فصل دوم
اتصال لیگاندها به ماکرومولکول‌ها

در این فصل رفتار تعادلی اتصال لیگاندها و یون‌های فلزی به ماکرومولکول‌ها در حالت محلول مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در این رابطه دو حالت را در نظر خواهیم گرفت: در یکی از این دو حالت، ماکرومولکول دارای یک جایگاه اتصال برای مولکول لیگاند و در حالت دیگر ماکرومولکول دارای n جایگاه اتصال یکسان برای مولکول‌های لیگاند می‌باشد.

۲-۱. یک جایگاه اتصال در ساختمان ماکرومولکول:

ساده‌ترین حالت وقتی است که ماکرومولکول (P) دارای یک جایگاه اتصال برای لیگاند و یا یون فلزی (L) باشد. اتصال لیگاند به ماکرومولکول را می‌توان به صورت زیر نشان داد:

$$P + L \leftrightarrow PL \qquad (۱-۲)$$

ثابت تعادل برای این واکنش تجمع به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \qquad (۲-۲)$$

اما غالبا چنین فرآیند تعادلی را بر حسب ثابت تفکیک آن (K_d) نشان می‌دهند:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \qquad (۳-۲)$$

هر چه K_d بزرگتر باشد یعنی تمایل به تشکیل کمپلکس PL کمتر است و تمایل به تفکیک بیشتر است و هر چه K_d کوچکتر باشد، تمایل به تشکیل کمپلکس PL بیشتر است و به عبارت دیگر کمپلکس PL محکم‌تر[۱] است. دو ثابت تجمع (K_a) و تفکیک (K_d) به وسیله رابطه ساده $K_a K_d = ۱$ به هم مرتبط می‌شوند.

---

[۱] Tighter

کمیت اشباع کسری[۲] را با Y نشان می‌دهند و به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$Y = \frac{\text{غلظت L متصل شده به P}}{\text{غلظت کل تمام شکل های P}} = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} \qquad (۴-۲)$$

از معادله (۲-۳) داریم:

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d}$$

و با جاگذاری خواهیم داشت:

$$Y = \frac{[P][L]/K_d}{[P]+[P][L]/K_d}$$

$$Y = \frac{[L]}{K_d + [L]} \qquad (۵-۲)$$

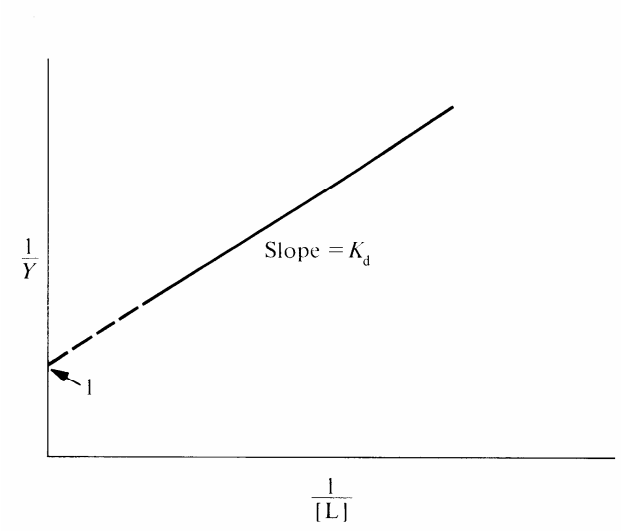
مقدار Y می تواند بین صفر (وقتی ۰ = [PL]) و ۱ (وقتی ۰ = [P]) تغییر کند. به عنوان مثال، وقتی $Y = ۰/۵$ است، نیمی از مولکول‌های P با L تشکیل کمپلکس داده‌اند و نیمی از مولکول‌های P به حالت آزاد می‌باشند و در این حالت $K_d = [L]$ است.

با معکوس کردن دو طرف معادله (۲-۵) خواهیم داشت:

$$\frac{۱}{Y} = ۱ + \frac{K_d}{[L]} \qquad (۶-۲)$$

با رسم نمودار $۱/Y$ در مقابل $۱/[L]$ خط راستی بدست خواهد آمد که شیب آن برابر K_d است (شکل ۲-۱). این نمودار، نمودار هوگز-کلاتز[۳] نیز نامیده می‌شود.

[۲] Fractional Saturation
[۳] Hughes-Klotz Plot



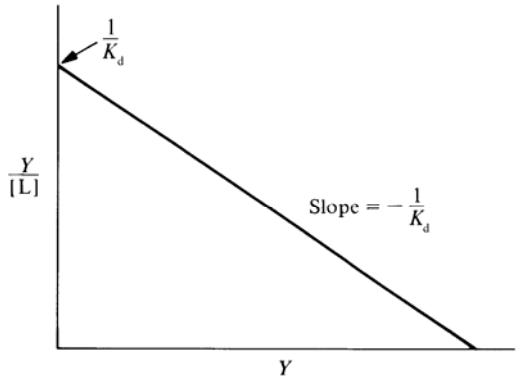
شکل (۲-۱): نمودار هوگز-کلاتز (تغییرات معکوس اشباع کسری در مقابل معکوس غلظت لیگاند) در حالتی که $n = ۱$ باشد.

می‌توان معادله (۲-۶) را به صورت زیر نیز نوشت:

$$\frac{Y}{[L]} = \frac{۱}{K_d} - \frac{Y}{K_d} \qquad (۷-۲)$$

نمودار $Y/[L]$ در مقابل Y خط راستی خواهد بود که شیب آن برابر با $-۱/K_d$ می باشد (شکل ۲-۲). این نمودار به نام نمودار اسکاچارد[۴] معروف است.

[۴] Scatchard Plot



شکل (۲-۲): نمودار اسکاچارد (تغییرات $Y/[L]$ در مقابل Y) در حالتی که $n = ۱$ باشد.

بنابراین اگر بتوانیم مقدار لیگاند متصل شده به P را (با معلوم بودن غلظت های کل P و L) اندازه بگیریم، آنگاه می‌توانیم ثابت تفکیک را تعیین نماییم.

۲-۲. n جایگاه اتصال یکسان در ساختمان ماکرومولکول:

در این حالت ماکرومولکول دارای n جایگاه اتصال یکسان است. یعنی هر جایگاه اتصال (بدون توجه به اینکه دیگر جایگاه‌های اتصال توسط مولکول‌های لیگاند اشغال شده‌اند یا نه) دارای مقدار K_d یکسانی است. در وهله اول ماکرومولکولی را با $n = ۲$ جایگاه اتصال در نظر می‌گیریم و سپس آنرا به حالت $n > ۲$ جایگاه اتصال تعمیم می‌دهیم.

