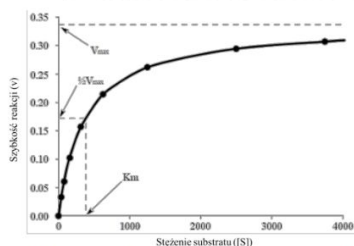
$$\tan \alpha = \frac{v}{t} = V_0$$

## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Liniowy przebieg wykresu na krzywej postępu reakcji jest dobrym wskaźnikiem występowania warunków stanu stacjonarnego i spełniania warunków kinetyki Michaelisa-Menten.
- Takie warunki najłatwiej zapewnić poprzez stosowanie wysycających stężeń substratu. Całkowite wysycenie enzymu substratem występuje jednak tylko przy nieskończonych stężeniach substratu, podczas gdy w rzeczywistych warunkach nasycenie to nie jest całkowite i zmniejsza się w trakcie przebiegu reakcji z powodu konwersji substratu.
- Dlatego ścisłej liniowości na wykresie krzywej postępu reakcji można oczekiwać tylko na początku reakcji, gdy stężenie substratu jest bardzo duże. W trakcie postępu reakcji jej szybkość spada i wykres zaczyna odbiegać od liniowości. Z tego powodu wartość szybkości reakcji nie powinna być szacowana bezpośrednio z krzywej postępu, a raczej ze stycznej poprowadzonej do początkowego zakresu liniowego. Nachylenie stycznej wyrażone jako stężenie substratu lub produktu przekształconego lub utworzonego w jednostce czasu, daje nam wartość szybkości początkowej reakcji ( $V_0$ ).
- Jeśli stężenie substratu ulega redukcji w serii doświadczeń lub jeśli nie można uzyskać wyższych stężeń substratu (np. z powodu jego niskiej rozpuszczalności), analiza szybkości początkowej staje się trudniejsza, zakres liniowy staje się krótszy, a odchylenie od liniowości bardziej wyraźne.
- Jeśli jednak zakres liniowy staje zbyt krótki, warunki stanu stacjonarnego i w efekcie ważność równania Michaelisa-Menten nie są dłużej spełniane i oszacowywanie parametrów kinetycznych z takich danych wiąże się z dużym błędem.



## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych



$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Równanie Michaelisa-Menten

- Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla konkretnego enzymu bardzo często polega na wykreśleniu zależności szybkości początkowej reakcji  $V_0$  od stężenia substratu (prawdziwe dla enzymów działających zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten).
- WAŻNE:** Poszczególne szybkości początkowe reakcji mierzy się najczęściej poprzez przeprowadzenie serii eksperymentów ze zmieniającym się stężeniem substratu.
- W wyniku przeprowadzonych eksperymentów możliwe jest wykreślenie wykresu  $V_0$  (oznaczone na wykresie przez  $v$ ) od  $[S]$  (wykres Michaelisa-Menten). Z uwagi jednak na hiperboliczny charakter tej funkcji (i asymptotyczne zbliżanie się  $V_0$  do  $V_{max}$ ) trudno jest precyzyjnie ustalić dokładną wartość  $V_{max}$ . Problem w ustaleniu dokładnej wartości  $V_{max}$  przekłada się również na trudność w ustaleniu wartości  $K_M$ .
- Wspomniane wyżej ograniczenia w wyznaczaniu stałych kinetycznych można przezwyciężyć przekształcając równanie Michaelisa-Mentena w taki sposób, aby przedstawiało zależność liniową. Można wyprowadzić trzy równoważne transformacje (metody linearyzacji):
  - Linearyzacja Lineweavera-Burka
  - Linearyzacja Hanes'a (Woolfa-Hanes'a)
  - Linearyzacja Eadie-Hofstee'ego

## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Najprostszą i najbardziej popularną metodą linearyzacji jest linearyzacja Lineweavera-Burka, która jest odwrotnością równania Michaelisa-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} [S]} \quad \text{Równanie Lineweavera-Burka}$$

- Równanie to daje linię prostą na wykresie zależności  $1/v$  od  $1/[S]$ . Wykres ten znany jest jako diagram Lineweavera-Burka:

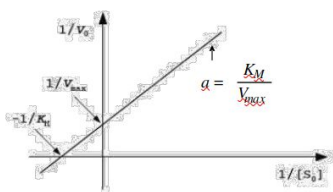


Diagram Lineweavera-Burka to jedna z metod linearyzacji wykresu Michaelisa-Menten. Odwrócenie prawej i lewej strony w równaniu Michaelisa-Menten i wykreślenie zależności  $1/V_0$  od  $1/[S]$  umożliwia oszacowanie parametrów kinetycznych enzymu

- Równanie to opisuje linię prostą i ma postać  $y = ax + b$ . Wykres zależności  $1/V_0$  od  $1/[S]$  jest liniowy z nachyleniem  $a = K_M/V_{max}$  i punktem przecięcia osi  $y$  w  $1/V_{max}$ . Gdy zastosowane stężenie substratu  $[S]$  dąży do nieskończoności (a więc  $1/[S]$  na osi  $X$  jest równe zero), punkt przecięcia na osi  $Y$  powinien odnosić się do szybkości maksymalnej więc pośrednio również do stałej szybkości  $K_{cat}$ . Chociaż osiągnięcie nieskończonej ilości substratu jest niemożliwe w praktyce, dzięki tej liniowej transformacji możliwa jest ekstrapolacja przez co  $V_{max}$  można wygodnie oszacować. Wartość  $K_M$  można z kolei uzyskać zarówno z nachylenia prostej jak i niezależnie z punktu przecięcia linii z osią  $x$ .
- Linearyzacja Lineweavera-Burka jest najczęściej wykorzystywaną metodą linearyzacji, posiada jednak pewne wady związane z błędami w dokładnym oszacowaniu parametrów kinetycznych dlatego też zaproponowano inne przekształcenia równania Michaelisa-Menten.



## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Linearyzację Hanesa uzyskuje się poprzez pomnożenie obu stron równania Lineweavera-Burka przez stężenie substratu [S] oraz wykreślenie zależności pomiędzy [S]/v a [S]:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} [S]} \quad \text{Równanie Lineweavera-Burka}$$

↓ × [S]

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \quad \text{Równanie Hanesa}$$

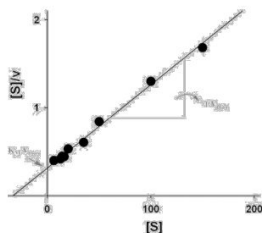


Diagram Hanes'a (Woolfa-Hanes'a)

- Wykreślenie zależności [S]/v od [S] daje linię prostą o dodatnim nachyleniu  $1/V_{max}$  oraz punktach przecięcia:  $K_M/V_{max}$  (z osią y) i  $K_M$  (z osią x). Wykres Hanes'a eliminuje problemy z niedokładnością oszacowania parametrów jednak posiada wadę, gdyż zmienna [S] występuje na obu osiach. Stąd każdy błąd eksperymentalny w odmierzeniu [S] przeniesie się na wynik w obu wymiarach.

## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Ostatnia technika to zależność Eadie-Hofstee'ego, którą można otrzymać poprzez pomnożenie obu stron równania Lineweavera-Burka przez  $V_{max}$  i rearanżacji go aby przedstawić zależność  $V_0$  od  $V_0/[S]$ :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} [S]} \quad \text{Równanie Lineweavera-Burka}$$

↓ ×  $V_{max}$

$$V_0 = V_{max} - K_M \frac{V_0}{[S]} \quad \text{Równanie Eadie-Hofstee'ego}$$

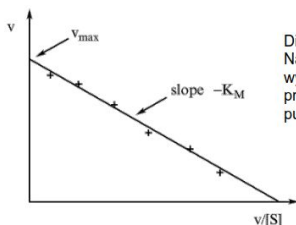


Diagram Eadie-Hofstee'ego.  
Nachylenie linii prostej wynosi  $-K_M$ , rzędna punktu przecięcia  $V_{max}$ , a odcięta punktu przecięcia  $V_{max}/K_M$ .

- Zależność Eadie-Hofstee'ego wykreśla się poprzez zobrazowanie zależności pomiędzy  $V_0$  a  $V_0/[S]$ . W tym przypadku parametry kinetyczne można określić bezpośrednio z nachylenia prostej ( $-K_M$ ) oraz punktu przecięcia prostej z osią y ( $V_{max}$ ). Punkt przecięcia z osią x wskazuje z kolei stosunek pomiędzy ( $V_{max}/K_M$ ).

## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Ze względu na różne zalety i wady zaproponowanych technik, zaleca się wykreślanie danych na wszystkich trzech wykresach. Linearyzacja służy nie tylko do wyznaczania stałych, ale także do wykrywania wszelkich odchyliń od liniowości, które mogą wskazywać na alternatywne mechanizmy lub wpływ innych czynników.

Równanie Michaelisa-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

↓ odwrotność

Równanie Lineweavera-Burka

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} [S]}$$

× V<sub>max</sub>

$$V_0 = V_{max} - K_M \frac{V_0}{[S]}$$

Równanie Eadie-Hodstee'ego

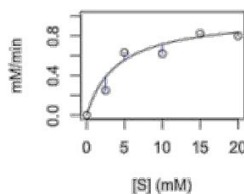
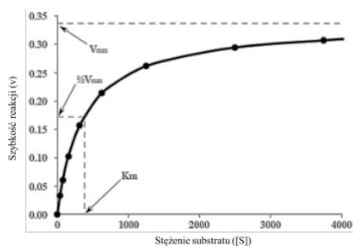
↓ × [S]

Równanie Hanesa

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}}$$

## Kinetyka enzymów – wyznaczanie parametrów kinetycznych

- Parametry kinetyczne można również wyznaczyć wykorzystując metodę nieliniowej regresji, która opiera się na metodzie najmniejszych kwadratów:



$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

- Alternatywą dla technik wykorzystujących liniowe modele do analizy danych po wcześniejszej ich transformacji, są te oparte na regresji nieliniowej. Metody te omijają standardowe problemy nieodłącznie związane z technikami opartymi na linearyzacji danych, ale w zamian mierzą się z wymagającym zadaniem znalezienia optymalnego rozwiązania dopasowania krzywej do punktów pomiarowych.

# Inhibicja

Biologiczne zahamowanie lub opóźnienie procesu enzymatycznego w organizmie.

Podstawowe typy inhibicji:

- allosteryczna
- kompetycyjna
- niekompetycyjna

Szczególnym przypadkiem są inhibitory akompetycyjne, które obniżają zarówno  $V_{\max}$  jak i  $K_m$ .  
Ich działanie polega na wiązaniu się do kompleksu enzym-substrat.

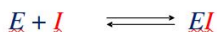
## Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Aby systemy biologiczne mogły wydajnie i bezpiecznie funkcjonować, muszą być w stanie regulować aktywność enzymów. Częsteczki mające zdolność do hamowania (inhibowania) lub blokowania aktywności enzymów nazywamy inhibitorami.
- Ze względu na siłę wiązania inhibitora z enzymem, wyróżnić możemy inhibicję odwracalną i nieodwracalną:

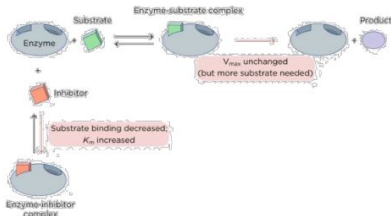
- Inhibicja nieodwracalna – niektóre inhibitory wiążą się z enzymami bardzo mocno (oddziaływania kowalencyjne lub bardzo silne niekowalencyjne). Mają one bardzo duże powinowactwo do enzymów i po związaniu się z nimi, bardzo trudno jest o dysocjację takich kompleksów. Przykładami takich inhibitorów są m.in. penicylina czy aspiryna.



- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:



- Inhibicja kompetycyjna – w tego typu inhibicji, cząsteczka hamująca aktywność enzymu bardzo często przypomina strukturalnie cząsteczkę substratu przez co konkuruje z nią o dostęp do miejsca aktywnego



Inhibitory kompetycyjne bardzo często mają dużo większe powinowactwo do enzymu niż naturalne substraty. Jednakże, jeśli wystarczająco zwiększymy stężenie substratu to cząsteczki substratu mogą zacząć wypierać inhibitor z miejsca aktywnego enzymu. W tym przypadku zatem zwiększanie stężenia substratu będzie cofać hamujący wpływ inhibitora. Metotreksat (lek przeciwnowotworowy) jest przykładem kompetycyjnego inhibitora reduktazy dihydrofolanowej.

# Inhibicja kompetycyjna

- kompetycyjne

Hamowanie kompetycyjne, inhibicja konkurencyjna – współzawodniczenie inhibitora z substratem o miejsce aktywne enzymu. Przy dużych stężeniach substratu inhibitor zostaje wyparty.

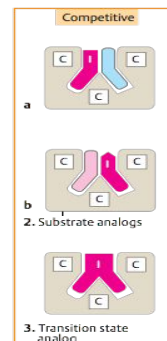
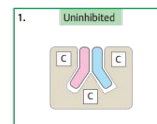
Substrat i inhibitor konkurują o miejsce katalityczne (aktywne) w taki sposób, że zwiększenie stężenia jednego z nich powoduje przesunięcie szybkości reakcji na jego korzyść. Jeśli stężenie substratu będzie przewyższać stężenie inhibitora, to szybkość reakcji zmniejszy się nieznacznie albo w ogóle nie ulegnie zmianie. Jeśli przeważać będzie ilość inhibitora w roztworze, to katalizowana reakcja ulegnie zahamowaniu. W przypadku inhibicji kompetycyjnej powinowactwo enzymu do substratu się zmniejsza (stała Michaelisa rośnie).

