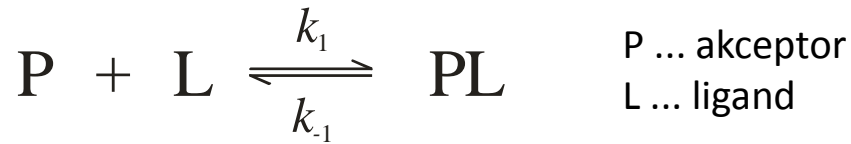


Teorija vezave ligandov

Eno vezavno mesto za ligand



$$v_{as} = k_1[P][L] \quad \text{hitrost asociacije}$$

$$v_{dis} = k_{-1}[PL] \quad \text{hitrost disociacije}$$

V ravnotežju:

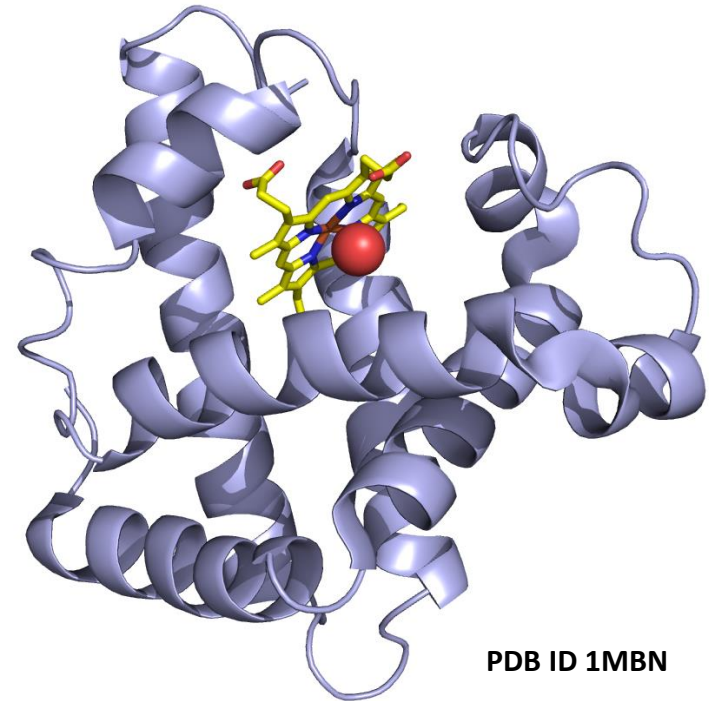
$$v_{as} = v_{dis}$$

$$k_1[P][L] = k_{-1}[PL]$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = K_a \quad \text{ravnotežna konstanta asociacije (enota M}^{-1}\text{)*}$$

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P][L]}{[PL]} = K_d \quad \text{ravnotežna konstanta disociacije (enota M)*}$$

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$



*v resnici so termodinamske konstante brez enot.

Eno vezavno mesto za ligand

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad \text{Vrednosti } [PL], [P] \text{ in } [L] \text{ ne poznamo, lahko pa jih izrazimo s } [P]_t \text{ in } [L]_t$$

$$[P]_t = [P] + [PL]$$

$$[L]_t = [L] + [PL]$$

$[P]$ izrazimo s $[P]_t$ in $[PL]$:

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

$$K_a[P]_t[L] - K_a[PL][L] = [PL]$$

$$[PL](1 + K_a[L]) = K_a[P]_t[L]$$

$$[PL] = \frac{K_a[P]_t[L]}{1 + K_a[L]} = \frac{[P]_t[L]}{1/K_a + [L]} = \frac{[P]_t[L]}{K_d + [L]}$$