اگر یک ماکرومولکول دارای دو جایگاه اتصال معادل باشد، آنگاه دارای دو تعادل اتصالی خواهد بود:

$$P + L \leftrightarrow PL \qquad K_۱ = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

$$PL + L \leftrightarrow PL_۲ \qquad K_۲ = \frac{[PL][L]}{[PL_۲]}$$

که در این معادلات، $K_۱$ ثابت تفکیک اول و $K_۲$ ثابت تفکیک دوم است. حال می‌توانیم اشباع کسری را به صورت زیر بنویسیم:

$$Y = \frac{\text{غلظت L متصل شده به P}}{\text{غلظت کل تمام شکل های P}}$$

$$= \frac{[PL] + ۲[PL_۲]}{[P] + [PL] + [PL_۲]} \qquad (۸-۲)$$

از آنجایی که در $PL_۲$ دو مولکول L به یک مولکول P متصل شده است، غلظتش در ۲ ضرب شده است و چون داریم؛

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_۱} \qquad \text{و} \qquad [PL_۲] = \frac{[PL][L]}{K_۲}$$

حال می‌توانیم بنویسیم:

$$Y = \frac{[P][L]/K_۱ + ۲[P][L]^۲/K_۱K_۲}{[P] + [P][L]/K_۱ + [P][L]^۲/K_۱K_۲} = \frac{[L]/K_۱ + ۲[L]^۲/K_۱K_۲}{۱ + [L]/K_۱ + [L]^۲/K_۱K_۲} \qquad (۹-۲)$$

این معادله را می‌توان به صورت ساده‌تری نیز نوشت. چون دو جایگاه اتصال مستقل و معادلند، $K_۱$ و $K_۲$ به وسیله یک فاکتور آماری به یکدیگر مربوط می‌شوند. لیگاند L می‌تواند از کمپلکس $PL_۲$ به دو طریق تفکیک شود (یعنی L می‌تواند از هر یک از دو جایگاه تفکیک شود) ولی L می‌تواند تنها با یک جایگاه خالی در کمپلکس PL (یعنی تنها به یک طریق) مجتمع شود. رابطه کلی بین ثابت تفکیک (K_i) و ثابت تفکیک ذاتی[۵] توسط معادله زیر داده می‌شود:

$$K_i = \left(\frac{i}{n - i + ۱}\right) K \qquad (۱۰-۲)$$

که در آن، K ثابت تفکیک ذاتی نامیده می‌شود. در این مورد، ۲ و ۱ = i و ۲ = n است و در نتیجه داریم:

[۵] Intrinsic Dissociation Constant

$$K_۱ = \frac{K}{۲} \qquad \text{و} \qquad K_۲ = ۲K$$

از نقطه نظر آماری می‌بینیم که اولین ثابت تفکیک چهار مرتبه کوچکتر از ثابت دوم تفکیک است یعنی $K_۲ = ۴\ K_۱$. ثابت تفکیک ذاتی در واقع میانگین هندسی[۶] $K_۱$ و $K_۲$ است. یعنی:

$$K = \sqrt{K_۱ K_۲}$$

حال می‌توان معادله (۲-۹) را به صورت زیر نوشت:

$$Y = \frac{۲[\mathrm{L}]/K + ۲[\mathrm{L}]^۲/K^۲}{۱ + ۲[\mathrm{L}]/K + [\mathrm{L}]^۲/K^۲} = \frac{۲[\mathrm{L}]/K\ (۱ + [\mathrm{L}]/K)}{(۱ + [\mathrm{L}]/K)^۲} = \frac{۲[\mathrm{L}]}{K + [\mathrm{L}]} \qquad (۱۱-۲)$$

و به طور کلی اگر یک ماکرومولکول دارای n جایگاه اتصال معادل باشد می‌توان نوشت:

$$Y = \frac{n[\mathrm{L}]}{K + [\mathrm{L}]} \qquad (۱۲-۲)$$

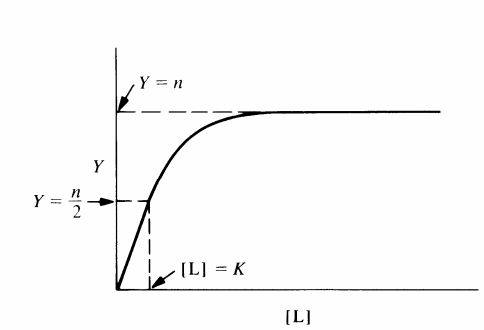
معادله فوق را می‌توان به شکل‌های مختلف نوشت و نمودار هر یک را رسم نمود. سه روش معمول کاربرد این معادله به صورت زیر است:

۲-۲-۱. نمودار مستقیم[۷]:

با رسم تغییرات Y در مقابل غلظت لیگاند نمودار زیر بدست می‌آید (شکل ۲-۳):

---

[۶] Geometric Mean
[۷] Direct Plot



شکل (۲-۳): نمودار اشباع کسری در مقابل غلظت لیگاند.

نمودار مستقیم یک منحنی هذلولی[۸] خواهد بودکه مشخصه اتصال ساده است (یعنی تمام جایگاه‌های اتصال معادلند و هیچ میان‌کنشی با هم ندارند). وقتی $[\mathrm{L}] = K$ باشد، $Y = n/۲$ خواهد بود و در غلظت‌های بسیار زیاد لیگاند، $[\mathrm{L}] >> K$ خواهد بود و در نتیجه $Y = n$ می‌شود.
نمودار مستقیم در تعیین n و K خیلی مفید نیست زیرا تعیین مقدار n در غلظت‌های زیاد لیگاند غالبا مشکل است (توجه داشته باشیدکه جهت تعیین K نیازمند دانستن n هستیم).

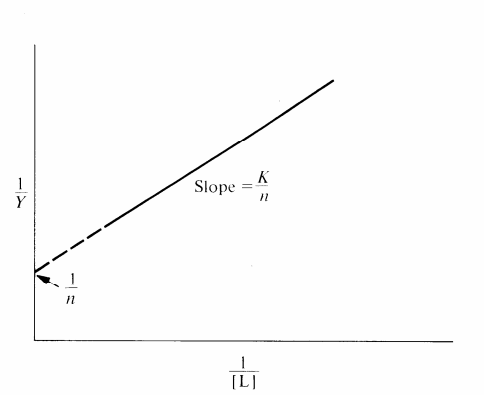
۲-۲-۲. نمودار معکوس دوجانبه[۹]:

با معکوس نمودن دو طرف معادله (۲-۱۲) خواهیم داشت:

$$\frac{۱}{Y} = \frac{۱}{n} + \frac{K}{n[L]} \qquad (۱۳-۲)$$

در نتیجه نمودار $۱/Y$ در مقابل $۱/[\mathrm{L}]$ خط راستی خواهد بود با شیب K/n و عرض از مبدا روی محور y ها نیز برابر $۱/n$ خواهد بود (شکل ۲-۴). همان‌طور که گفته شد، این نمودار معروف به نمودار هوگز-کلاتز نیز می‌باشد.