3  
0

## Inhibicja kompetycyjna

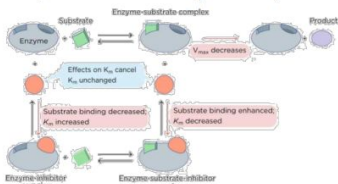
Wiąże się z bezpośrednim oddziaływaniem w obszarze miejsca aktywnego.

Analogi substratów i analogi stanu przejściowego mają właściwości zbliżone do substratu, są wiązane przez enzym, ale nie zamieniane w produkt, przez co blokują miejsce aktywne, potrzebne jest zwiększenie stężenia substratu aby osiągnąć prędkość maksymalną więc  $K_m$  rośnie, natomiast sama wartość  $V_{max}$  się nie zmienia. Przez to że inhibitory te konkurują z substratem o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu pozwala na usunięcie inhibitora z centrum aktywnego

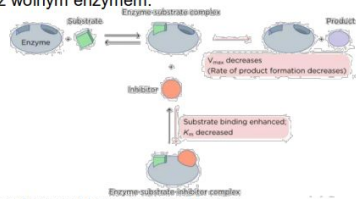


## Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:
  - Inhibicja niekompetycyjna – inhibitor niekompetycyjny nie wiąże się z enzymem w miejscu aktywnym, a w miejscu allosterycznym. Bardzo często powoduje to zmianę konformacji białka. Wiązanie inhibitora nie ma jednak wpływu na efektywność wiązania substratu, zaś wiązanie substratu nie ma wpływu na wiązanie inhibitora. Inhibitor może wiązać się do wolnego enzymu lub kompleksu enzym-substrat. Powstały kompleks enzym-substrat-inhibitor jest katalitycznie nieaktywny.



- Inhibicja akompetycyjna – bardzo rzadki mechanizm hamowania reakcji. Polega na wiązaniu się inhibitora tylko do utworzonego już kompleksu enzym-substrat. Równocześnie inhibitor nie ma zdolności wiązania się z wolnym enzymem.



Enzyme-substrate-inhibitor complex

[http://livescience.com/resources/mcat\\_content/control\\_of\\_enzyme\\_activity/inhibition.html](http://livescience.com/resources/mcat_content/control_of_enzyme_activity/inhibition.html)

## Inhibicja niekompetycyjjna

- niekompetycyjjna

Inhibitor niekompetycyjny wiąże się w zupełnie innym miejscu enzymu niż centrum aktywne i centrum allosteryczne. Jeśli inhibitorem jest duża cząsteczka, zachodzi sytuacja, w której cząsteczka ta wiąże się do domeny białka zawierającej centrum aktywne. Wiązanie to nie wpływa na strukturę części enzymatycznej białka, ale zasłania wejście do centrum aktywnego, przez co enzym jest nieaktywny. W przypadku kiedy inhibitor przyłączy się tak, że będzie zasłaniał centrum tylko częściowo lub w ogóle, reakcja będzie zachodziła, jednakże wolniej.

Inhibitory niekompetycyjne nieodwracalne nie wykazują strukturalnego podobieństwa do substratu, zwiększenie stężenia substratu na ogół nie zmniejsza hamowania.



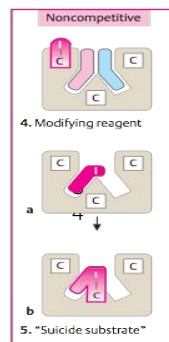
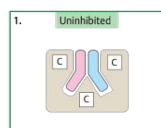
## Inhibicja niekompetycyjna

Gdy inhibitor oddziałuje z ważnym dla katalizy elementem/grupą funkcyjną powoduje on zmniejszenie ilości funkcjonalnego enzymu w środowisku.

Wyróżniamy:

- inhibitory odwracalne modyfikujące enzym,
- inhibitory nieodwracalne, samobójcze powodujące trwałą deaktywację enzymu.

W tym przypadku  $K_m$  pozostaje niezmienione a  $V_{max}$  zmniejsza się.



## Kinetyka enzymów – Inhibicja

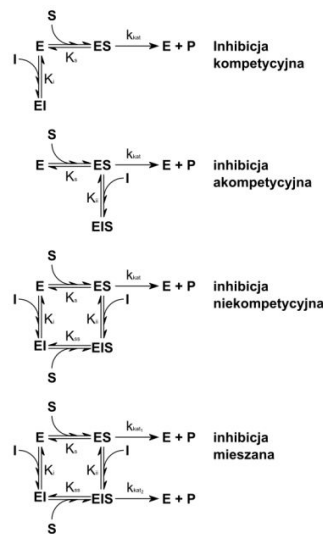
- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:
  - Inhibicja mieszana – inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem oraz kompleksem enzym-substrat (jak w inhibicji niekompetycyjnej), natomiast w tym przypadku ma on różne powinowactwo do obu form (np. lepiej wiąże się z kompleksem ES niż z wolnym enzymem lub odwrotnie). Inhibicja niekompetycyjna jest zatem szczególnym przypadkiem inhibicji mieszanej gdy inhibitor ma identyczne powinowactwo do kompleksów ES oraz ES.
- Inhibitory poprzez swoje działanie wpływają na parametry kinetyczne reakcji enzymatycznej, którą hamują/blokują. W zależności jednak od mechanizmu inhibicji, parametry  $V_{max}$  i  $K_M$  zmieniać się będą w inny sposób:

| Typ inhibitora       | Miejsce wiązania              | Ingeruje w wiązanie się substratu? | Wpływ na wartość $K_M$ | Wpływ na wartość $V_{max}$ |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Kompetycyjny         | Wolny enzym (centrum aktywne) | Tak                                | Zwiększa               | Nie zmienia                |
| Niekompetycyjny      | Wolny enzym lub kompleks ES   | Nie                                | Nie zmienia            | Obniża                     |
| <u>Akompetycyjny</u> | Kompleks ES                   | Nie                                | Obniża                 | Obniża                     |
| Mieszany             | Wolny enzym lub kompleks ES   | Nie                                | Zwiększa lub obniża    | Obniża                     |

## Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, ~~akompetycyjna~~ i mieszana:

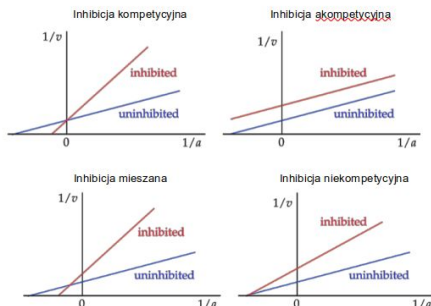
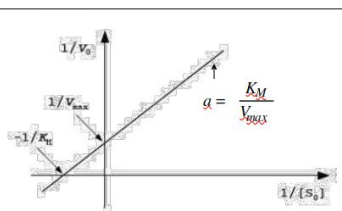
- Inhibicja kompetycyjna – w tego typu inhibicji, cząsteczka hamująca aktywność enzymu bardzo często przypomina strukturalnie cząsteczkę substratu przez co konkuruje z nią o dostęp do miejsca aktywnego
- Inhibicja niekompetycyjna – inhibitor niekompetycyjny nie wiąże się z enzymem w miejscu aktywnym, a w miejscu allosterycznym. Bardzo często powoduje to zmianę konformacji białka. Wiązanie inhibitora nie ma jednak wpływu na efektywność wiązania substratu, zaś wiązanie substratu nie ma wpływu na wiązanie inhibitora. Inhibitor może wiązać się do wolnego enzymu lub kompleksu enzym-substrat. Powstały kompleks enzym-substrat-inhibitor jest katalitycznie nieaktywny.
- Inhibicja ~~akompetycyjna~~ – bardzo rzadki mechanizm hamowania reakcji. Polega na wiązaniu się inhibitora tylko do utworzonego już kompleksu enzym-substrat. Równocześnie inhibitor nie ma zdolności wiązania się z wolnym enzymem.
- Inhibicja mieszana – inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem oraz kompleksem enzym-substrat (jak w inhibicji niekompetycyjnej), natomiast w tym przypadku ma on różne powinowactwo do obu form (np. lepiej wiąże się z kompleksem ES niż z wolnym enzymem lub odwrotnie). Inhibicja niekompetycyjna jest zatem szczególnym przypadkiem inhibicji mieszanej gdy inhibitor ma identyczne powinowactwo do kompleksów ES oraz ~~ESI~~.



## Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Inhibitory poprzez swoje działanie wpływają na parametry kinetyczne reakcji enzymatycznej, którą hamują/blokują. W zależności jednak od mechanizmu inhibicji, parametry  $V_{max}$  i  $K_M$  zmieniać się będą w inny sposób. Aby określić mechanizm inhibicji, najczęściej wykorzystuje się metody linearyzacji danych, które w bezpośredni sposób ilustrują zmiany w wartościach szybkości maksymalnej reakcji oraz stałej Michaelisa.

Diagramy Lineweavera-Burka przedstawiające różne typy inhibicji:



| Typ inhibitora           | Miejsce wiązania              | Ingeruje w wiązanie się substratu? | Wpływ na wartość $K_M$ | Wpływ na wartość $V_{max}$ |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Kompetycyjny             | Wolny enzym (centrum aktywne) | Tak                                | Zwiększa               | Nie zmienia                |
| Niekompetycyjny          | Wolny enzym lub kompleks ES   | Nie                                | Nie zmienia            | Obniża                     |
| <del>Akompetycyjny</del> | Kompleks ES                   | Nie                                | Obniża                 | Obniża                     |
| Mieszany                 | Wolny enzym lub kompleks ES   | Nie                                | Zwiększa lub obniża    | Obniża                     |

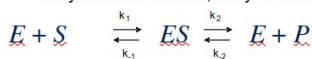
## Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Obecnie w medycynie wykorzystuje się szereg leków, których działanie polega na hamowaniu aktywności enzymów:

| Nazwa leku                 | Choroba                | Enzym docelowy                         |
|----------------------------|------------------------|----------------------------------------|
| Acetazolamid               | Jaskra                 | Anhidraza węglanowa                    |
| Acyklowir                  | Opryszczka             | Wirusowa polimeraza DNA                |
| Allopurinol                | Dna moczanowa          | Oksydaza ksantynowa                    |
| Aspiryna                   | Stany zapalne          | Syntaza prostaglandynowa               |
| Azydetymidyna              | AIDS                   | Odwrotna transkryptaza HIV             |
| Captopril                  | Nadciśnienie           | Enzym aktywujący angiotensynę          |
| Crixivan                   | AIDS                   | Proteaza HIV                           |
| Enoximone                  | Niewydolność serca     | Fosfodiesteraza cAMP                   |
| Fenelzyna                  | Depresja               | Oksydaza monoaminowa                   |
| Fluorouracyl               | Nowotwory              | Syntaza tymidylanowa                   |
| Ibuprofen                  | Stany zapalne          | Syntaza prostaglandynowa               |
| Lowastatyna i inne statyny | Miażdżyca              | Reduktaza HMG-CoA                      |
| Metotrekstat               | Ostra białaczka        | Reduktaza dihydrofolianowa             |
| Nitecapone                 | Choroba Parkinsona     | Metylotransferaza katecholowa          |
| Pantoprazol                | Wrzody żołądka         | H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPaza |
| Penicylina i jej pochodne  | Infekcje bakteryjne    | Bakteryjna transpeptydaza              |
| Sorbinil                   | Retinopatia cukrzycowa | Reduktaza aldolowa                     |
| Zileuton                   | Alergia, astma         | 5-lipooksygenaza                       |

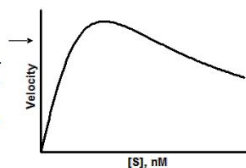
## Kinetyka enzymów – inne rodzaje inhibicji

- Innym mechanizmem, który może zwalniać szybkość enzymów jest tzw. inhibicja produktem.



- Powstający w miejscu aktywnym produkt jest początkowo wciąż związany z enzymem. Nawet jeśli reakcja odwrotna tworzenia się kompleksu ES od strony produktów jest znikoma, to produkt może blokować wiązanie nowej cząsteczki substratu tak długo, jak długo pozostaje związany z enzymem. Co więcej, produkt reakcji, może w niektórych sytuacjach (zazwyczaj gdy reakcja nie jest silnie egzoenergetyczna oraz gdy stężenie produktu nie jest znikome) konkurować z substratem o miejsce aktywne enzymu co również będzie hamować reakcję w kierunku produktu.
- Powstający produkt w okolicy miejsca aktywnego enzymu może również hamować reakcję, ponieważ duża liczba powstających cząsteczek może utrudniać dyfuzję substratów/produktów do/z miejsca aktywnego.
- Tak więc inhibicja przez powstający produkt w pewnym stopniu będzie dotyczyć każdego enzymu natomiast w przypadku słabego wiązania produktu z enzymem nie będzie ono bardzo istotne.
- Podczas przebiegu reakcji efekt hamujący nie jest stały, ale wzrasta wraz z tworzeniem się produktu.