Če je $[L]_t \gg [P]_t$, potem lahko predpostavimo, da je $[L] \approx [L]_t$

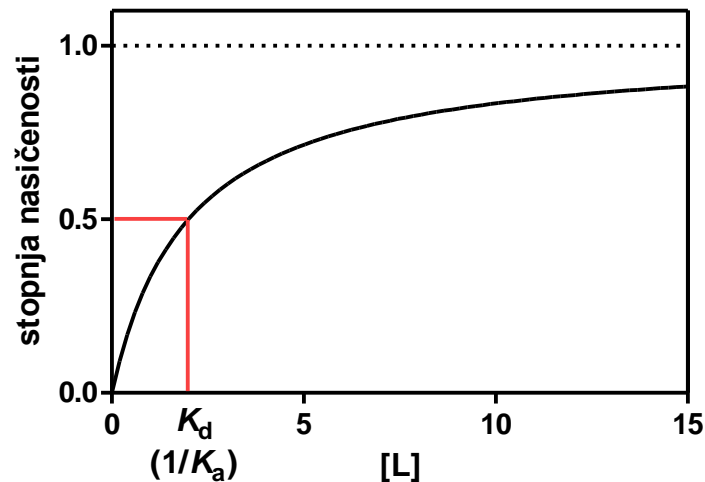
Eno vezavno mesto za ligand

$$[PL] = \frac{K_a [P]_t [L]}{1 + K_a [L]} = \frac{[P]_t [L]}{K_d + [L]}$$

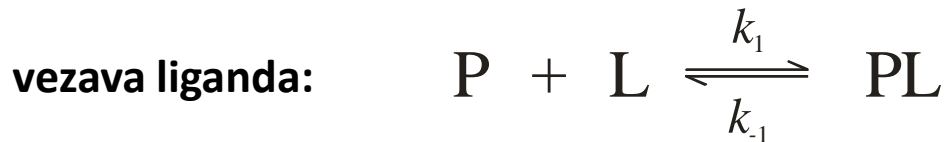
Če $[PL]$ ne moremo meriti direktno, definiramo stopnjo nasičenosti $Y = \frac{[PL]}{[P]_t}$

S preoblikovanjem zgornje enačbe dobimo:

$$Y = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$



Teorija vezave ligandov in encimska kinetika

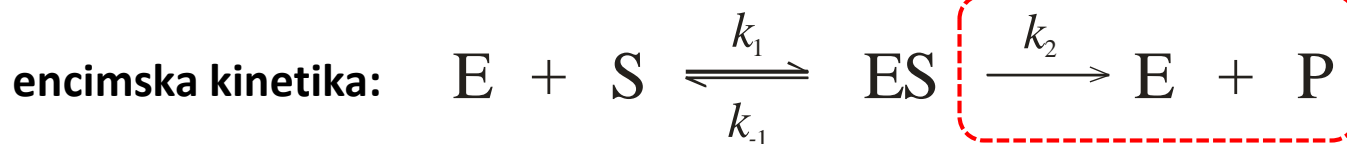


k_1 ... konstanta hitrosti asociacije
 k_{-1} ... konstanta hitrosti disociacije

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

K_d ... ravnotežna
konstanta disociacije

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



k_1 ... konstanta hitrosti asociacije
 k_{-1} ... konstanta hitrosti disociacije
 k_2 ... katalitična konstanta