[۸] Hyperbolic
[۹] The Double Reciprocal Plot



شکل (۲-۴): نمودار هوگز-کلاتز (تغییرات معکوس اشباع کسری در مقابل معکوس غلظت لیگاند).

۲-۲-۳. نمودار اسکاچارد:

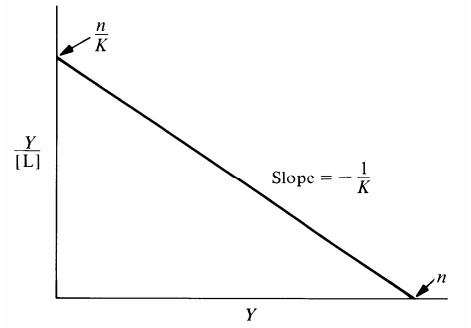
معادله (۲-۱۳) را می‌توان به صورت دیگری نیز نوشت:

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{n} + \frac{K}{n[\mathrm{L}]} = \frac{[\mathrm{L}] + K}{n[\mathrm{L}]} \;\Rightarrow\; Y[\mathrm{L}] + KY = n[\mathrm{L}]$$

با تقسیم طرفین معادله فوق بر K و با جابجایی خواهیم داشت:

$$Y = \frac{n[L]}{K} - \frac{Y[L]}{K} \;\Rightarrow\; \frac{Y}{[L]} = \frac{n}{K} - \frac{Y}{K}$$

این معادله، معادله اسکاچارد نیز نامیده می‌شود. نمودار $Y/[\mathrm{L}]$ در مقابل Y خط راستی خواهد بود با شیب $-1/K$ و طول از مبدا آن بر روی محور x ها نیز برابر n است (شکل ۲-۵):



شکل (۲-۵): نمودار اسکاچارد (تغییرات $Y/[L]$ در مقابل Y).

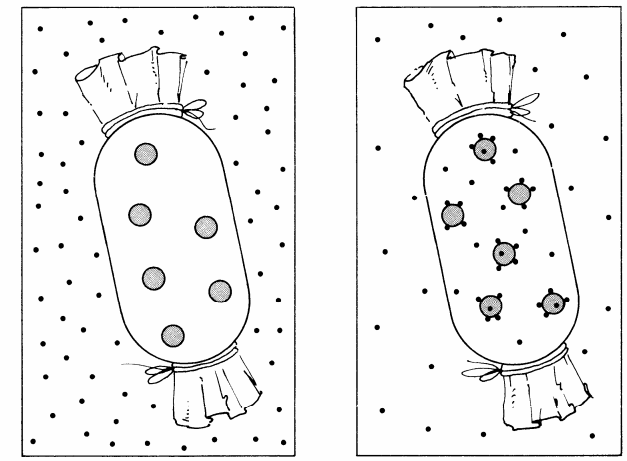
شکل نمودار اسکاچارد نیز اطلاعات مهمی را در مورد نحوه اتصال لیگاند به ماکرومولکول بدست می‌دهد. اگر نمودار اسکاچارد خطی باشد، اتصال لیگاند به ماکرومولکول به صورت ویژه[۱۰] و غیرمتعاون است. نمودار اسکاچارد تپه‌ای‌شکل نشان‌دهنده اتصال متعاون مثبت و نمودار اسکاچارد چاله‌ای‌شکل نشان‌دهنده اتصال متعاون منفی لیگاند به ماکرومولکول است.

۲-۳. دیالیز تعادلی[۱۱]:

دیالیز تعادلی راهی مناسب برای اندازه‌گیری اتصال مولکول‌های کوچک به ماکرومولکول‌هاست و می‌توان با استفاده ازداده‌های حاصل ازآن، K و n را تعیین نمود. روش کار در دیالیز تعادلی بدین ترتیب است که محلول ماکرومولکول در درون یک کیسه دیالیز قرار داده شده و سپس این کیسه درون یک محیط حاوی لیگاند با غلظت معین قرار داده می‌شود. ماکرومولکول قادر نیست که از منافذ کیسه دیالیز عبور کرده و خارج شود ولی مولکول‌های کوچک لیگاند می‌توانند به درون کیسه دیالیز نفوذ کرده و به مولکول‌های ماکرومولکول متصل شوند. اگر هیچ ماکرومولکولی در درون کیسه دیالیز وجود نداشته باشد، آنگاه غلظت لیگاند در داخل و خارج کیسه دیالیز در حالت تعادل یکسان خواهد بود. به دلیل حضور ماکرومولکول، در حالت تعادل غلظت لیگاند در داخل کیسه به اندازه تعداد لیگاندهای متصل‌شده به ماکرومولکول بیشتر از غلظت لیگاند در خارج کیسه خواهد بود و غلظت

[۱۰] Specific
[۱۱] Equilibrium Dialysis

لیگاند خارج کیسه نیز برابر با غلظت لیگاند آزاد در درون کیسه خواهد بود. در شکل (۲-۶) توزیع غلظت لیگاند در خارج و داخل کیسه دیالیز در زمان صفر و در زمان لازم برای رسیدن به حالت تعادل نشان داده شده است:



شکل (۲-۶): در دیالیز تعادلی، یک کسیه دیالیز که با محلول ماکرومولکول پر شده (دایره‌های تیره) در محلول حاوی مولکول‌های کوچک لیگاند قابل دیالیز (نقطه‌های کوچک) که قابلیت اتصال به ماکرومولکول را دارد، قرار داده می‌شود. در حالت تعادل، غلظت لیگاند آزاد در داخل و خارج کیسه دیالیز برابر است در حالی که غلظت کل لیگاند در داخل کیسه بیشتر از غلظت لیگاند آزاد در خارج کیسه می‌باشد.