- Podobnie jak w przypadku produktu, istnieje również możliwość hamowania reakcji przez zbyt duże stężenie substratu (inhibicja substratem). Inhibicja substratowa jest najczęstszym odstępstwem od kinetyki Michaelisa-Mentena, występującym w około 25% znanych enzymów. Jest ona ogólnie przypisywana tworzeniu się nieproduktywnego kompleksu enzym-substrat po jednoczesnym związaniu dwóch lub więcej cząsteczek substratu w miejscu aktywnym.

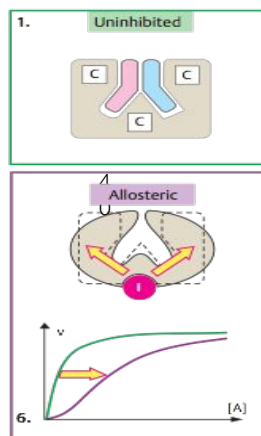


# Inhibicja allosteryczna

- allosteryczna

Obniżenie aktywności katalitycznej enzymu w wyniku zmiany jego konformacji spowodowanej przyłączeniem się inhibitora do innego miejsca niż miejsce aktywne. W związku z brakiem współzawodnictwa substratu i inhibitora o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu nie może przewyższyć inhibicji. Inhibitor znacznie zmniejsza liczbę obrotów enzymu, nie ma wpływu na liczbę cząsteczek enzymu wiążących substrat.

W przypadku inhibicji allosterycznej obserwuje się brak zmiany wartości stałej Michaelisa (gdyż miejsc wiążących na enzymie dostępnych dla substratu jest tyle samo), przy jednoczesnym pomniejszeniu wartości szybkości maksymalnej (z powodu działania inhibitora, zmniejszającego szybkość reakcji katalizowanej przez enzym).

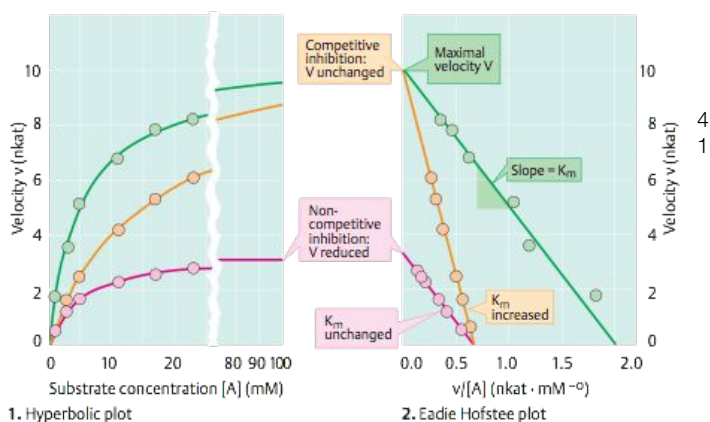


## Inhibicja | podsumowanie

• Aktywność enzymu można linearyzować także w postaci wykresu Eadie-Hofstee'a na którym na jednej osi umieszczamy  $v$  a na drugiej  $v/[A]$ .  $V_{max}$  odpowiada punktowi przecięcia z osią Y, punkt przecięcia z osią X to  $V_{max}/K_m$ , natomiast nachylenie wykresu to  $K_m$ . Na tym wykresie dość łatwo rozróżnić z jakim typem inhibicji mamy do czynienia

• Inhibicja kompetycyjna:  $V_{max}$  pozostaje bez zmian, rośnie  $K_m$ .  
Wykresy z inhibitorem i bez spotykają się w wartości  $V_{max}$

• Wykres dla inhibitora niekompetycyjnego jest równoległy do oryginalnego, co oznacza, że  $K_m$  się nie zmienia, jednak  $V_{max}$  znacząco spada.



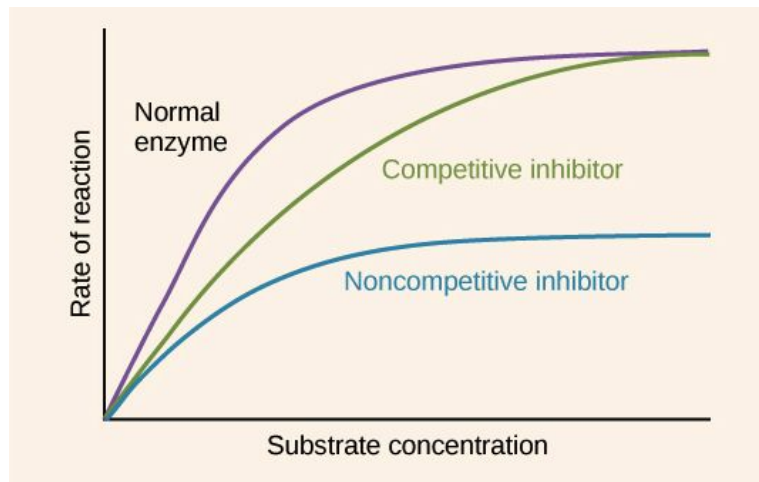


Image modified from "[Enzymes: Figure 3](#)" by OpenStax College, Biology ([CC BY 3.0](#)).

## Metody pomiaru aktywności

### Metody instrumentalne:

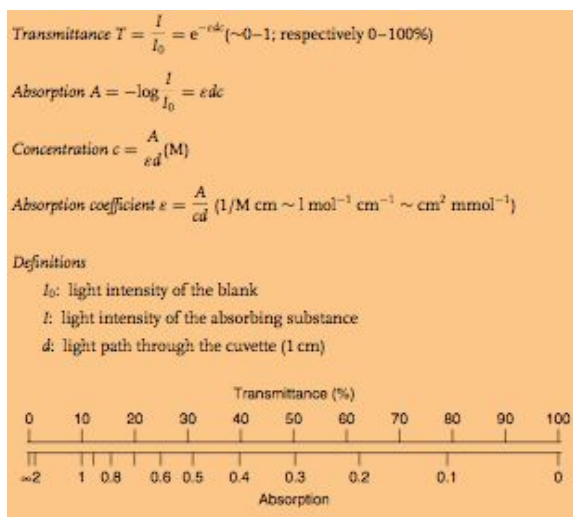
- spektrometryczne
  - UV/Vis
  - Pomiar zmętnienia
  - Fluorescencja
  - Pomiar emisji światła
- elektrochemiczne
  - pH
  - potencjometria
- znakowanie radioaktywne

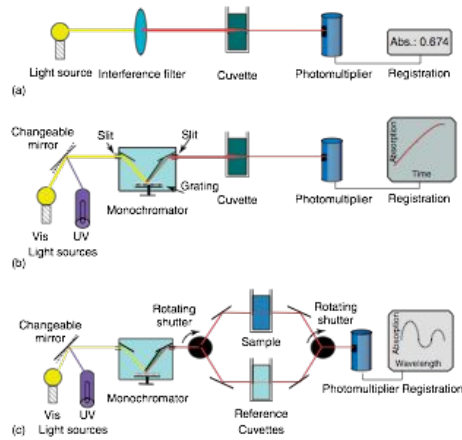


## Kryteria doboru metody

### UV/Vis

- Badane substancje muszą być **mieralne w zakresie dynamicznym**.
- Łatwość zastosowania.
- Stosowność do oznaczenia:
  - białek
  - kwasów nukleinowych
  - metabolitów
  - pomiary czasowe
  - oznaczanie oddziaływań
  - analiza konformacyjna
- Koszt





(a) Spektrofotometr z filtrem.  
 (b) Spektrofotometr UV/Vis.  
 (c) Spektrofotometr z podwójną wiązką.

## Kryteria podstawowe pomiarów enzymatycznych

### Warunki fizykochemiczne:

- o roztwory i siła jonowa
- o pH
- o punkt izoelektryczny
- o temperatura

### Aspekty molekularne:

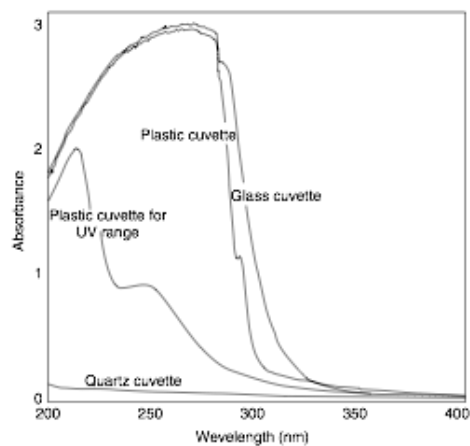
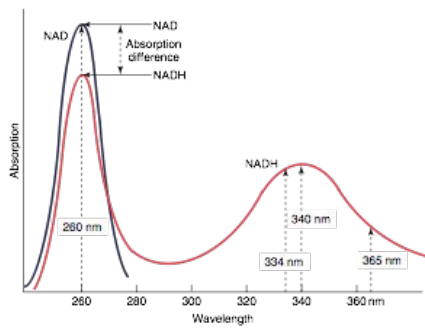
- o substraty
- o kofaktory

| Effect                | Conditions of inactivation                                                      | Protection                                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Temperature           | High temperature<br>Very low temperature (seldom)                               | Low temperature (~4 °C)                                                                  |
| pH                    | Extreme (low and high) pH values                                                | pH optimum                                                                               |
| Ionic strength        | Very high (>1 M) and very low (<10 mM) electrolyte concentrations <sup>a</sup>  | Medium electrolyte concentration (~0.05–0.2 M)                                           |
| Proteolysis           | Contaminations with proteases, not completely removed by purification procedure | Protease inhibitors (cf. Table 2.3)<br>Use of recombinant enzymes                        |
| Chemical modification | Contamination with reactive reagents (SH-active compounds)                      | High purity of all components<br>Avoidance of oxidative conditions<br>Chelating reagents |
| SH poisoning          | Oxidative conditions, promoted by heavy metal ions                              | SH reagents, mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE)               |

## Kryteria doboru metody

### UV/Vis

- o Badane substancje muszą być **mieralne w zakresie dynamicznym**.
- o Łatwość zastosowania.
- o Stosowność do oznaczenia:
  - białek
  - kwasów nukleinowych
  - metabolitów
  - pomiary czasowe
  - oznaczanie oddziaływań
  - analiza konformacyjna
- o Koszt



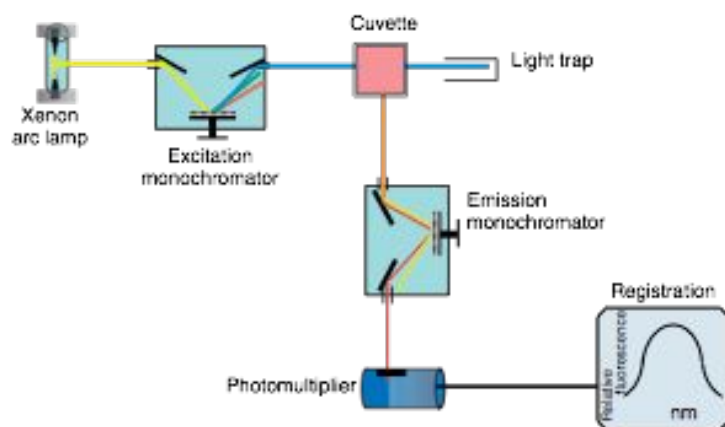
## Fluorescencja

### Zalety:

- o liniowa zależność pomiaru stężenia
- o wysoka czułość
- o wysoka specyficzność
- o oddaje wpływ środowiska pomiaru

### Wady:

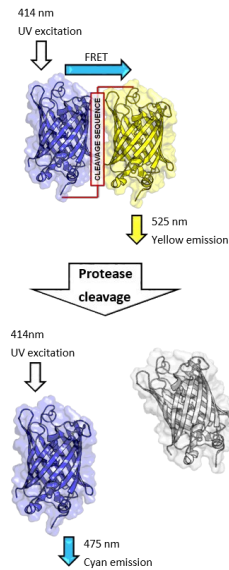
- o skomplikowane instrumenty
- o quenching (utrata emisji w czasie)
- o brak odnośnika absolutnego
- o akumulacja czynników pośrednich



## Förster resonance energy transfer (FRET), fluorescence resonance energy transfer (FRET), resonance energy transfer (RET) , electronic energy transfer (EET)

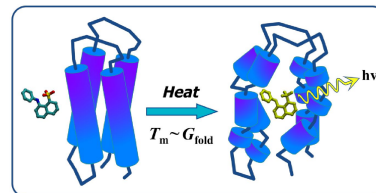
Mechanizm przenoszenia energii między dwoma chromoforami na drodze innej niż promieniowanie.

Chromofor-donor, będąc w stanie wzбудzonym, może przekazywać energię wzbudzenia chromoforowi-akceptorowi znajdującemu się w odległości nie większej niż ok. 10 nm. Jeśli oba chromofory mają zdolność fluorescencji, stosuje się określenie Fluorescence Resonance Energy Transfer (co jest mylne o tyle, że sam transfer energii między fluoroforami nie odbywa się na drodze fluorescencji). Jeśli donor i akceptor różnią się widmami absorpcji i emisji promieniowania, a znajdują się w odległości mniejszej niż 10 nm, to wzбудzając donor wiązką o długości fali odpowiadającej maksimum jego absorpcji, obserwuje się emisję fali o długości odpowiadającej maksimum emisji akceptora. Jeśli odległość między donorem a akceptorem jest większa, przekazanie energii nie zachodzi i obserwuje się jedynie emisję fali przez donor z charakterystycznym dla niego maksimum emisji.