$$K_S = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

K_S ... ravnotežna
konstanta disociacije

$$v = \frac{k_2[E]_t[S]}{K_S + [S]}$$

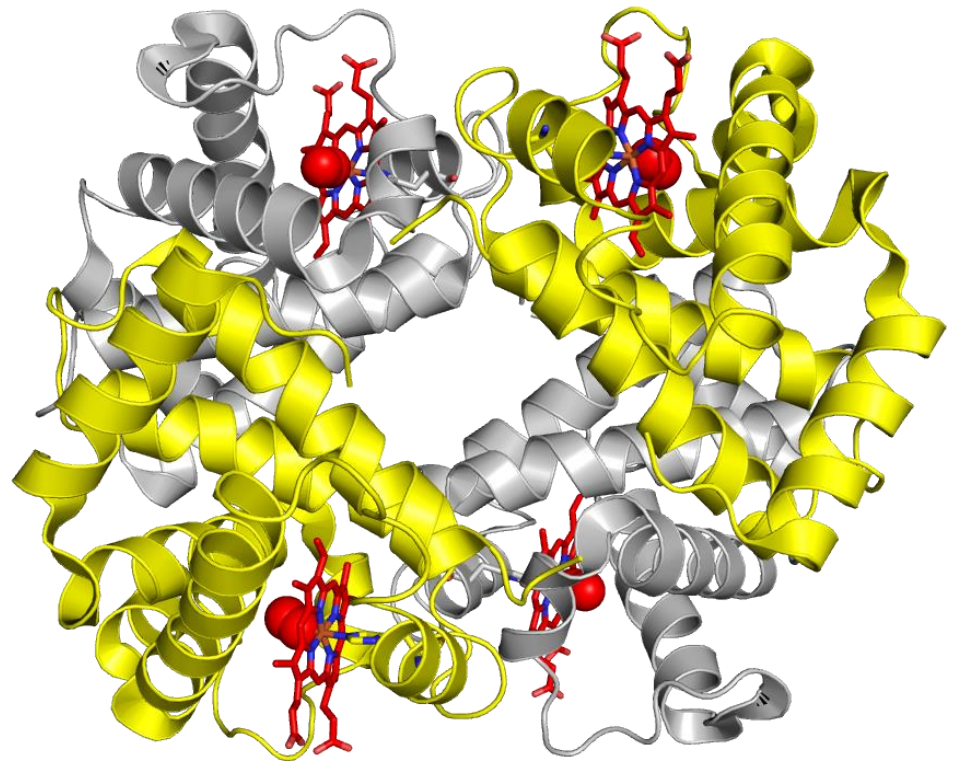
enačba hitrosti
encimsko katalizirane
reakcije

(pod predpostavko hitrega ravnotežja)

Več vezavnih mest za ligande

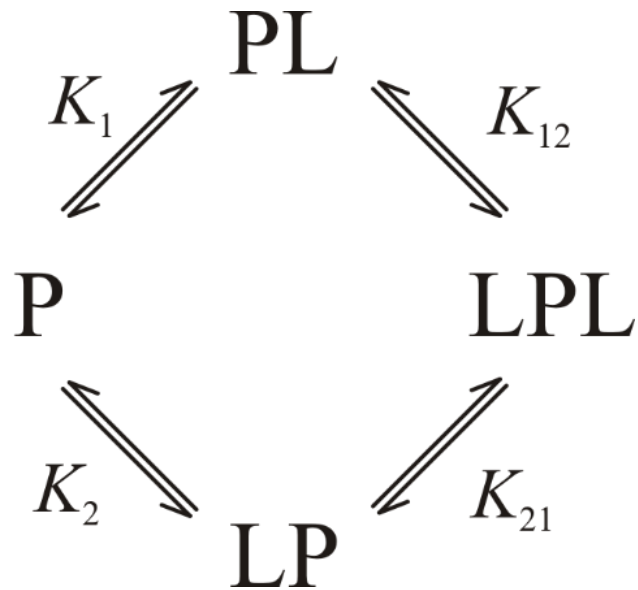
Upoštevati je treba več parametrov:

- stehiometrija (število vezavnih mest)
- Vrste ligandov (isti ligand/različni ligandi)
- vrste vezavnih mest (identična, različna)
- alosterija/kooperativnost vezave
- ...