مقادیر مورد نیاز برای تعیین غلظت لیگاند متصل‌نشده و همچنین غلظت کمپلکس PL از روابط زیر بدست می‌آید:

$$[\text{Unbound}] = [\text{L}] = [\text{L}]_{\text{outside}}$$

$$[\text{Complex}] = [\text{PL}] = [\text{L}]_{\text{inside}} - [\text{L}]_{\text{outside}}$$

غلظت P متصل‌نشده برابر خواهد بود با:

$$([\text{P}]_{\text{initial}} - [\text{PL}]) \qquad \text{یا} \qquad ([\text{P}]_{\text{initial}} - [\text{L}]_{\text{inside}} + [\text{L}]_{\text{outside}})$$

از اینرو برای حالت ساده اتـصال به یک جایگاه منفرد که به وسیله رابطه $P + L \leftrightarrow PL$ توصیف می‌شود می‌توان نوشت:

$$K_d = \frac{[L]_{outside}([P]_{initial} - [L]_{inside} + [L]_{outside})}{[L]_{inside} - [L]_{outside}}$$

برای بدست آوردن داده‌های معتبر شرایط ویژه‌ای بایستی وجود داشته باشد:

۱- اتصال غیرویژه لیگاند و ماکرومولکول به خود کیسه دیالیز کوچک و ترجیحا قابل اندازه‌گیری باشد.
۲- اتصال بایستی قوی باشد زیرا اتصال ضعیف موجب نتایج منفی کاذب می‌گردد. اگر ماکرومولکول بسیار درشت باشد و اصلا به مولکول‌های کوچک متصل نگردد، اندازه بزرگ آن چنان حجمی را اشغال می‌کند که مولکول‌های کوچک را از درون کیسه دیالیز به بیرون آن اخراج می‌کند و به همین دلیل اتصال باید همیشه آنقدر قوی باشد که این اثر منفی قابل صرف نظرکردن باشد.
۳- اگر ماکرومولکول و لیگاند باردار باشند، آنگاه اثر دونان[۱۲] وجود خواهد داشت. این اثر که ناشی از عدم توانایی ماکرومولکول باردار در عبور از غشاء و لزوم برقراری اصل خنثایی الکتریکی[۱۳] محلول‌هاست، موجب ایجاد اختلاف در غلظت لیگاندهای باردار در دو سمت غشاء می‌شود. از اینرو، اثر دونان می‌تواند منجر به بدست‌آمدن اطلاعات غیرصحیح شود. برای اجتناب از اثر دونان می‌توان غلظت نمک موجود در محلول را به نحوی افزایش داد که بارهای ایجادکننده اثر دونان پوشیده شوند.

۲-۴. میان کنش‌های آلوستریک[۱۴] و متعاون:

اصطلاح آلوستریک از واژه‌های یونانی Allos به معنای متفاوت یا دیگر و Steric به معنای فضایی و یا ساختمانی گرفته شده است و در نتیجه واژه آلوستریک به معنای فضایی دیگر و یا ساختمانی دیگر است زیرا آنزیم های آلوستریک علاوه بر جایگاه فعال، دارای جایگاه دیگری نیز می باشند که مولکول‌های تنظیم‌کننده خاصی به طور برگشت‌پذیر و بدون ایجاد پیوند کوالان به آن متصل می‌شوند.

[۱۲] Donnan Effect
[۱۳] Electroneutrality Principle
[۱۴] Allosteric

اتصال مولکول تنظیم‌کننده[۱۵] به جایگاه آلوستریک موجب تغییر در بنای فضایی آنزیم شده و در نتیجه فعالیت کاتالتیک آنزیم افزایش و یا کاهش می‌یابد.

فعال کنندگی و مهارکنندگی آلوستریک یکی از مهمترین روش های تنظیم فعالیت آنزیمی در بسیاری از مسیرهای متابولیکی است. اولین واکنش یک مسیر متابولیکی معمولا توسط یک آنزیم آلوستریک کاتالیز می‌شود که به‌وسیله جلوگیری از انباشته‌شدن حدواسط‌ها و همچنین محصول نهایی به عنوان یک راهنما و یا پیشقدم[۱۶] برای کل مسیر متابولیکی عمل می کند زیرا این آنزیم کندترین مرحله (مرحله تعیین کننده سرعت) را کاتالیز می کند و در نتیـجه تعیین کننده سرعت کل مسیر متابولیکی است. چنین آنزیم هایی نه تنها یک عمل کاتالتیک خاص را انجام می دهند، بلکه قادرند فعالیت کاتالتیک خود را نیز در پاسخ به علایم خاصی افزایش و یا کاهش دهند و از آنجایی که اولین مرحله یک مسیر سنتزی غالبا با هیدرولیز ATP همراه است، کنترل این مرحله از هدررفتن امکانات انرژی سلول جلوگیری می‌نماید.

قابل توجه است که پدیده آلوستریسم تنها خاص آنزیم‌ها نمی‌باشد بلکه در هر جا که تغییر آرایش فضایی پروتئین خواص آن را تغییر دهد، پدیده آلوستریسم مورد توجه قرار می گیرد. به عنوان مثال، در پروتئین هایی که نقش حمل کننده یون‌ها و یا مولکول های خاصی را در یک موجود زنده بر عهده دارند نیز پدیده آلوستریسم مشاهده می‌شود.

شواهد تائیدکننده تئوری آلوستریسم به شرح زیر می‌باشند:

۱- مولکول تنظیم کننده شباهتی به سوبسترا نداشته و مولکول آنزیم ویژگی زیادی نسبت به مولکول تنظیم کننده نشان می‌دهد. بنابراین مولکول‌های سوبسترا و تنظیم کننده نمی‌توانند بر سر اتصال به یک جایگاه منفرد در مولکول آنزیم با هم رقابت کنند.

۲- غیرطبیعی کردن ملایم آنزیم های آلوستریک موجب از دست رفتن حساسیت آنزیم نسبت به اثرات مولکول تنظیم کننده می‌شود، بدون اینکه فعالیت کاتالتیک آنزیم را تغییر دهد. در واقع فرآیند غیرحساس‌شدن قوی‌ترین گواه بر وجود جایگاه‌های مجزا برای مولکول‌های سوبسترا و تنظیم کننده در ساختمان آنزیم آلوستریک است. به نظر می‌رسد فرآیند غیرحساس‌شدن، ساختمان جایگاه آلوستریک را به نحوی تغییر می‌دهد که دیگر مولکول تنظیم کننده نمی‌تواند به آن متصل شود و این در حالی

[۱۵] Regulator
[۱۶] Pace Maker

است که جایگاه کاتالتیک که در قسمت دیگری از مولکول قرار دارد، بدون تغییر باقی می‌ماند. همچنین نشان داده شده است که در بسیاری از موارد، فرآیند غیرحساس‌شدن موجب تفکیک آنزیم طبیعی به زیرواحدهای سازنده‌اش می‌شود و این تفکیک از میان‌کنش بین جایگاه‌های کاتالتیک و تنظیمی جلوگیری می‌نماید.