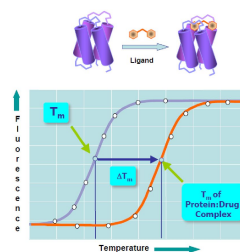
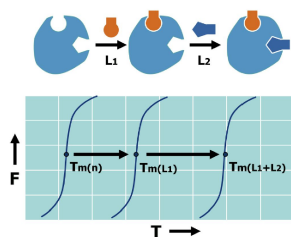
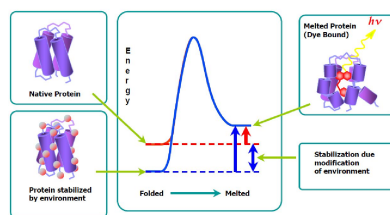
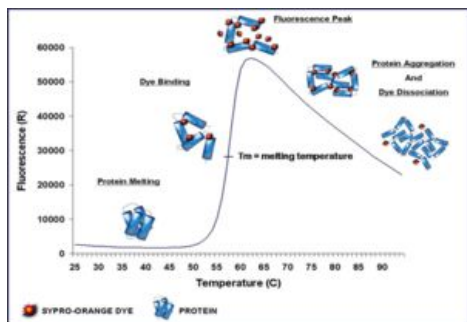


## Thermofluor (aka Differential Scanning Fluorimetry)

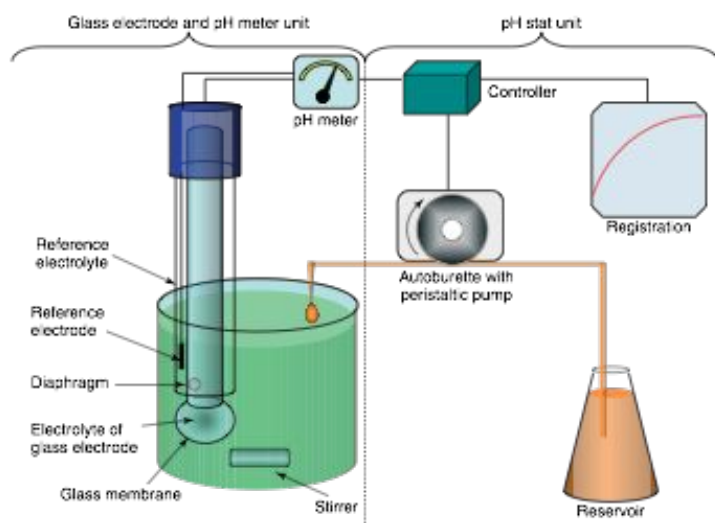
A thermal shift assay quantifies the change in thermal denaturation temperature of a protein under varying conditions. The differing conditions that can be examined are very diverse, e.g. pH, salts, additives, drugs, drug leads, oxidation/reduction, or mutations. The binding of low molecular weight ligands can increase the thermal stability of a protein, as described by Koshland (1958) and Linderstrom-Lang and Schellman (1959). Almost half of enzymes require a metal ion co-factor. Thermostable proteins are often more useful than their non-thermostable counterparts, e.g. DNA polymerase in the polymerase chain reaction,[4] so protein engineering often includes adding mutations to increase thermal stability. Protein crystallisation is more successful for proteins with a higher melting point and adding buffer components that stabilise proteins improve the likelihood of protein crystals forming. If examining pH then the possible effects of the buffer molecule on thermal stability should be taken into account along with the fact that pKa of each buffer molecule changes uniquely with temperature. Additionally, any time a charged species is examined the effects of the counterion should be accounted for.





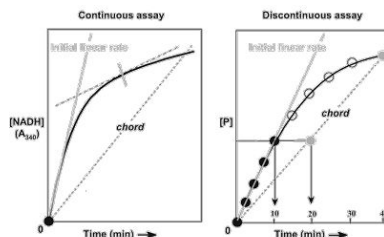


## Metody elektrochemiczne



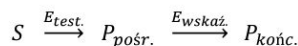
## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Metody pomiarowe wykorzystywane w analizie kinetycznej enzymów można również ogólnie podzielić na metody ciągłe (ang. *continuous assays*) oraz nieciągłe (ang. *stopped assays*, *discontinuous assays*).
- Metody ciągłe pozwalają na monitorowanie reakcji na bieżąco w czasie jej trwania, a ograniczeniem częstotliwości rejestracji kolejnych punktów wynikają tylko z możliwości zastosowanego urządzenia (np. spektrofotometru).
- Drugą grupę testów stanowią te polegające na monitorowaniu reakcji w kilku konkretnych punktach czasowych po uprzednim zatrzymaniu reakcji.
- Metody ciągłe mają przewagę nad oznaczeniami nieciągłymi. Zapewniając stały odczyt mierzonego parametru w trakcie przebiegu reakcji, umożliwiają wykrycie wszelkich odchyśleń od liniowości. W przypadku analiz z pojedynczym punktem czasowym (jak czasem w przypadku metod nieciągłych), obowiązkowe jest ustalenie liniowości reakcji w zależności od czasu i stężenia enzymu (aby zweryfikować założenia kinetyki Michaelisa-Menten)
- Wszystkie metody spektroskopowe (absorpcja, fluorescencja, dichroizm kołowy (CD), dyspersja rotacyjna (ORD), turbidymetria) i techniki elektrochemiczne można zasadniczo przeprowadzać w trybie ciągłym, podczas gdy metody wychwytywania i rozdzielcze pozwalają jedynie na analizę reakcji metodami nieciągłymi. Dlatego takie metody będą stosowane tylko wtedy, gdy nie ma innej alternatywy.



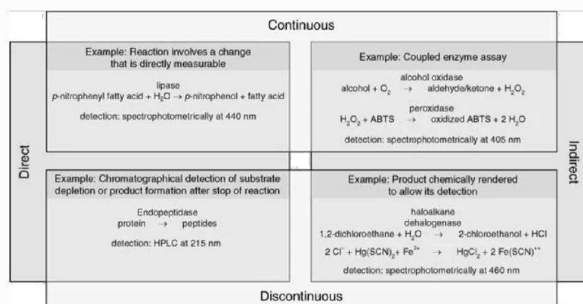
## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Dodatkowo, metody pomiarowe można również podzielić ze względu na rodzaj związku chemicznego ulegającego detekcji. Metody bezpośrednie (ang. *direct*) zakładają monitorowanie postępu reakcji poprzez bezpośrednią analizę związku, który jest produktem (przyrost) lub substratem (ubytok) badanej reakcji.
- Metody pośrednie (ang. *indirect*, *coupled*) polegają na określeniu aktywności enzymu poprzez sprzężenie jednej reakcji enzymatycznej z inną, łatwiejszą do wykrycia reakcją. Produkt pierwszej reakcji jest substratem dla drugiej. W układzie sprzężonym, złożonym z dwóch reakcji, tę której szybkość chcemy oznaczyć nazywamy *badaną* (ang. *test reaction*), a drugą, której produkt bezpośrednio wykrywamy możemy nazywać *wskaźnikową* (ang. *indicator reaction*).
  - W większości przypadków reakcja wskaźnikowa następuje po reakcji badanej, a wykrywalny produkt pojawia się na końcu sekwencji reakcji.
  - W takich układach produkt pośredni ( $P_{\text{pośr.}}$ ; produkt reakcji badanej a substrat wskaźnikowej) potrzebuje trochę czasu, aby osiągnąć fazę stacjonarną, w której jego tworzenie i konwersja jest stała. Ta faza stacjonarna jest stanem optymalnym do pomiarów w pośrednich metodach pomiarowych, więc warunki eksperymentu powinno się dobierać w taki sposób aby faza ta została osiągnięta tak szybko jak to możliwe.
  - Aby to zrealizować, stężenie enzymu testowego ( $E_{\text{test.}}$ ) musi być elementem ograniczającym szybkość reakcji, zatem musi działać w warunkach nasycenia substratem (gdy  $[S] \gg K_M$ ), tak że  $V_{0_{\text{test.}}} \approx V_{\text{max}_{\text{test.}}}$ .
  - Z drugiej strony reakcja wskaźnikowa musi być równolegle prowadzona z nadmiarem enzymu wskaźnikowego ( $E_{\text{wskaż.}}$ ).
  - W takich warunkach kiedy reakcja rozpoczyna się, obserwuje się fazę zastoju, po której stężenie  $[P]_{\text{pośr.}}$  ustala się w *stanie stacjonarnym*, w którym z jednej strony jest uzupełniane przez reakcję pierwotną przy stałej prędkości ( $V_{\text{max}_{\text{test.}}}$ ), a z drugiej zużywane przez enzym wskaźnikowy w reakcji sprzężonej również ze stałą prędkością ( $V_{0_{\text{wskaż.}}}$ ), co jest zgodne z kinetyką Michaelisa-Menten.
  - Duże ilości enzymu wskaźnikowego zapewniają, że efektywna szybkość reakcji wskaźnikowej musi być równa maksymalnej prędkości reakcji testowej ( $V_{0_{\text{test.}}}$ ).



## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Dodatkowo, metody pomiarowe można również podzielić ze względu na rodzaj związku chemicznego ulegającego detekcji. Metody bezpośrednie (ang. *direct*) zakładają monitorowanie postępu reakcji poprzez bezpośrednią analizę związku, który jest produktem (przyrost) lub substratem (ubytek) badanej reakcji.
- Metody pośrednie (ang. *indirect, coupled*) polegają na określeniu aktywności enzymu poprzez sprzężenie jednej reakcji enzymatycznej z inną, łatwiejszą do wykrycia reakcją. Produkt pierwszej reakcji jest substratem dla drugiej. W układzie sprzężonym, złożonym z dwóch reakcji, tę której szybkość chcemy zbadać nazywamy *testową*, a drugą dzięki, której możemy oznaczyć szybkość reakcji nazywamy *wskaźnikową*.
  - Zdarza się, że aby oznaczyć aktywność niektórych enzymów konieczne jest łączenie ze sobą nawet trzech reakcji.
  - W przypadku reakcji sprzężonych należy zapewnić optymalne warunki dla wszystkich enzymów, ale nie zawsze jest to łatwe jeśli różnią się np. optimum pH czy temperatury.
  - Reakcja wskaźnikowa nigdy nie powinna stać się etapem limitującym zatem jej enzymy, kofaktory i kosubstraty muszą występować w dużym nadmiarze.



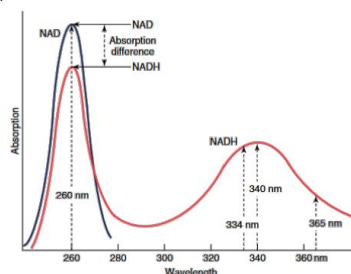
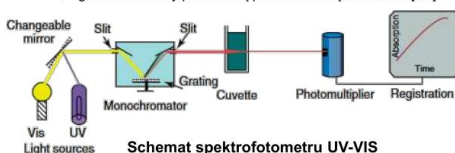
## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Spektrofotometria UV-VIS** wydaje się być idealną techniką umożliwiającą badanie kinetyki enzymów. Jest to względnie łatwa i wygodna metoda detekcji związków chemicznych jako, że każda substancja biologiczna ma zdolność pochłaniania (absorpcji) promieniowania elektromagnetycznego przynajmniej w regionie UV. Z tego powodu, metoda ta wydaje się odpowiednia dla analiz ilościowych także w przypadku enzymów.
- Niestety w większości przypadków substraty i produkty jednej reakcji wykazują podobne właściwości absorpcyjne. W takich sytuacjach nawet jeśli związki „produkują” odpowiednie widma absorpcyjne z wyraźnym maksimum w wąskim zakresie długości fali, nie będą przydatne do monitorowania postępu reakcji w metodzie opartej na pomiarze absorbancji. Dlatego, też pierwszym krokiem przy projektowaniu eksperymentów mających na celu analizę aktywności enzymów jest namierzenie wśród substratów i produktów, cząsteczki, która daje wyraźny i łatwo odróżnialny sygnał (przykład NAD i NADH).
- Prawo Lamberta – Beera odnosi się do pomiaru absorbancji na skutek absorpcji promieniowania przez roztwory, w których znajdują się analyty zdolne do absorpcji promieniowania o określonej długości fali. Zgodnie z prawem Lamberta – Beera absorbancja opisywana jest zależnością:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda c l$$

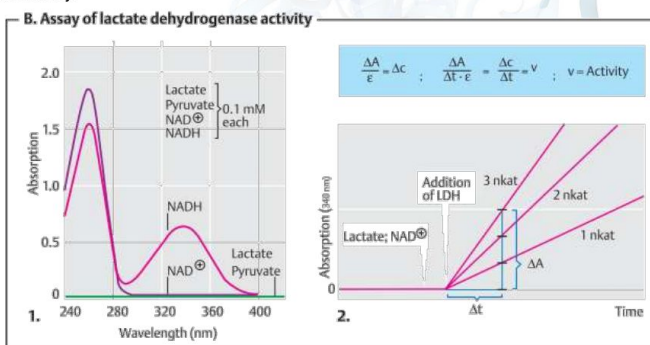
Gdzie:

$A_\lambda$  – Absorbancja przy określonej długości fali elektromagnetycznej  
 $\varepsilon$  – molowy współczynnik ekstynkcji związku chemicznego [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]  
 $c$  – stężenie analitu [M]  
 $l$  – grubość warstwy przez którą przechodzi wiązka światła [cm]