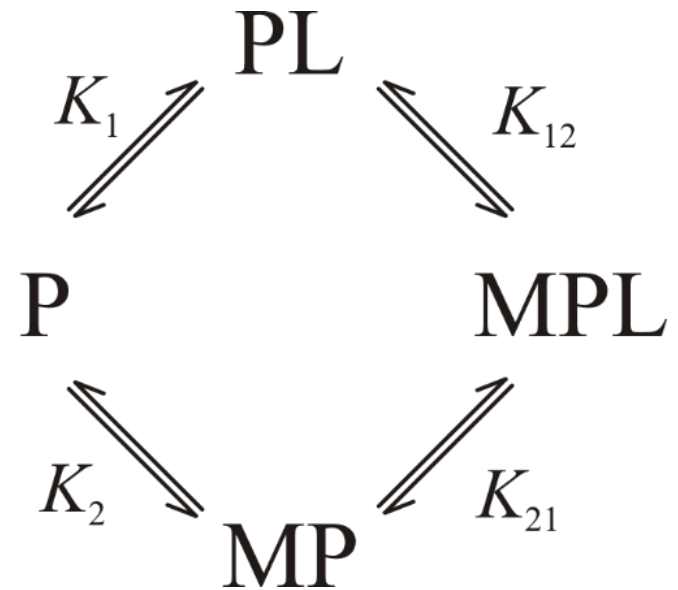


Receptor z dvema vezavnima mestoma

Dve vezavni mesti za isti ligand



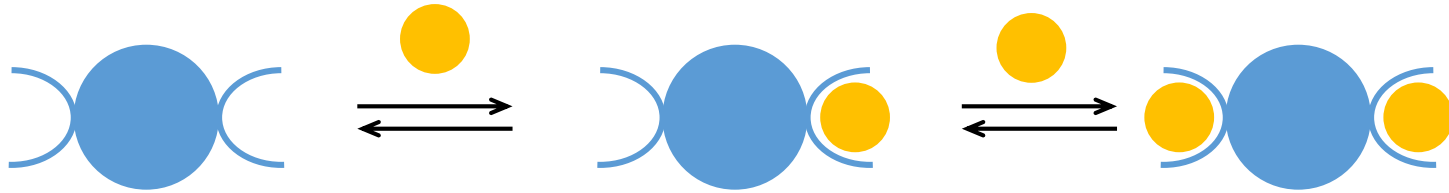
Dve vezavni mesti za različna liganda



Za ta dva sistema obstaja šest možnih načinov interakcije.

Receptor z dvema vezavnima mestoma

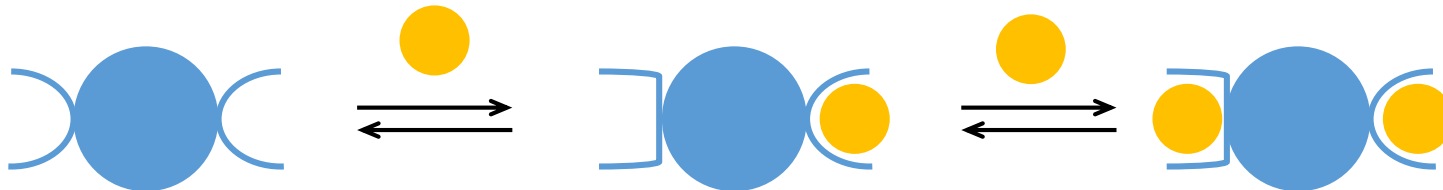
1. Dve identični, neodvisni vezavni mesti za en ligand