۳- اگر دو جایگاه اتصال سوبسترا و تنظیم‌کننده مجزا باشند، اتصال مولکول تنظیم‌کننده باید موجب تغییری در بنای فضایی آنزیم شود به نحوی که ساختمان جایگاه فعال تغییر کند. این تغییر آرایش فضایی به عنوان انتقال اطلاعات بین جایگاه‌های تنظیمی و کاتالتیک تعبیر می‌شود و پدیده تعاونی که ویژگی خاص آنزیم‌های آلوستریک می‌باشد، موید این مطلب است. آنزیم‌های آلوستریک بر خلاف آنزیم‌های ساده که از سینتیک میکائیلیس-منتن تبعیت می‌کنند، از سینتیک سیگموییدی تبعیت می‌نمایند. تعبیر ممکن برای سینتیک سیگموییدی این است که هر آنزیم دارای بیش از یک جایگاه کاتالتیک برای اتصال سوبسترا است و اتصال سوبسترا به یک جایگاه بر فرآیند اتصال مولکول‌های بعدی سوبسترا به سایر جایگاه‌ها تاثیر می‌گذارد و شکلی از انتقال اطلاعات بین جایگاه‌های اتصال وجود دارد.

۲-۵. میان‌کنش‌های هوموتروپیک[۱۷] و هتروتروپیک[۱۸]:

میان کنش هوموتروپیک دلالت بر وجود میان کنش بین لیگاندهای یکسان در اتصال به ماکرومولکول دارد. به عبارت دیگر، اتصال یک نوع لیگاند به یک جایگاه بر اتصال مولکول‌های لیگاند دیگر از همان نوع اثر می‌گذارد. در عوض، میان‌کنش هتروتروپیک دلالت بر وجود میان‌کنش بین لیگاندهای غیریکسان در اتصال به ماکرومولکول دارد. به بیان دیگر، اتصال یک نوع لیگاند بر اتصال مولکول‌های لیگاند از نوع دیگر تاثیر می‌گذارد.

۲-۶. اثرات تعاونی:

اساس تئوری اتصال متعاون بدین صورت است که مولکول یا یون (لیگاند) به ماکرومولکولی متصل می‌شود که تعداد زیادی جایگاه اتصالی دارد. در این صورت دو حالت برای اتصال وجود خواهد داشت:

---

[۱۷] Homotropic Interactions
[۱۸] Heterotropic Interactions

یا تمایل[۱۹] تمامی جایگاه‌های اتصال تا رسیدن به یک مقدار جدید به صورت ناگهانی تغییر می‌کند و یا اینکه تمایل یک یا چند جایگاه به تدریج تغییر می‌نماید. چنین اثری که طی آن اتصال یک مولکول لیگاند اتصال لیگاندهای بعدی را تسهیل می‌کند، به اثر تعاونی مثبت معروف است و اگر تمایل به اتصال دیگر مولکول‌های لیگاند کاهش یابد اثر، تعاونی منفی خواهد بود. اثرات تعاونی ممکن است در اتصال مولکول‌های سوبسترا، فعال‌کننده و یا مهارکننده (که در حالت کلی لیگاند نامیده می‌شوند) بروز کند.

۲-۶-۱. مدل هیل[۲۰]:

اتصال متعاون در صورتی امکان‌پذیر است که پروتئین یا آنزیم بیش از یک جایگاه اتصالی داشته باشد. هیل با ارایه مدلی سعی کرد که رفتار سیگموییدی متصل‌شدن اکسیژن به هموگلوبین را توجیه نماید. وی پیشنهاد کرد که چنین رفتاری را می‌توان با استفاده از اتصال تعداد n_{H} مولکول از لیگاند L به ماکرومولکول یا آنزیم تشریح نمود. اتصال لیگاند یا سوبسترا به آنزیم یا ماکرمولکول را می‌توان توسط معادله زیر نشان داد:

$$\mathrm{M} + n_{\mathrm{H}}\mathrm{L} \leftrightarrow \mathrm{ML}_{n_{\mathrm{H}}} \qquad (۱۴-۲)$$

باید توجه داشت که در اینجا اتصال متعاون با درجه بالا برای یک گونه منفرد از لیگاند در نظر گرفته شده است، به طوری که از حالات واسط مثل $\mathrm{ML}_{۱}$ و $\mathrm{ML}_{۲}$ و ..... صرف‌نظر کرده‌ایم زیرا در این حالت غلظت حالات واسط در مقابل گونه $ML_{n_{\mathrm{H}}}$ ناچیز و قابل صرف‌نظرکردن است. ثابت تفکیک کلی واکنش فوق با معادله زیر تعریف می‌شود:

$$K_{\mathrm{d}} = \frac{[\mathrm{M}][\mathrm{L}]^{n_{\mathrm{H}}}}{[\mathrm{ML}_{n_{\mathrm{H}}}]} \qquad (۱۵-۲)$$

کسری از تعداد کل جایگاه‌های اتصال که توسط لیگاند اشغال شده‌اند را برای فرآیند اتصال تک مرحله‌ای فوق می‌توان به صورت زیر نشان داد:

---

[۱۹] Affinity
[۲۰] Hill Model

$$Y = \frac{[\mathrm{ML}_{n_\mathrm{H}}]}{[\mathrm{M}]+[\mathrm{ML}_{n_\mathrm{H}}]} \qquad (۱۶-۲)$$

از ترکیب معادلات (۲-۱۵) و (۲-۱۶) و حذف $[\mathrm{ML}_{n_\mathrm{H}}]$ خواهیم داشت:

$$Y = \frac{[\mathrm{L}]^{n_\mathrm{H}}}{K_\mathrm{d}+[\mathrm{L}]^{n_\mathrm{H}}} \qquad (۱۷-۲)$$

معادله (۲-۱۷) را می‌توان به صورت زیر مرتب نمود:

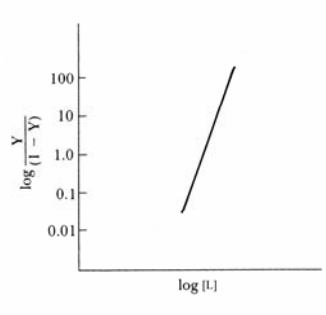
$$\frac{Y}{۱-Y} = \frac{[\mathrm{L}]^{n_\mathrm{H}}}{K_\mathrm{d}} \qquad (۱۸-۲)$$

با لگاریتم‌گرفتن از طرفین معادله (۲-۱۸) خواهیم داشت:

$$\log\left(\frac{Y}{۱-Y}\right) = n_\mathrm{H}\log[\mathrm{L}] - \log K_\mathrm{d} \qquad (۱۹-۲)$$

این رابطه را معادله هیل می‌نامند. در این رابطه n_H ضریب هیل نامیده می‌شود که حداکثر مقدار آن در حالت ساده برابر با n یعنی تعداد کل جایگاه‌های اتصال است، اما در عمل مقدار n_H برای ماکرومولکول‌هایی با چندین جایگاه اتصال بسیار کوچکتر از n می‌باشد. در مدل هیل، n_H معیار و اندازه‌ای از میزان اثر تعاونی در سیستم می‌باشد.