## Metody wyznaczania aktywności enzymów

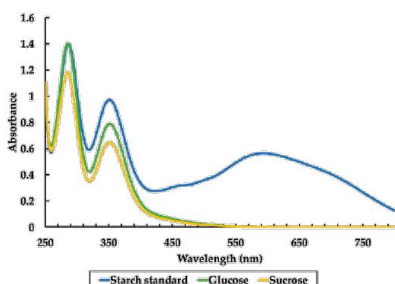
- **Spektrofotometria UV-VIS** – przykładowy pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH)
- Pomiar aktywności LDH opiera się na fakcie, że zredukowana forma NADH absorbuje światło o długości fali 340nm, natomiast forma utleniona (NAD<sup>+</sup>) nie. Różnica w absorpcji światła między 300 a 400nm wynika ze zmiany w obrębie pierścienia nikotynoamidowego w trakcie utleniania i redukcji
- Aby zmierzyć aktywność LDH, mieszaninę zawierającą mleczan i NAD<sup>+</sup> umieszcza się w kuwecie i mierzy absorbancję przy 340nm. Niekatalizowana reakcja przebiega niezwykle powoli, jedynie dodanie enzymu może spowodować pojawienie się NADH i wzrost absorbancji.
- Zgodnie z prawem Lamberta-Beera wzrost absorbancji (przyrost stężenia produktu w czasie) jest proporcjonalny do szybkości reakcji



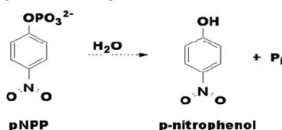
© Coolman, 2005 Color Atlas of Biochemistry

## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- W chemii fizycznej i analitycznej **kolorymetria** to technika stosowana do określania stężenia kolorowych związków w roztworze. Kolorymetr to zatem urządzenie służące do testowania stężenia roztworu poprzez pomiar jego absorbancji dla określonej długości fali światła (może być używany np. spektrofotometr)
- Testy kolorymetryczne wykorzystują odczynniki, które ulegają mierzalnej zmianie koloru w obecności analitu. Są szeroko stosowane w biochemii do badania obecności enzymów, przeciwciał, hormonów i wielu innych analitów.
- Dla przykładu, p-nitrofenylofosforan będący substratem dla kwaśnej fosfatazy przekształcany jest do p-nitrofenolu, który daje żółte zabarwienie dopiero w środowisku zasadowym (po dodaniu NaOH). Intensywność barwy może być monitorowana spektrofotometrycznie.
- Rozkład skrobi przez amylazy może być z kolei monitorowany przez płyn Lugola (I<sub>2</sub> w KI). W tym przypadku monitorowany jest ubytek substratu albo za pomocą kontroli punktu achromowego albo metodą spektrofotometryczną (metoda aplikowana raczej dla małych stężeń skrobi).



### 1. Phosphatase Catalyzed Reaction



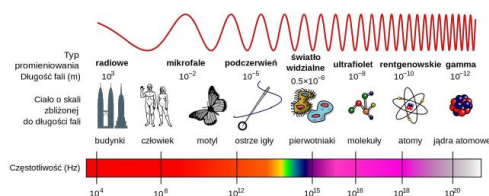
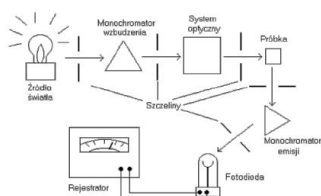
### 2. Color Reaction (add NaOH)





## Metody wyznaczania aktywności enzymów

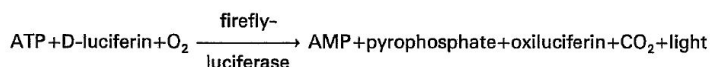
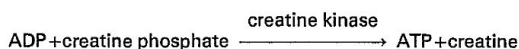
- **Fluorymetria** (Spektrofluorymetria, spektroskopia fluorescencyjna) – opiera się na zjawisku emisji promieniowania elektromagnetycznego o określonej długości fali przez substancję, po krótkotrwałym jej wzbudzeniu falą elektromagnetyczną o krótszej długości.
- Fluorymetria i spektrofotometria są metodami pokrewnymi, z tym, że w przypadku spektrofotometrii analizuje się „jak dużo” (intensywność) promieniowania elektromagnetycznego zostało zaabsorbowane przez substancję, natomiast w przypadku fluorymetrii jak dużo zostało wyemitowane po wstępnym wzbudzeniu substancji.
- Metoda ta jest bardziej czuła niż spektrofotometria natomiast wymaga aby składnik analizowanej reakcji był zdolny do emitowania fali elektromagnetycznej o długości fali, którą jesteśmy w stanie zmierzyć. Fluorymetr zatem, musi posiadać zdolność do detekcji fal o określonej długości, ale również do generowania fal o większej energii (krótszej długości)
- Fluorymetria dobrze sprawdza się do detekcji koenzymów flawinowych oraz nikotynoadeninowych. Dehydrogenazy zależne od NAD(P) często wykrywa się w ten sposób, ponieważ zredukowana forma tych koenzymów (NAD(P)H) po wzbudzeniu przy 260 nm, emitują promieniowanie o długości 470 nm.



[https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234368/cwiczy\\_07\\_08.pdf](https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234368/cwiczy_07_08.pdf)

## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Do rzadziej stosowanych lecz bardzo czułych metod zaliczyć można **luminometrię**. Polega ona na wykorzystaniu reakcji katalizowanej przez enzym lucyferazę (uzyskiwaną ze świetlików) w trakcie której substrat lucyferyna przy udziale ATP i tlenu atmosferycznego ulega konwersji do oksylucyferyny z wydzieleniem m.in. kwantów światła o długości fali 562 nm.
- Pomiaru intensywności luminescencji można dokonać we fluorymetrze.
- Metoda luminometryczna może być zatem stosowana do oznaczania aktywności enzymów, które katalizują reakcje z wytwarzaniem ATP, np. kinaza kreatynowa.



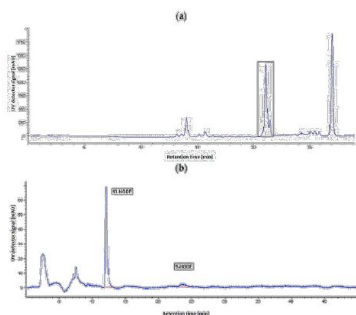
## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Niektóre reakcje enzymatyczne wiążą się z powstawaniem/ubytkiem substancji optycznie czynnych. W takich przypadkach jeśli substraty i produkty różnią się **skręcalnością optyczną** to takie reakcje możemy badać za pomocą **metod polarymetrycznych**
- Przykładem reakcji enzymatycznej, która mogłaby być analizowana za pomocą polarymetru jest hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy w użyciu inwertazy. Sacharoza będąca substratem w tej reakcji wykazuje skręcanie spolaryzowanych promieni światła w prawo o kąt  $+66,5^\circ$ , podczas gdy glukoza skręca w prawo tylko o kąt  $+52,5^\circ$ , a fruktoza w lewo o  $-92,4^\circ$ .
- Metoda ta może być używana tylko przy korzystaniu z metod nieciągłych tj. po uprzednim zatrzymaniu reakcji



## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Jeśli analiza substratów/produktów reakcji enzymatycznych jest niemożliwa przy wykorzystaniu metod optycznych to można stosować metody oparte na **technikach chromatograficznych**.
- Substraty i produkty różniące się cechami strukturalnymi (rozmiar, kształt, rozkład ładunków) można rozdzielić i zidentyfikować technikami chromatograficznymi, takimi jak chromatografia jonowymienna, filtracja żelowa, chromatografia w odwróconej fazie, chromatografia oddziaływań hydrofobowych czy chromatografia powinowactwa.
- Metody te polegają na pobieraniu prób z mieszaniny w toku reakcji z następnym chromatograficznym rozdzielaniem i ilościowym oznaczaniem produktów i substratów.
- Metody te są czasochłonne i mogą się różnić w zależności od zastosowanej techniki chromatograficznej, natomiast charakteryzują się dużą dokładnością.





## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Jeśli w toku reakcji chemicznej zużywany jest lub powstaje jakiś gaz to do analizy postępu reakcji można wykorzystać **metody gazometryczne**.
- Przykładami reakcji monitorowanymi na podstawie zmian stężenia gazu są: niektóre reakcje katalizowane przez oksydoreduktazy (wydzielanie tlenu; np. katalaza), reakcje karboksylacji/dekarboksylacji (z uczestnictwem dwutlenku węgla), reakcje nitrogenazowe z użyciem azotu.
- Opracowano różne metody badania reakcji poprzez określenie ilości przekształconego gazu, w tym m.in. historyczna technika manometryczna z wykorzystaniem aparatu Warburga, ale również nowsze techniki jak np. te z użyciem elektrody Clarka do monitorowania reakcji związanych z wydzielaniem się tlenu.

### Mechanizm pomiaru za pomocą elektrody Clarka:

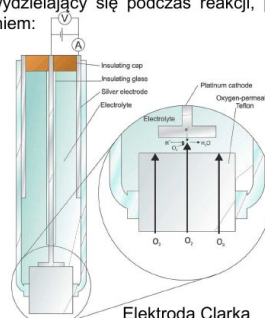
- Platynowa elektroda pełni funkcję katody, a elektroda srebrna jest w tym przypadku anodą. Cienka, teflonowa błona oddziela mieszaninę reakcyjną od elementów elektrodowych. Tlen wydzielający się podczas reakcji, po przeniknięciu przez membranę, redukowany jest na katodzie zgodnie z równaniem:



Natomiast srebro jest utleniane na anodzie:

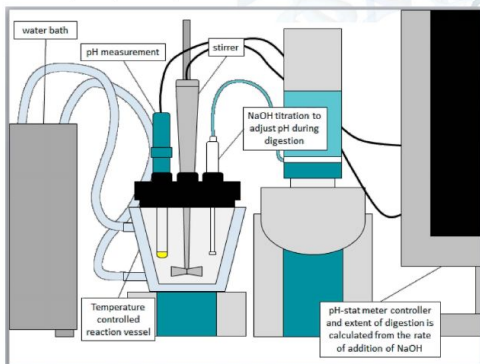


- Przepływ prądu między elektrodami, proporcjonalny do stężenia tlenu, jest rejestrowany.
- Czynnikiem limitującym w tej metodzie może być niedostateczna szybkość dyfuzji cząsteczek tlenu przez membranę.



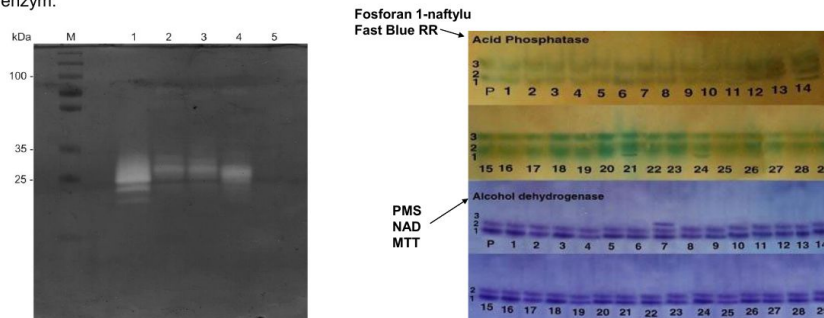
## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Reakcje enzymatyczne, w których toku zmienia się stężenie jonów wodorowych w mieszaninie można monitorować za pomocą elektrodowego pH-statu.
- Zmiany pH można by zasadniczo mierzyć pH-metrem natomiast aktywność enzymów silnie zależy od stężenia jonów wodorowych zatem ulegałyby zmianie w trakcie reakcji wraz z wahaniami pH. Wykorzystanie pH-statu rozwiązuje jednak ten problem jako, że ten wykrywając nawet niewielkie zmiany pH, natychmiastowo uruchamia system automatycznego miareczkowania. Ilość zużytego kwasu lub zasady odzwierciedla w tym przypadku szybkość reakcji.
- Pomiar aktywności lipazy lub esterazy cholinowej to przykłady reakcji nierzadko kontrolowanych przy wykorzystaniu pH-statu.



## Metody wyznaczania aktywności enzymów

- Enzymy można również badać technikami elektroforetycznymi. Stosuje się dwa podejścia, w obu konieczne jest przeprowadzenie elektroforezy natywnej lub półnatywnej (dodanie SDS powoduje denaturację białka, a więc utratę jego właściwości katalitycznych):
- Klasyczna **zymografia** – do żelu poliakryloamidowego dodaje się substrat dla enzymu (np. skrobia dla amylaz, żelatyna dla proteaz), który kopolimeryzuje wraz z żelem. Na takim żelu przeprowadza się elektroforezę, w której rozdzielane próbki zawierają analizowany enzym. Po zakończeniu elektroforezy, żel inkubuje się w warunkach optymalnych dla danego enzymu (pH, temperatura). Po tej inkubacji barwi się żel (np. Coomassie Brilliant Blue dla proteaz, płynem Lugola dla amylaz) – wynikiem jest cały wybarwiony na ciemno żel z jasnymi plamami w miejscach gdzie zatrzymał się enzym i w trakcie inkubacji zhydrolizował substrat w żelu.
- Elektroforeza natywna ze specyficznym barwieniem.** W tym przypadku nie dodaje się substratu do żelu, tylko inkubuje się żel po elektroforezie w roztworze odpowiedniej substancji. Najważniejsze jest aby produkt miał kolor inny niż substrat i żeby był nierozpuszczalny, wtedy zobaczymy zabarwienie w tym miejscu żelu gdzie znajduje się enzym.