$$K_1 = K_2 = K_{12} = K_{21}$$

ena mikroskopska konstanta vezave

2. Dve identični, medsebojno odvisni vezavni mesti za en ligand (kooperativna vezava)

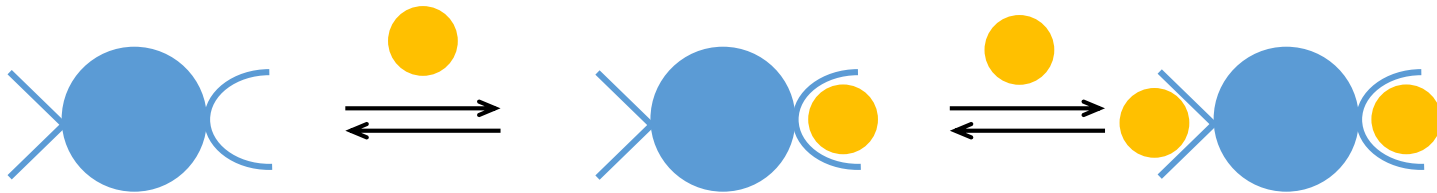


$$K_1 = K_2 \neq K_{12} = K_{21}$$

dve mikroskopski konstanti vezave

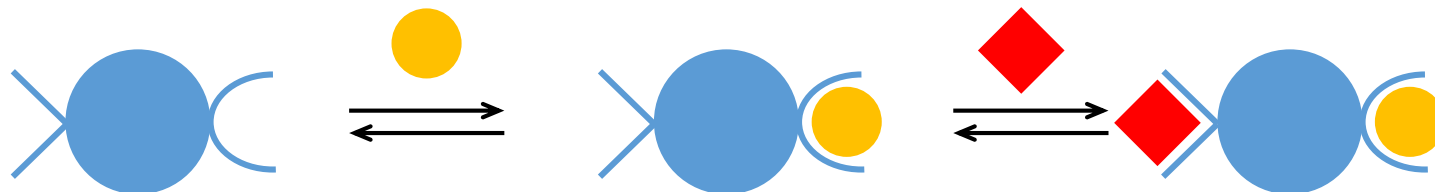
Receptor z dvema vezavnima mestoma

3. Dve različni neodvisni vezavni mesti za en ligand



$K_1 \neq K_2, K_1 = K_{21}, K_2 = K_{12}$ Dve mikroskopski konstanti vezave

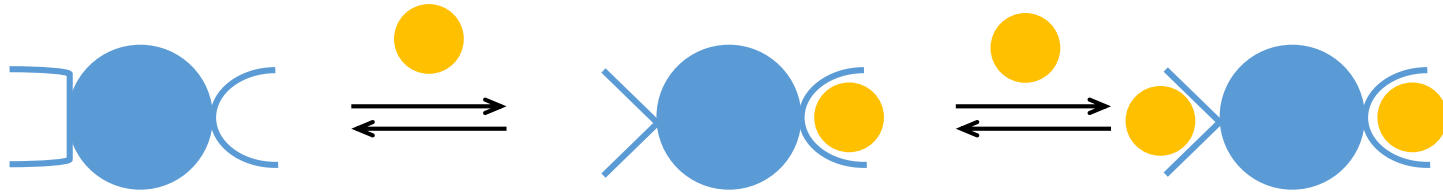
4. Dve različni neodvisni vezavni mesti za dva liganda



$K_1 \neq K_2, K_1 = K_{21}, K_2 = K_{12}$ dve mikroskopski konstanti vezave

Receptor z dvema vezavnima mestoma

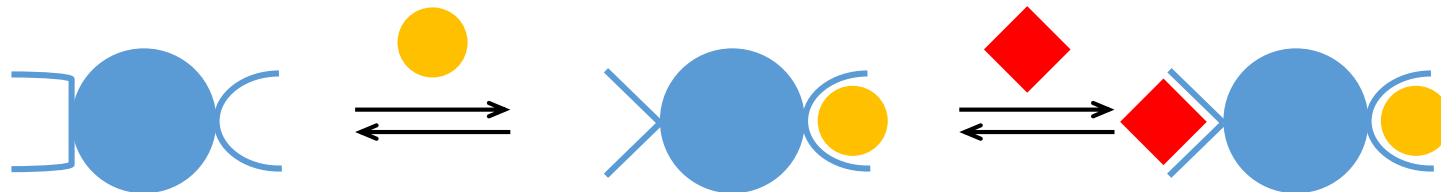
5. Dve različni medsebojno odvisni vezavni mesti, homotropičen alosteričen efekt