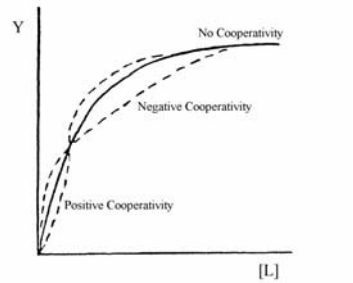
با رسم تغییرات $\log(Y/۱-Y)$ در مقابل $\log[\mathrm{L}]$، نمودار هیل بدست می‌آید (شکل ۲-۷):



شکل (۲-۷): نمودار هیل.

در این نمودار، شیب برابر با ضریب هیل (n_H) و عرض از مبدا برابر $-\log K_d$ است. اگر شیب نمودار هیل برابر واحد باشد اتصال به صورت غیرمتعاون است. شیب بزرگتر از واحد، نشان‌دهنده اتصال متعاون مثبت و شیب کوچکتر از واحد نشان‌دهنده اتصال متعاون منفی می‌باشد.

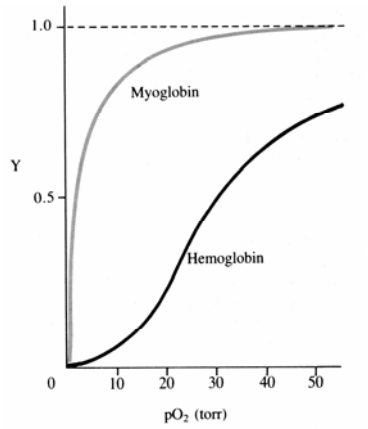
چون در مدل هیل فرض شده که هیچ گونه حدواسط پایداری (از قبیل $ML_{n_{H-1}}$، $ML_{n_{H-2}}$ و ...) حضور ندارد، مقدار n_H بدست آمده از چنین آنالیزی برابر با تعداد جایگاه‌های مستقل اتصال است. به عبارت دیگر، $n_H = n$ است که در حالتی که جایگاه‌های اتصال یکسان باشند، امکان وقوع دارد. در حالتی که یک و یا چندین جایگاه اتصال مستقل و غیرمیان‌کنش‌کننده موجود باشد، n_H برابر ۱ می‌شود و نمودار رسم‌شده بر اساس معادله (۲-۱۷) به صورت هذلولی شکل خواهد بود ولی در صورت میان‌کنش بین جایگاه‌ها، n_H بزرگتر و یا کوچکتر از ۱ خواهدبود. شکل (۲-۸) نشان‌دهنده تغییرات اشباع کسری در مقابل غلظت لیگاند برای اتصال غیرمتعاون، متعاون مثبت و متعاون منفی است.



شکل (۲-۸): نمودار تغییرات اشباع کسری در مقابل غلظت لیگاند و اثر میان‌کنش‌های متعاون مثبت و منفی بر آن.

۲-۶-۲. اتصال اکسیژن به هموگلوبین (Hb) و مایوگلوبین (Mb) :

پدیده تعاونی اولین بار برای اتصال اکسیژن به هموگلوبین مشاهده شد. هر چند که هموگلوبین آنزیم نیست ولی نحوه اتصالش به اکسیژن مشابه آنزیم‌های تنظیمی است (توجه داشته باشید که در این سیستم میان‌کنش هوموتروپیک وجود دارد زیرا همه سوبستراها (O_2) با هم برابرند). شکل (۲-۹) نشان‌دهنده نمودار درصد اشباع هموگلوبین و مایوگلوبین توسط اکسیژن است:



شکل (۲-۹): منحنی های اتصال اکسیژن به مایوگلوبین و هموگلوبین. مایوگلوبین در تمام فشارهای جزیی اکسیژن تمایل بیشتری از هموگلوبین نسبت به اکسیژن دارد. در ریه که فشار جزیی اکسیژن بالاست، هموگلوبین به طور کامل با اکسیژن اشباع می‌شود. در بافت‌ها که فشار جزیی اکسیژن پایین است، اکسیژن از هموگلوبین به مایوگلوبین منتقل می‌شود.

۲-۶-۲-۱. اتصال اکسیژن به مایوگلوبین:

اتصال اکسیژن به مایوگلوبین را می‌توان توسط معادله زیر نشان داد:

$$Mb + O_2 \leftrightarrow MbO_2 \qquad (۲۰-۲)$$

و

$$K_d = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \qquad (۲۱-۲)$$

و یا

$$[\mathrm{MbO_2}] = \frac{[\mathrm{Mb}][\mathrm{O_2}]}{K_\mathrm{d}}$$

اشباع کسری نیز از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$Y = \frac{[\mathrm{MbO_2}]}{[\mathrm{MbO_2}] + [\mathrm{Mb}]} \qquad (۲۲-۲)$$

با جاگذاری به جای $[\mathrm{MbO_2}]$ در معادله (۲-۲۲) خواهیم داشت:

$$Y = \frac{[\mathrm{O_2}]}{[\mathrm{O_2}] + K_\mathrm{d}}$$

چون اکسیژن گاز است، مناسب‌تر خواهد بود که غلظتش را بر حسب فشار جزیی ($p\mathrm{O_2}$) نشان دهیم:

$$Y = \frac{p\mathrm{O_2}}{p\mathrm{O_2} + K_\mathrm{d}} \qquad (۲۳-۲)$$

و

$$K_\mathrm{d} = \frac{[\mathrm{Mb}]\, p\mathrm{O_2}}{[\mathrm{MbO_2}]}$$

فشار جزیی اکسیژن وقتی که ۵۰٪ جایگاه‌های اتصال توسط اکسیژن پرشده‌اند ($[\mathrm{Mb}] = [\mathrm{MbO_2}]$) را اگر با P_{50} نشان دهیم ،آنگاه می‌توانیم بنویسیم:

$$K_\mathrm{d} = \frac{[\mathrm{Mb}]\, p\mathrm{O_2}}{[\mathrm{MbO_2}]} = p\mathrm{O_2} = P_{50}$$