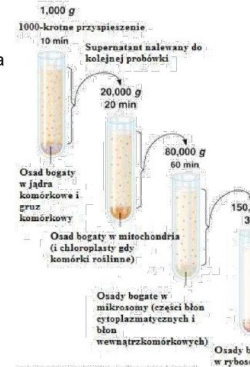


## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Aby możliwa była dokładna analiza enzymu, konieczna jest najpierw izolacja pożądanego białka o zdolnościach katalitycznych, a następnie oczyszczenie go do odpowiedniego stopnia. Ważne jest aby materiał oczyścić do takiego etapu, aby pozbyć się wszystkich składników, które mogłyby interferować z wynikiem późniejszych analiz w tym również innych białek i enzymów.
- Istnieją zatem trzy podstawowe cele oczyszczania enzymów – uzyskanie preparatu z maksymalną:
  - Aktywnością właściwą
  - Czystością
  - Wydajnością
- Dobór technik służących oczyszczaniu pożądanego enzymu bardzo często zależy od jego źródła pochodzenia. Źródło enzymu może być dobierane pod względem:
  - Największej zawartości enzymu, który jest obiektem zainteresowania
  - Dostępności materiału
  - Unikalności materiału/enzymu
  - Dostępności technik
- Np. największą aktywność enzymów glikolizy wykazują mięśnie szkieletowe, podczas gdy enzymy cyklu mocznikowego są wyłącznie w wątrobie
- Pierwszy etap izolacji polega zazwyczaj na rozdrobnieniu wybranej tkanki zwierzęcej, roślinnej, masy bakteryjnej czy micelium grzyba w móżdżku, w homogenizatorze lub za pomocą innych technik służących lizie komórek.
  - Na tym etapie ważne jest aby zapewnić odpowiednie warunki i uniknąć denaturacji białek i/lub utracie aktywności enzymów. W tym celu często dodaje się odpowiednie bufony i różne substancje stabilizujące np.:
    - EDTA jako chelator jonów
    - Dititritol jako protektor grup sulfhydrylowych,
    - Glicerol
    - Kofaktory itp.

## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Jeżeli enzym jest nadreprezentowany w konkretnej organelli komórkowej to często warto wyizolować tę organelę. Dzięki temu pozbywamy się dużej ilości białek obecnych w innych lokalizacjach komórkowych, które nie są celem procesu oczyszczania.
- Jeżeli jednak naszym celem jest wyodrębnienie konkretnej organelli to metoda lizy komórek musi być łagodna, aby nie zniszczyć wybranej struktury subkomórkowej.
- Wirowanie różnicowe może być wykorzystane do izolacji wybranej organelli. Po izolacji należy uszkodzić strukturę organelli aby uzyskać ekstrakt wybranych białek.
- Wszystkie procedury prowadzić w niskiej temperaturze (na lodzie!)
- Po izolacji i lizie komórek/ wybranej frakcji subkomórkowej należy wyizolować białka aby pozbyć się niepotrzebnych pozostałości komórkowych
- Izolację białek często prowadzi się za pomocą **rozpuszczalników organicznych, techniki wysalania, metodę temperaturową/pH (rzadziej)**



## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Izolację białek często prowadzi się za pomocą **rozpuszczalników organicznych, techniki wysalania, metodę temperaturową (rzadziej)**

### Wysalanie białek siarczanem amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :

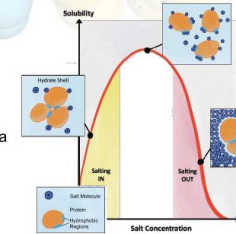
- Wysalanie prowadzi się poprzez stopniowe dodawanie siarczanu amonu przy jednoczesnym mieszaniu roztworu. Po dodaniu soli, roztwór wiruje się aby oddzielić od siebie wytrącone i niewytrącone białka
- Białka w zależności od ilości grup hydrofilowych/hydrofobowych i w efekcie obfitości otoczki hydratacyjnej wytrącają się przy innym stężeniu soli. Dodawanie określonych ilości soli i wirowanie próbek pozwala na rozdzielanie od siebie białek o różnych właściwościach.
- Siarczan amonu odciąga dipolowe cząsteczki wody od białek powodując, że pomiędzy białkami zaczynają przeważać oddziaływania hydrofobowe w efekcie czego białka agregują się i wytrącają.

### Wykorzystanie rozpuszczalników organicznych:

- Często praktyką izolowania białek z różnego źródła jest wykorzystanie rozpuszczalników organicznych np. acetonu czy etanolu
- Po dodawaniu wzrastających ilości rozpuszczalnika organicznego, dokonuje się wirowania a otrzymywane osady rozpuszcza z powrotem w odpowiednich buforach
- Aby nie doprowadzić do denaturacji białek stosowany organiczny rozpuszczalnik powinien być mocno schłodzony (do ok. - 30 °C)
- Niektóre białka mogą ulegać bezpowrotnej denaturacji w obecności rozp. org.

### Wykorzystanie metody temperaturowej/zmiany pH

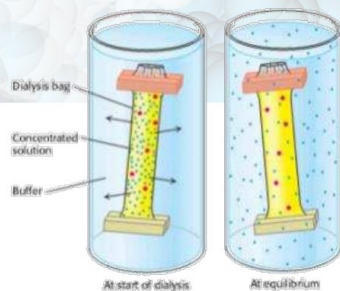
- Białka termostabilne mogą zachowywać strukturę i aktywność w wysokiej temperaturze podczas gdy białko termolabilne mogą ulegać denaturacji i agregacji
- Białka wykazującą najmniejszą rozpuszczalność w ich pH, zatem zmiany pH mogą służyć wytrącaniu konkretnych białek





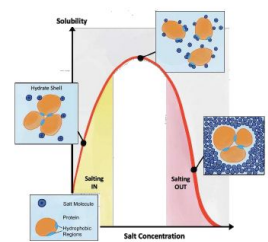
## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- **Dializa** pozwala na oczyszczenie próbek z niechcianych substancji. Jest zatem techniką często wykorzystywaną pomiędzy etapami oczyszczania (np. pomiędzy chromatografią wykluczania a chromatografią jonowymienną)
- Pozwala na oczyszczenie białka z substancji niskocząsteczkowych na przykład soli
- Pozwala na wymianę buforu, usunięcie składników uniemożliwiających dalszą analizę
- Odbyna się w woreczku dializacyjnym wykonanym z membrany celulozowej, która zawiera pory – mogą się przez nie przedostać tylko cząsteczki o określonej masie
- Cząsteczki zanieczyszczające przechodzą do otaczającego buforu ponieważ tam jest ich mniejsze stężenie niż w woreczku (**zjawisko dyfuzji**)



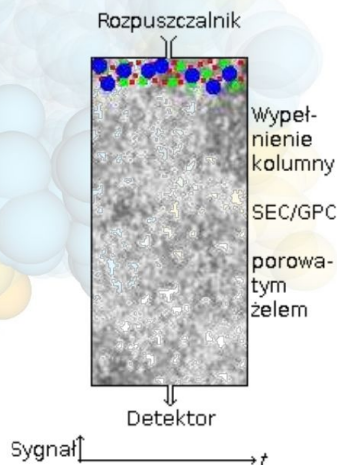
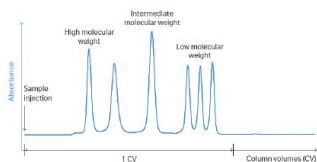
## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Po izolacji określonej frakcji białkowej, mamy wciąż zazwyczaj do czynienia z mieszaniną białek, a nie czystym enzymem. Aby dokładniej oczyścić enzym docelowy stosuje się szereg technik analitycznych/instrumentalnych, których celem jest albo odsianie białek niepożądanych albo wzbogacenie uzyskanej frakcji w białko docelowe.
- W tym celu najczęściej stosuje się metody oparte na chromatografii i/lub elektroforezie. Co więcej techniki te mogą też być stosowane do oceny czystości oczyszczanych frakcji (tzn. że mogą pełnić rolę metod analitycznych lub/i preparatywnych).
- Techniki chromatograficzne mogą pełnić rolę zarówno technik preparatywnych i analitycznych, natomiast techniki elektroforetyczne rzadziej pełnią funkcję metod preparatywnych.



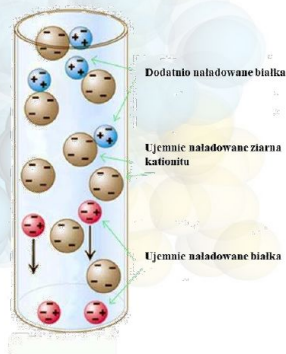
## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- **Chromatografia wykluczania** (sączenie molekularne, filtracja żelowa) to technika rozdzielcza wykorzystująca porowate złożo do rozdzielenia cząsteczek różniących się rozmiarem
- Wykorzystanie porowatego złoża do rozdzielenia cząsteczek różniących się rozmiarem.
- Cząsteczki większe niż średnica porów nie penetrują ziaren złoża i opuszczają kolumnę wcześniej.
- Cząsteczki mniejsze niż średnica porów penetrują ziarna złoża przez co opuszczają kolumnę później.
- Metoda wykorzystywana jako wstępna metoda separacji, kolejny etap separacji lub do odsalania próbek/wymiany buforów w próbkach
- Złoża: żele dekstranowe (np. Sephadex), agarozowe lub poliakrylamidowe.

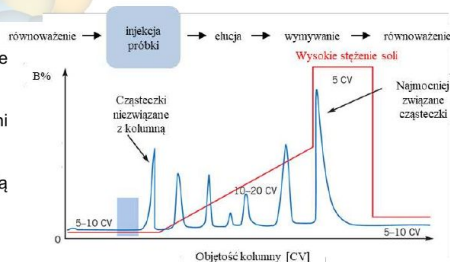


## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- **Chromatografia jonowymienna** - Wykorzystuje wymiennicze jonowe do rozdzielenia cząsteczek różniących się ładunkiem.
- Kationity – złoża wiążące dodatnio naładowane cząsteczki
- Anionity – złoża wymieniające aniony
- Sole popularnie wykorzystywane do elucji:
  - o chlorek sodu,
  - o chlorek potasu,
  - o chlorek wapnia,
  - o chlorek magnezu.



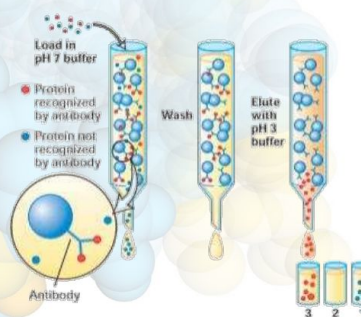
- Cząsteczki posiadające ten sam ładunek co złożo nie wiążą się i opuszczają kolumnę jako pierwsze.
- Cząsteczki o małej gęstości ładunków na powierzchni opuszczają kolumnę wcześniej (niższe stężenie soli).
- Cząsteczki o dużej gęstości ładunków opuszczają kolumnę później (wyższe stężenie soli).





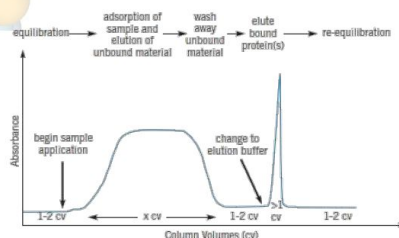
## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- **Chromatografia powinowactwa** rozdziela białka pod względem zdolności do odwracalnego oddziaływania z ligandem przyłączonym do fazy stacjonarnej
- Jest jedyną techniką, która pozwala na rozdział na podstawie właściwości biologicznych lub specyficznej struktury chemicznej
- Pozwala na oczyszczenie aktywnych form białka z mieszaniny zdenaturowanych lub funkcjonalnie odmiennych form, wyizolować białko występujące w bardzo niskim stężeniu z dużej objętości wyjściowej próbki lub usunąć przeszkadzające zanieczyszczenia.
- Technika ta wymaga biospecyficznego liganda, który może zostać przyczepiony do matrycy (złoża). Ligand musi być specyficzny dla danego białka (lub grupy białek), działać w postaci zimmobilizowanej, umożliwiać uwolnienie białka w warunkach osiągalnych na kolumnie bez uszkodzania białka



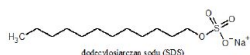
Najczęściej wykorzystuje się interakcje:

- Enzym »» substrat, inhibitor, kofaktor
- Niemal dowolne białka »» Przeciwciało
- Lektyny »» glikoproteiny, receptory powierzchniowe komórek
- Kwas nukleinowy »» histony, polimerazy, białka wiążące DNA
- Receptory, białka transportujące »» hormony, witaminy
- Białka zawierające His, Cys i Trp »» jony metali
- Niektóre białka »» barwniki
- Immunoglobuliny »» białko A lub G (produkcja przeciwciał)
- W oczyszczaniu białek rekombinowanych: Histag - nikiel, streptawidyna - biotylna

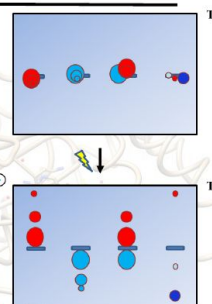


## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Do separacji enzymów lub jako etap kontroli czystości frakcji uzyskanych enzymów często stosuje się **techniki elektroforetyczne**
- Elektroforeza – ruch naładowanych cząsteczek fazy rozproszonej w polu elektrycznym
- Zastosowanie żeli w celu poprawy rozdzielczości separacji jonów (elektroforeza żelowa; najczęściej żele poliakrylamidowe, agaroz, agar lub skrobia);
- W przypadku warunków natywnych, prędkość migracji jonów uzależniona jest od ich rozmiaru, kształtu i wypadkowego ładunku
- W przypadku gdy elektroforezę żelową prowadzimy w obecności dodecylsulfianu sodu (SDS) mamy do czynienia z techniką **elektroforezy SDS-PAGE**.