$$K_1 \neq K_2 \neq K_{12} \neq K_{21}$$

dve mikroskopski konstanti vezave

6. Dve različni medsebojno odvisni vezavni mesti, heterotropičen alosteričen efekt



$$K_1 \neq K_2 \neq K_{12} \neq K_{21}$$

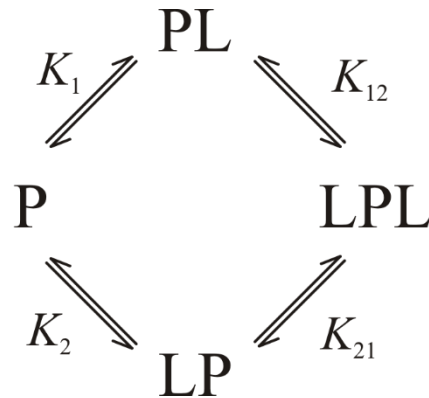
dve mikroskopski konstanti vezave

Dve vezavni mesti za ligand



tri stehiometrične oblike P, PL in PL_2

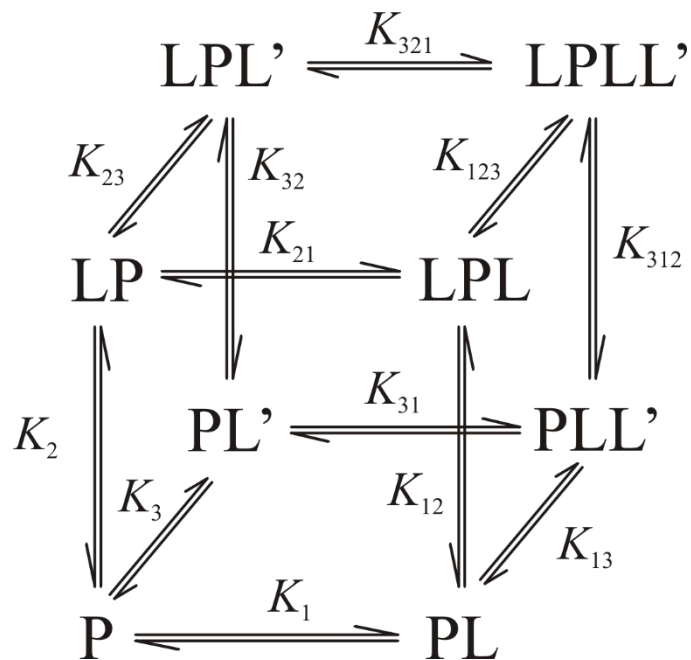
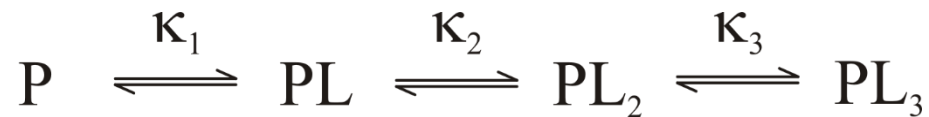
κ_1, κ_2 ... stehiometrični (makroskopski, ekstrinzični) konstanti vezave



na molekularnem nivoju štiri oblike: P, PL, LP, LPL

K_1, K_2, K_3, K_4 ... mikroskopske (intrinzične) konstante vezave

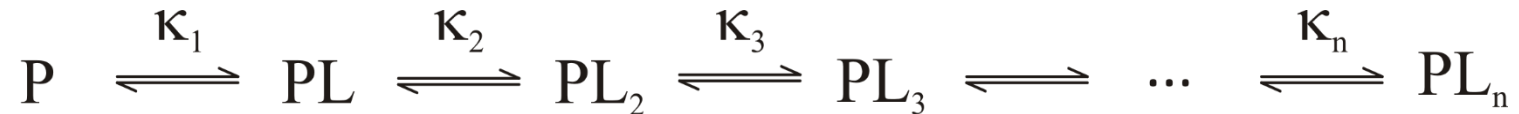
Tri vezavna mesta za ligand



3 stehiometrične, 12 mikroskopskih konstant

Več vezavnih mest za ligand – Adairova enačba

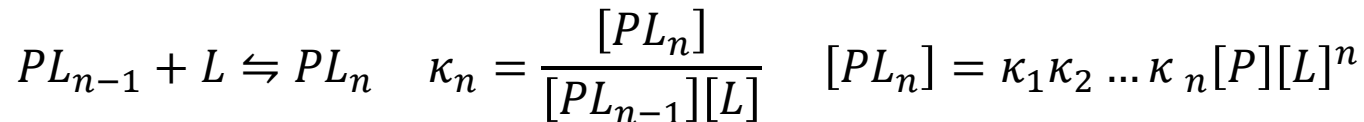
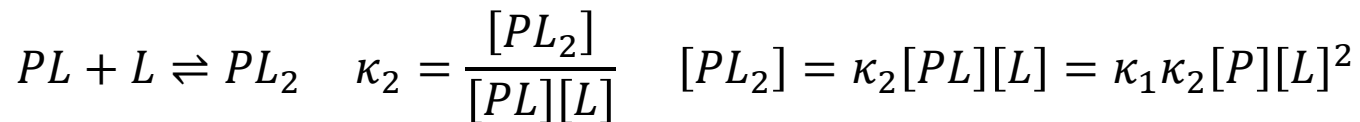
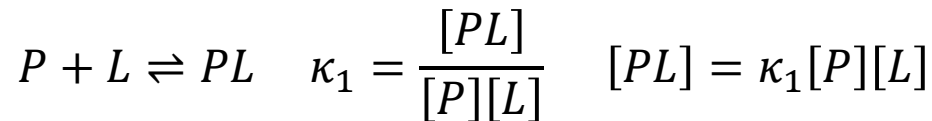
Omogoča opis kateregakoli akceptorja z n vezavnimi mesti za ligand v ravnotežju z uporabo makroskopskih konstant. Razvita je bila za opis vezave kisika na hemoglobin.