اشباع کسری را می‌توان بر حسب $p\mathrm{O_2}$ و P_{50} نوشت:

$$Y = \frac{p\mathrm{O_2}}{p\mathrm{O_2} + P_{50}} \qquad (۲۴-۲)$$

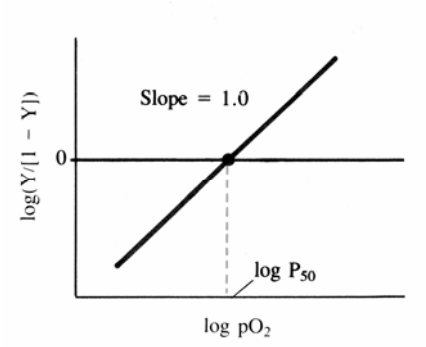
نسبت مایوگلوبین متصل شده به O_2 به مایوگلوبین آزاد ($Y/1-Y$) به وسیله رابطه زیر به فشار جزیی اکسیژن و P_{50} مرتبط می‌شود:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{pO_2}{P_{50}} \qquad (25-2)$$

و با لگاریتم گرفتن از طرفین معادله فوق خواهیم داشت:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \log pO_2 - \log P_{50} \qquad (26-2)$$

بنابراین نمودار $\log(Y/1-Y)$ در مقابل $\log pO_2$ خط راستی با شیب واحد خواهد بود. این رابطه توصیف کننده اتصال O_2 به مایوگلوبین است که به صورت غیرمتعاون صورت می گیرد. معادله (۲-۲۶)، معادله هیل است و شیب آن برابر واحد می‌باشد زیرا تنها یک جایگاه اتصال برای O_2 در مایوگلوبین وجود دارد و اتصال به صورت غیرمتعاون صورت گرفته است. نمودار هیل برای اتصال اکسیژن به مایوگلوبین به صورت شکل (۲-۱۰) است:



شکل (۲-۱۰): نمودار اتصال اکسیژن به مایوگلوبین. شیب خط (ضریب هیل) برابر با ۱ است. طول از مبدا وقتی که اشباع کسری برابر ۰/۵ باشد، معادل $\log P_{50}$ است. P_{50} ثابت تفکیک کمپلکس اکسیژن- هموگلوبین نیز محسوب می‌شود.

۲-۶-۲-۲. اتصال اکسیژن به هموگلوبین:

استویکیومتری اتصال O_2 به مایوگلوبین ۱:۱ است ولی استویکیومتری اتصال O_2 به هموگلوبین ۴:۱ می‌باشد. فرض کنید که هر چهار مولکول O_2 همزمان به هموگلوبین متصل می‌شود. در این صورت اتصال O_2 از مکانیزم دسته‌جمعی[۲۱] و یا همه یا هیچ[۲۲] تبعیت می‌کند:

$$Hb + 4O_2 \leftrightarrow Hb(O_2)_4 \qquad (۲۷-۲)$$

و

$$K_d = \frac{[Hb][O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]} \qquad (۲۸-۲)$$

اشباع کسری هموگلوبین نیز از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$Y = \frac{(pO_2)^4}{(pO_2)^4 + K_d} \qquad (۲۹-۲)$$

از آنجایی که P_{50} به صورت میزان pO_2 وقتی $Y = 0/5$ است تعریف می‌شود، می‌توان نوشت:

$$0/5 = \frac{(P_{50})^4}{K_d + (P_{50})^4}$$

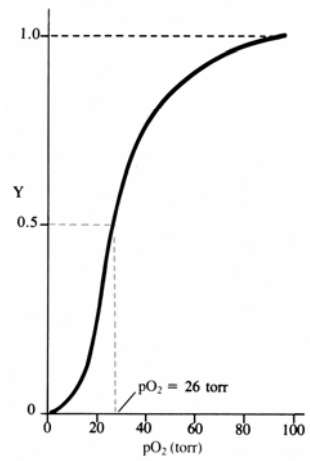
و یا:

$$K_d = (P_{50})^4$$

منحنی اتصال O_2 به هموگلوبین، سیگموییدی است که نشان می‌دهد اتصال اکسیژن به یک گروه هم، اتصال مولکول‌های بعدی اکسیژن را تسهیل می‌نماید. وقتی فشار جزیی اکسیژن کم است، اشباع کسری هموگلوبین آرام‌تر از pO_2 افزایش می‌یابد. در فشارهای جزیی پایین اکسیژن، هموگلوبین در برابر اتصال O_2 مقاومت می‌کند ولی پس از افزایش فشار اکسیژن به بیش از یک میزان آستانه[۲۳]، اشباع کسری شدیدا افزایش می‌یابد که خصیصه اتصال متعاون مثبت است. بیشترین شیب منحنی

[۲۱] Concerted
[۲۲] All-or-None
[۲۳] Threshold Value

وقتی است که اشباع کسری برابر با ۰/۵ باشد. نمودار اتصال اکسیژن به هموگلوبین را در شکل (۲-۱۱) مشاهده می‌نمایید:

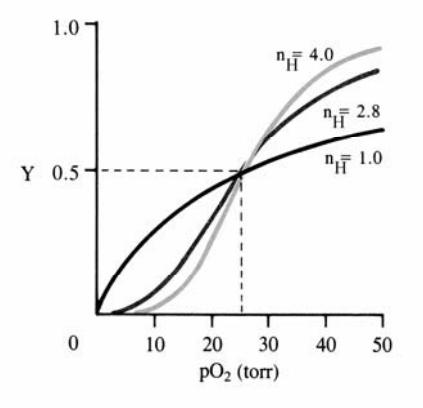


شکل (۲-۱۱): نمودار اتصال اکسیژن به هموگلوبین. نمودار اشباع کسری هموگلوبین در مقابل فشار جزیی اکسیژن سیگموییدی است. شکل نمودار نشان می‌دهد اتصال زیرواحدهای هموگلوبین به اکسیژن متعاون است. وقتی فشار جزیی اکسیژن ۲۶ torr باشد، اشباع کسری هموگلوبین معادل ۰/۵ می‌باشد.