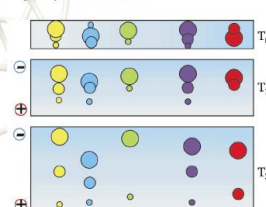
- SDS znajdujący się w układzie powoduje:
  - Zrywanie niekowalencyjnych wiązań w białkach (denaturacja)
  - Nadawanie białkom jednakowego ładunku ujemnego
  - Jako detergent, poprawia rozpuszczalność białek
- Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) jest metodą pozwalającą rozdzielać białka pod względem ich masy cząsteczkowej



Ogólny schemat przebiegu elektroforezy żelowej w warunkach natywnych

T<sub>0</sub> – stan przed rozpoczęciem rozdzielania

T<sub>1</sub> – stan po zakończeniu rozdzielania



Schemat przebiegu SDS-PAGE

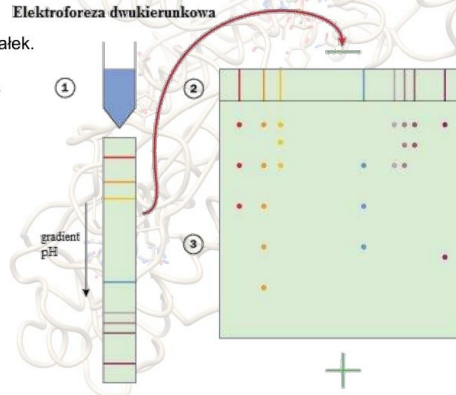
T<sub>0</sub> – stan przed rozpoczęciem rozdzielania

T<sub>1</sub> – stan w trakcie prowadzenia rozdzielania

T<sub>2</sub> – stan po zakończeniu rozdzielania

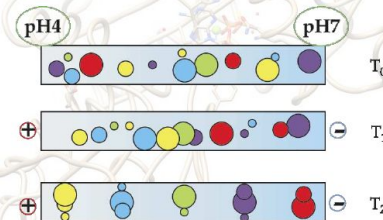
## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Do separacji enzymów lub jako etap kontroli czystości frakcji uzyskanych enzymów często stosuje się **techniki elektroforetyczne**
- Aby znacznie zwiększyć rozdzielczość separacji elektroforetycznej oraz być w stanie odróżnić od siebie białka o podobnych masach, możemy zastosować dwa kryteria rozdziłu wykorzystując **elektroforezę dwukierunkową (2DE)**.
- Pozwala na rozdział białek w mieszaninach złożonych.
- Łączy dwie, różne elektroforetyczne techniki separacji białek.
- Rozdział na podstawie pI oraz masy molekularnej białek.
- Procedura złożona z 3 etapów:
  - Ogniskowania izoelektrycznego (IEF)
  - Równoważenia białek
  - SDS-PAGE



## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

- Do separacji enzymów lub jako etap kontroli czystości frakcji uzyskanych enzymów często stosuje się **techniki elektroforetyczne**
- Ogniskowanie izoelektryczne** to metoda elektroforetyczna polegająca na rozdzielaniu białek na podstawie ich punktu izoelektrycznego (pI).
- Ładunek białka jest wypadkową ładunków poszczególnych aminokwasów wchodzących w jego skład i zależy od pH w jakim znajduje się białko.
- Stosowana w elektroforezie 2D jako tzw. „pierwszy kierunek”.
- Białka wędrują w polu elektrycznym i skupiają się (ogniskują) w pH, które odpowiada ich pI gdzie tracą zdolność do dalszej migracji.



Schemat przebiegu IEF:

$T_0$  – stan przed rozpoczęciem rozdzielu elektroforetycznego.

$T_1$  – stan w trakcie prowadzenia rozdzielu.

$T_2$  – stan po zakończeniu rozdzielu.

## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

### Analiza czystości frakcji

- Aby efektywnie oczyszczać białka używając do tego różnych technik, musimy być w stanie ocenić skuteczność poszczególnych procesów, którym poddajemy oczyszczaną przez nas próbkę. Istnieją różne sposoby na kontrolowanie obecności docelowego białka w określonych frakcjach. W przypadku enzymów, najlepszym sposobem na kontrolę procesów oczyszczania jest pomiar aktywności enzymatycznej uzyskiwanych frakcji.
- Możemy wyróżnić kilka parametrów, które pozwalają oceniać czystość próbki i w efekcie skuteczność technik służących oczyszczaniu docelowego białka:
- Całkowita ilość białka (mg) – mówi nam o tym ile białka znajduje się w próbce (w odniesieniu do masy)
- Aktywność enzymatyczna (umol/min czy M/s; U) – mówi nam o aktywności enzymatycznej oczyszczanego ekstraktu w odniesieniu do jednostki aktywności enzymatycznej
- Aktywność właściwa (U/mg) – stosunek aktywności enzymatycznej do ilości białka wyrażonej masowo
- Wydajność (%) – parametr opisujący procentowo aktywność enzymatyczną ekstraktu, która pozostała po procesach oczyszczania w odniesieniu do próbki nieoczyszczonej (próbka nieoczyszczona charakteryzuje się zatem wydajnością 100%)

$$\text{Wydajność} = \frac{\text{Aktywność enzymatyczna próbki oczyszczonej}}{\text{Aktywność enzymatyczna próbki nieoczyszczonej}} \times 100\%$$

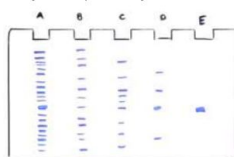
- Stopień oczyszczenia – miara tego jak efektywny jest każdy stopień oczyszczania enzymu docelowego

$$\text{Stopień oczyszczenia} = \frac{\text{Aktywność właściwa próbki oczyszczonej}}{\text{Aktywność właściwa próbki nieoczyszczonej}}$$

## Wyodrębnianie i oczyszczanie enzymów

### Analiza czystości frakcji

- Przykład:** wykorzystując jedną z metod lizy komórek, a następnie po wyizolowaniu frakcji białek uzyskano ekstrakt zawierający mieszaninę białek, z której to chcielibyśmy wyizolować jeden konkretny enzym. Zastosowano szereg etapów oczyszczania, po każdym z których monitorowano pięć parametrów pozwalających ocenić czystość próbki oraz dodatkowo czystość monitorowano za pomocą techniki SDS-PAGE
- Poniżej przedstawiono jak mógłby wyglądać układ wybarwionych prążków po elektroforezie SDS-PAGE po każdym etapie oczyszczania:



- A – próbka nieoczyszczona
- B – Frakcja odebrana po wysalaniu białek siarczanem amonu
- C – Frakcja odebrana po chromatografii jonowymiennej
- D – Frakcja odebrana po chromatografii wykluczania
- E – Frakcja odebrana po chromatografii powinowactwa

- Na podstawie uzyskiwanych po każdym etapie wartości aktywności enzymatycznej obliczono parametry czystości oczyszczanych frakcji:

| Etap | Całkowita ilość białka (mg) | Aktywność enzymatyczna (U) | Aktywność właściwa (U/mg) | Wydajność (%) | Stopień oczyszczenia |
|------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|----------------------|
| A    | 2500                        | 200 000                    | 80                        | 100           | 1                    |
| B    | 800                         | 160 000                    | 200                       | 80            | 2,5                  |
| C    | 200                         | 120 000                    | 600                       | 60            | 7,5                  |
| D    | 25                          | 85 000                     | 3 400                     | 42,5          | 42,5                 |
| E    | 2                           | 70 000                     | 35 000                    | 35            | 437,5                |



## Kinetyka enzymów – wyrażanie aktywności enzymów

- W enzymologii stosuje się dwie podstawowe jednostki, które wyrażają aktywność enzymów

| Jednostka                                                                                        | Definicja                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Katal (kat)                                                                                      | Ilość enzymu przekształcającego 1 mol substratu na sekundę (jednostka zgodna z systemem SI)          |
| Jednostka enzymu/enzymatyczna (U; rzadziej IU)                                                   | Ilość enzymu przekształcającego 1 μmol substratu na minutę (bardziej praktyczna)                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>1 kat = 60 000 000 U</li> <li>1 nkat = 0,016 U</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>1 U = 0,00000001667 kat</li> <li>1 U = 16,667 nkat</li> </ul> |

## Kinetyka enzymów – wyrażanie aktywności enzymów

- Podstawową cechą enzymów jest ich aktywność enzymatyczna/katalityczna. Aktywność tą można mierzyć ilościowo i wyrażać w różnej formie w zależności od potrzeb. Poniżej w tabeli znajdują się najczęstsze formy wyrażania aktywności enzymów oraz najważniejsze parametry definiujące/wpływające na aktywność enzymów:

| Parametr                                                      | Definicja                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Szybkość maksymalna<br>(ang. <i>Maximum velocity</i> )        | $V_{max} = k_{kat}[E]_0$<br>Szybkość maksymalna reakcji wyrażona w jednostce stężenia przez czas (katal albo IU); <b>zależna od stężenia enzymu</b>                                                                                           |
| Liczba obrotowa enzymu<br>(ang. <i>Turnover number</i> )      | $k_{kat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$<br>Liczba obrotowa enzymu wyrażona w [s <sup>-1</sup> ]<br><b>niezależna od stężenia enzymu</b>                                                                                                             |
| Stała katalityczna<br>(ang. <i>Catalytic constant</i> )       | $k_{kat}$ [s <sup>-1</sup> ]<br>Identyczna z liczbą obrotową enzymu                                                                                                                                                                           |
| Stała Michaelisa<br>(ang. <i>Michaelis constant</i> )         | $K_M$ [M]<br>(stała dysocjacji kompleksu ES rozszerzona dodatkowo o stałą katalityczną $k_{kat}$ )<br><u>W uproszczeniu!</u> jest to miara powinowactwa enzymu do substratu i/lub stężenie substratu przy którym reakcja osiąga 50% $V_{max}$ |
| Wydajność katalityczna<br>(ang. <i>Catalytic efficiency</i> ) | $\frac{k_{kat}}{K_M}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]<br>Stała specyficzności enzymu w reakcji; wyższe wartości wskazują na większą specyficzność                                                                                          |
| Aktywność objętościowa<br>(ang. <i>Volume activity</i> )      | Aktywność enzymatyczna (wyrażona w katalach lub IU) na jednostkę objętości (jednostka enzymatyczna przez mililitr)                                                                                                                            |
| Aktywność właściwa<br>(ang. <i>Specific activity</i> )        | Aktywność enzymatyczna (wyrażona w katalach lub IU) na stężenie białka (enzymu) (jednostka enzymatyczna przez miligram)                                                                                                                       |

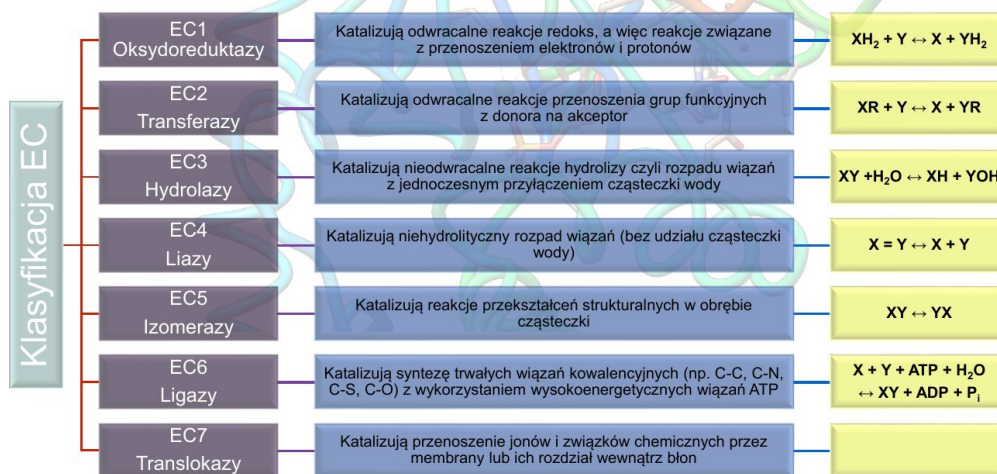
## Klasyfikacja EC enzymów i nazewnictwo

- Enzymy nazywa się w dwojaki sposób. Pierwszy sposób to dwuczęściowa nazwa enzymu, gdzie część pierwsza, zakończona przyrostkiem "-aza", określa typ katalizowanej reakcji, a druga – substrat(y) reakcji (np. dekarboksylaza pirogronianowa). System nomenklatury EC (ang. *Enzyme Classification*) z kolei jest oparty na czterocłonowym zapisie numerycznym. Podstawą tej klasyfikacji jest typ i mechanizm katalizowanej przez nie reakcji oraz używane substraty.
- Każdy enzym posiada swój kod o postaci: EC xx.xx.xx.xx, gdzie litery x oznaczają cyfry arabskie. Sam numer składa się z 4 członów: pierwszy określa główną klasę, charakteryzującą typ katalizowanej reakcji; drugi określa podklasę, charakteryzującą zazwyczaj rodzaj wiązania lub grupy, której dotyczy reakcja; trzeci określa pod-podklasę, która może zawierać: dokładniejszą specyfikację wiązania, grupę związków do której należy substrat, nazwę donora lub akceptora; czwarty wskazuje na określony enzym przez podanie nazwy substratu reakcji.
- Dla przykładu: kod EC kinazy pirogronianowej wynosi EC 2.7.1.40, gdzie liczby w kolejności świadczą o przynależności enzymu do: klasy 2, czyli transferaz, podklasy 7, czy enzymów przenoszących grupy fosforanowe, pod-podklasy 1, przenoszących na akceptor z grupą CH-OH. Ostatnia liczba (40) oznacza indywidualny numer kinazy pirogronianowej w obrębie pod-podklasy 1.
- Przykłady nazewnictwa enzymów:

| Kod         | Nazwa systematyczna                                | Nazwa potoczna                |
|-------------|----------------------------------------------------|-------------------------------|
| EC.1.1.1.1  | Oksydoreduktaza alkohol:NAD                        | Dehydrogenaza alkoholowa      |
| EC.2.6.1.2  | Aminotransferaza L-alanina:2-oksoglutaran          | Aminotransferaza alaninowa    |
| EC.3.1.3.9  | Fosfohydrolaza D-glukozy-6-fosforanowa             | Glukozy-6-fosfataza           |
| EC.4.1.1.1  | Karboksylaza 2-oksokwasów                          | Dekarboksylaza pirogronianowa |
| EC.5.3.1.6  | Izomeraza D-rybozy-5-fosforanowa                   | Izomeraza pentozofosforanowa  |
| EC.6.3.4.2  | Ligaza UTP:amoniak                                 | Syntetaza CTP                 |
| EC.7.4.2.13 | ATP fosfohydrolaza (typ ABC, importująca tyrozynę) | Transportaza ABC tyrozyny     |

## Klasyfikacja EC enzymów i nazewnictwo

- Zgodnie z przyjętą klasyfikacją EC, enzymy dzielimy na 7 klas:

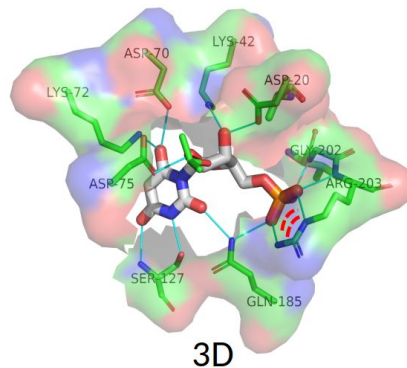
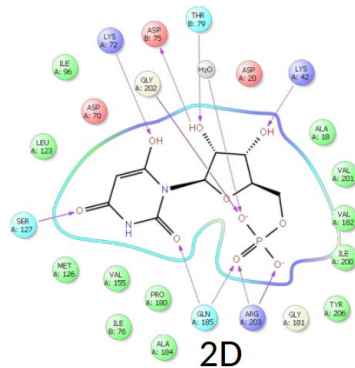




## kataliza enzymatyczna

### mechanizmy

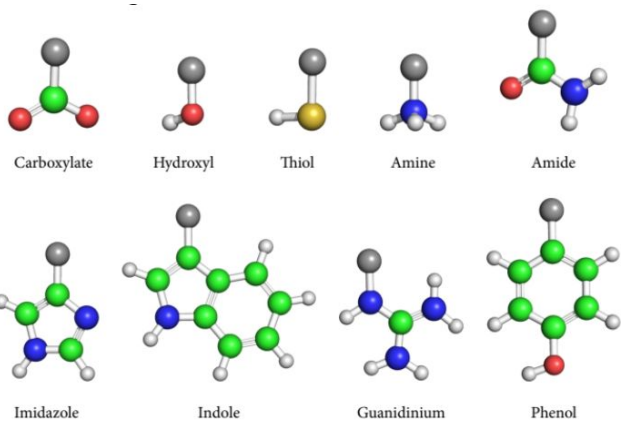
- Rola miejsca aktywnego:
  - wiązanie substratu/produktu



## kataliza enzymatyczna

### mechanizmy

- Koordynacja za pomocą właściwości fizyko-chemicznych aminokwasów i związków chemicznych zlokalizowanych miejscu aktywnym (kofaktorów)



## kataliza enzymatyczna

### mechanizmy

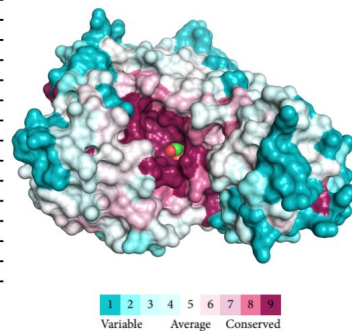
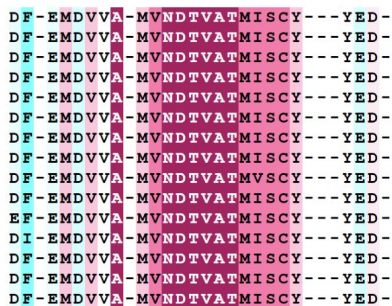
- Poszczególne aminokwasy wykazują różne powinowactwo do miejsca aktywnego w związku z ich zdolnością do konwersji substrat-produkt.

|      | Arg | Asn | Asp | Cys | Gln | Glu | His | Lys | Phe | Ser | Thr | Trp | Tyr |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| EC 1 | •   | •   | •   | ●   | •   | •   | ●   | •   | •   | •   | •   | •   | •   |
| EC 2 | •   | •   | •   | ●   | •   | •   | ●   | •   | •   | •   | •   | •   | •   |
| EC 3 | •   | •   | •   | •   | •   | •   | ●   | •   | •   | •   | •   | •   | •   |
| EC 4 | •   | •   | •   | •   | •   | •   | ●   | •   | •   | •   | •   | •   | •   |
| EC 5 | •   | •   | •   | ●   | •   | •   | ●   | •   | •   | •   | •   | •   | ●   |
| EC 6 | •   |     | •   | •   | •   | •   | ●   | ●   |     | •   | •   | •   |     |

## kataliza enzymatyczna

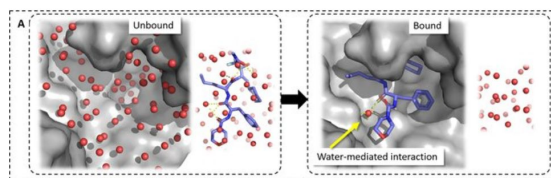
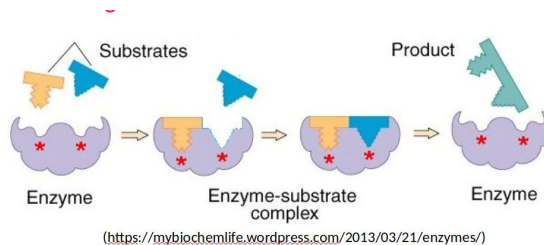
### mechanizmy

- Kluczowe aminokwasy w miejscu aktywnym wykazują wysoką konserwację ewolucyjną.
- Wynika to z ich roli w :
  - koordynacji substratu
  - udziale w mechanizmie katalizy



## kataliza enzymatyczna mechanizmy

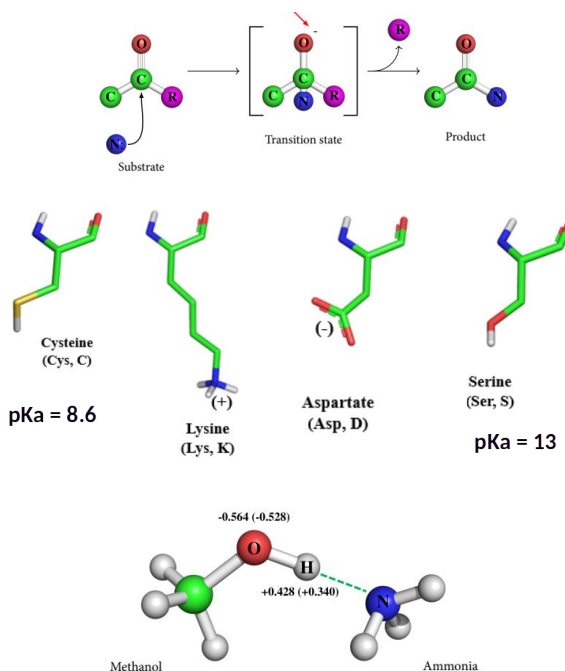
- Efekty wywierane przez miejsce aktywne:
  - ograniczenie swobody ruchu substratu
  - niekowalencyjna stabilizacja półproduktów
  - kontrolowany transfer elektronów/protonów/grup funkcyjnych
  - kontrolowane zrywanie i tworzenie wiązań
- Efekty energetyczne:
  - redukcja entalpii (tworzenie kompleksu [ES])
  - wzrost entropii (eliminacja wody z miejsca aktywnego)



(Communications Chemistry 3(1):19)

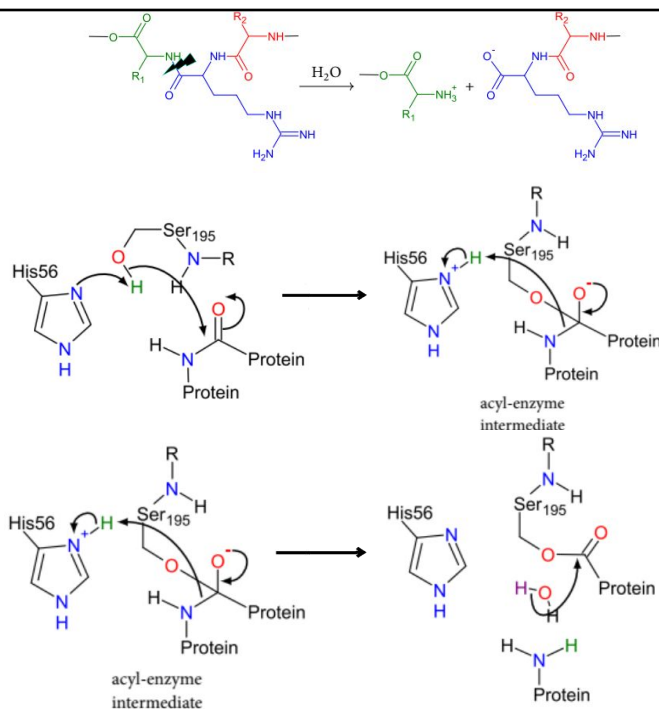
## kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Kataliza kowalencyjna i efekty elektronowe:
  - S, O, N wykorzystywane w ataku nukleofilowym
  - Cys, Lys, Asp, Ser, His, Thr, Glu, Tyr są wykorzystywane w katalizie kowalencyjnej
  - deprotonacja osiągana jest poprzez efekty polaryzacji ładunku



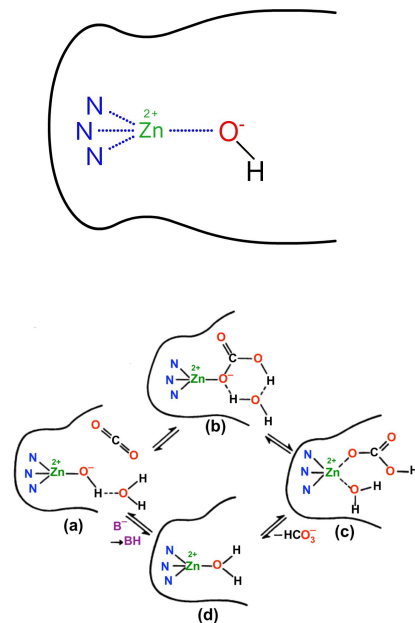
## kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Hydroliza wiązań peptydowych
  - Polaryzacja i deprotonacja substratu w trypsynie osiągana jest poprzez atak Ser195 i His56
  -



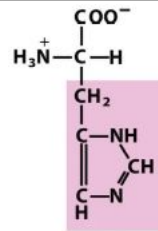
## kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Kataliza z wykorzystaniem metali:
  - Zn
  - Cu
  - Mg
  - Mn
  - Fe
  - Co
  - Mo
  - V
  - W
- Reakcje:
  - utleniania i redukcji
  - hydrolizy
  - transferu grup funkcyjnych (fosforanowych, tlenu)
- Metale odpowiadają:
  - transport elektronów
  - stabilizację elektrostatyczną
  - aktywację substratów

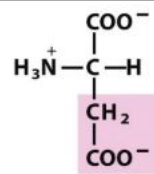


## kataliza enzymatyczna mechanizmy

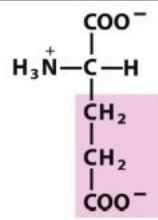
- Wykorzystanie równowagi kwasowo zasadowej:
  - wymaga transportu  $H^+$  pomiędzy enzymem i substratem
  - Najczęściej wykorzystywane aminokwasy:
    - histydyna
    - kwas asparaginowy
    - kwas glutaminowy



**Histidine**  
( $pK_a = 6.5$ )



**Aspartate**



**Glutamate**

( $pK_a \approx 4$ )