منحنی تجربی اتصال O_2 به هموگلوبین تایید کننده نظریه همه یا هیچ نیست. در سال ۱۹۱۳ خیلی پیش از بدست آمدن اطلاعات ساختمانی در مورد هموگلوبین، هیل نشان داد که منحنی اتصال O_2 به هموگلوبین را می‌توان با استفاده از معادله زیر بدست آورد:

$$\frac{Y}{1-Y} = \left(\frac{pO_2}{P_{50}}\right)^{n_H} \qquad (۳۰-۲)$$

نمودار اتصال O_2 به هموگلوبین (Y در مقابل pO_2) در شکل (۲-۱۲) نشان داده شده است:



شکل (۲-۱۲): نمودارهای اتصالی تئوریک و واقعی هموگلوبین. منحنی مربوط به n_H = ۲/۸ نشان‌دهنده نمودار واقعی اتصال اکسیژن به هموگلوبین است. منحنی فرضی (n_H = ۴/۰) مربوط به حالتی است که تعاونی کامل وجود داشته باشد. اگر اتصال اکسیژن کاملا غیرمتعاون باشد (n_H = ۱/۰)، منحنی اتصالی به صورت هذلولی خواهد بود.

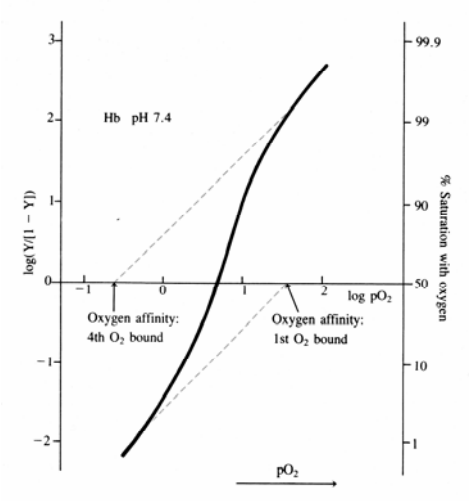
اگر از معادله فوق لگاریتم بگیریم، خواهیم داشت:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n_H \log pO_2 - n_H \log P_{50} \qquad (31-2)$$

پس شیب منحنی هیل برای اتصال اکسیژن به هموگلوبین ۲/۸ است که بزرگتر از واحد می‌باشد. بزرگتر از واحد بودن ضریب هیل نشان می‌دهد که اتصال متعاون است. اگر تمامی جایگاه‌های اتصال معادل و غیروابسته به یکدیگر باشند، $n_H = 1$ خواهد بود. اگر تعاونی کامل باشد، اتصال اکسیژن باید از نظریه همه یا هیچ تبعیت کند و $n_H = 4$ باشد. مقدار $n_H = 2/8$ نشان می‌دهدکه رفتار هموگلوبین سازشی بین دو حد غیرمیان‌کنش‌کننده و شدیدا متعاون است.

نمودار هیل اتصال O_2 به هموگلوبین کاملا خطی نیست زیرا اتصال متعاون می‌باشد. ضریب هیل (n_H) معادل شیب نمودار است وقتی که $pO_2 = P_{50}$ باشد. همان طور که در شکل (۲-۱۳) مشاهده می‌شود، تانژانت بخش پایینی نمودار هیل ثابت تفکیک اولین اکسیژن متصل‌شده (K_1 = ۷/۵ M) و

تانژانت بخش بالایی نمودار هیل ثابت تفکیک آخرین اکسیژن متصل شده را حاصل خواهد داد ($K_۴ = ۰/۵$ M). بنابراین، تمایل هموگلوبین برای چهارمین مولکول اکسیژن سیصد مرتبه بیشتر از تمایل هموگلوبین برای اولین اکسیژن است.



شکل (۲-۱۳): نمودار هیل اتصال اکسیژن به هموگلوبین در pH = ۷/۴ . نمودار هیل هموگلوبین افراد طبیعی سیگموییدی است. طول از مبدا خطوط تانژانت، مربوط به ثابت‌های تفکیک اولین و چهارمین مولکول اکسیژن متصل‌شده به هموگلوبین است.

۲-۶-۲-۳. اهمیت عمل متعاون هموگلوبین:

اثر متعاون هموگلوبین اساسا باعث می‌شودکه این مولکول به عنوان یک ناقل بسیار خوب برای $O_۲$ عمل کند. فشار جزیی $O_۲$ در ریه حدود ۱۰۰ mm Hg است در حالی که در مویرگ‌های عضلات به حدود ۲۰ mm Hg می‌رسد. به‌علاوه، فشار جزیی برای ۵۰٪ اشباع شدن هموگلوبین نیز حدود ۳۰ mm Hg است. بر اساس معادله هیل، اتصال متعاون اکسیژن به هموگلوبین را می‌توان به صورت زیر نشان داد:

$$\frac{Y}{۱-Y}=(\frac{pO_۲}{P_{۵۰}})^{n_H}$$

در ریه، اشباع کسری برابر است با: $\frac{Y_{lung}}{۱-Y_{lung}}=(\frac{۱۰۰}{۳۰})^{۲/۸} \Rightarrow Y_{lung}=۰/۹۷$

و در عضله: $\frac{Y_{muscle}}{۱-Y_{muscle}}=(\frac{۲۰}{۳۰})^{۲/۸} \Rightarrow Y_{muscle}=۰/۲۴$

مقدار اکسیژن تحویل شده به عضله توسط هموگلوبین متناسب با ΔY می‌باشد:

$$\Delta Y=Y_{lung}-Y_{muscle}=۰/۷۳$$

اگر اتصال $O_۲$ به هموگلوبین متعاون نباشد، اشباع کسری هموگلوبین با اکسیژن را می‌توان از رابطه زیر بدست آورد:

$$Y=\frac{pO_۲}{pO_۲+P_{۵۰}}$$

در ریه، اشباع کسری برابر است با: $Y_{lung}=\frac{۱۰۰}{۱۰۰+۳۰}=۰/۷۷$

و در عضله: $Y_{muscle}=\frac{۲۰}{۲۰+۳۰}=۰/۴$

مقدار اکسیژن تحویل شده به عضله متناسب با ΔY است:

$$\Delta Y=Y_{lung}-Y_{muscle}=۰/۷۷-۰/۴=۰/۳۷$$

می توان مشاهده نمود که $\Delta Y_{cooperative}/\Delta Y_{uncooperative} \approx ۲$ می باشد. یعنی وقتی که اتصال $O_۲$ به هموگلوبین متعاون است، تقریبا دو برابر اکسیژن توسط بافت‌ها دریافت می‌شود.