Stopnjo nasičenja opišemo z enačbo:

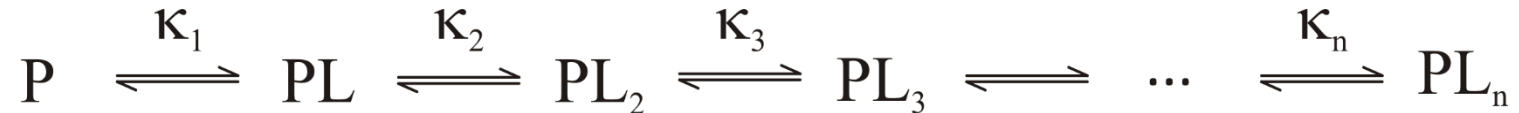
$$Y = \frac{[L]_{vezan}}{[P]_t} = \frac{[PL] + 2[PL_2] + 3[PL_3] + \dots + n[PL_n]}{[P] + [PL] + [PL_2] + [PL_3] + \dots + [PL_n]}$$

Za vsako stopnjo v ravnotežju izrazimo člen PL_i s P , L in κ_i :



Več vezavnih mest za ligand – Adairova enačba

Omogoča opis kateregakoli akceptorja z n vezavnimi mesti za ligand v ravnotežju z uporabo makroskopskih konstant. Razvita je bila za opis vezave kisika na hemoglobin.



Izražene člene vstavimo v enačbo:

$$Y = \frac{\kappa_1[L] + 2\kappa_1\kappa_2[L]^2 + 3\kappa_1\kappa_2\kappa_3[L]^3 + \dots + n\kappa_1\kappa_2\kappa_3 \dots \kappa_n[L]^n}{1 + \kappa_1[L] + \kappa_1\kappa_2[L]^2 + \kappa_1\kappa_2\kappa_3[L]^3 + \dots + \kappa_1\kappa_2\kappa_3 \dots \kappa_n[L]^n}$$

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^n i[L]^i (\prod_{j=1}^i \kappa_j)}{1 + \sum_{i=1}^n [L]^i (\prod_{j=1}^i \kappa_j)}$$

Pogosto lahko eksperimentalno določamo le relativno stopnjo nasičenosti $Y_{rel} = \frac{Y}{n}$:

$$Y_{rel} = \frac{\sum_{i=1}^n i[L]^i (\prod_{j=1}^i \kappa_j)}{n \{1 + \sum_{i=1}^n [L]^i (\prod_{j=1}^i \kappa_j)\}}$$

Več neodvisnih vezavnih mest

Če so vezavna mesta neodvisna, lahko vezavo liganda na vsako vezavno mesto opišemo:

$$Y = \frac{K_i[L]}{1 + K_i[L]}$$

Za n vezavnih mest je celokupna Y enaka vsoti Y za vsako vezavno mesto:

$$Y = \sum_{i=1}^n \frac{K_i[L]}{1 + K_i[L]}$$

Če so vezavna mesta identična, dobimo enostavno zvezo:

$$Y = \frac{nK[L]}{1 + K[L]}$$

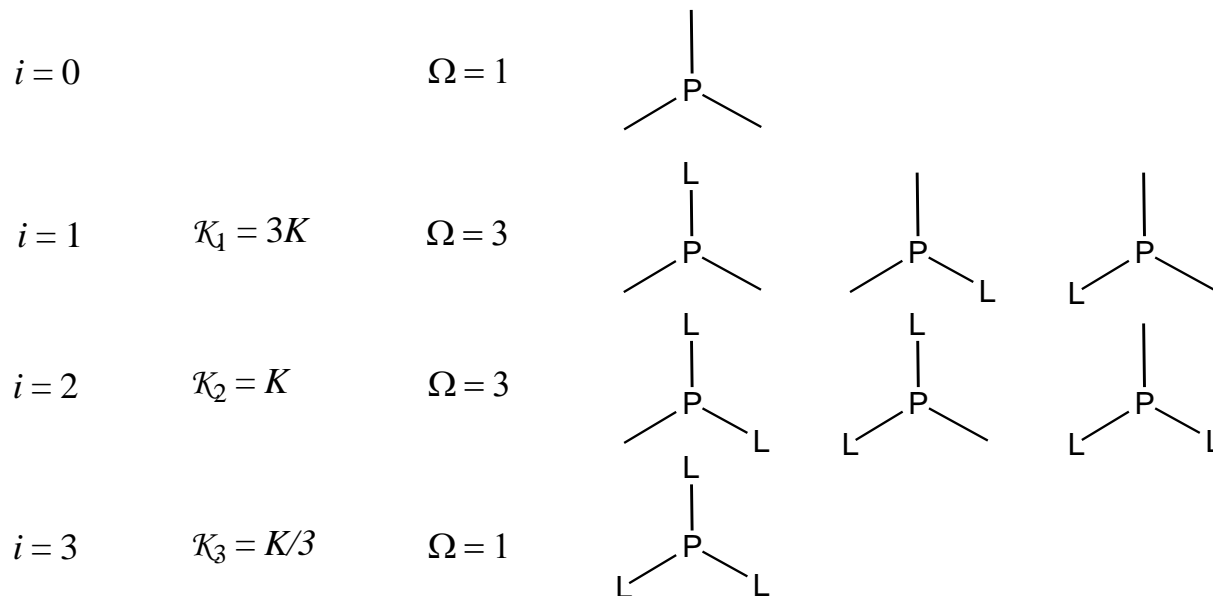
Več neodvisnih vezavnih mest

Zveza med makroskopskimi in mikroskopskimi konstantami:

Splošno:
$$\kappa_i = \frac{(n-i+1)}{i} K$$

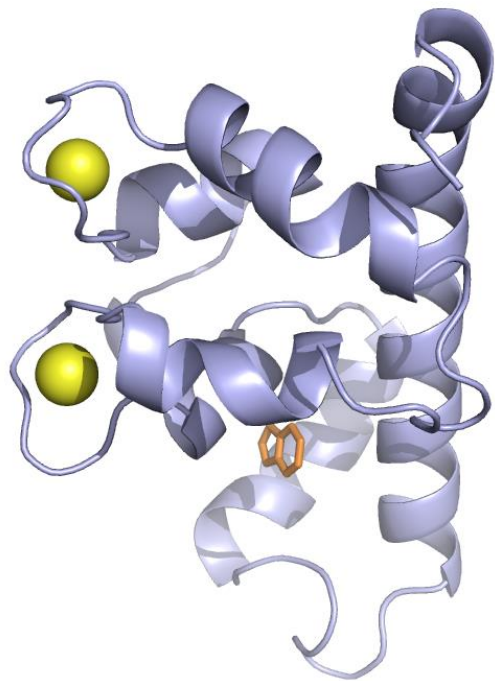
Število možnih mikroskopskih kompleksov receptorja z n vezavnimi mesti in i ligandi:

$$\Omega = \frac{n!}{(n-i)! i!}$$



Več neodvisnih vezavnih mest

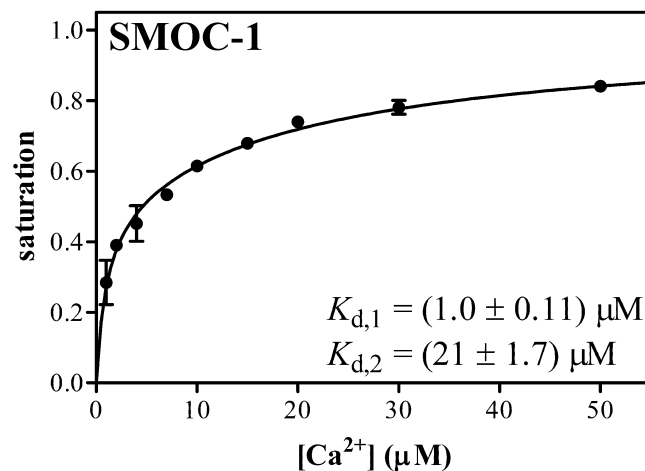
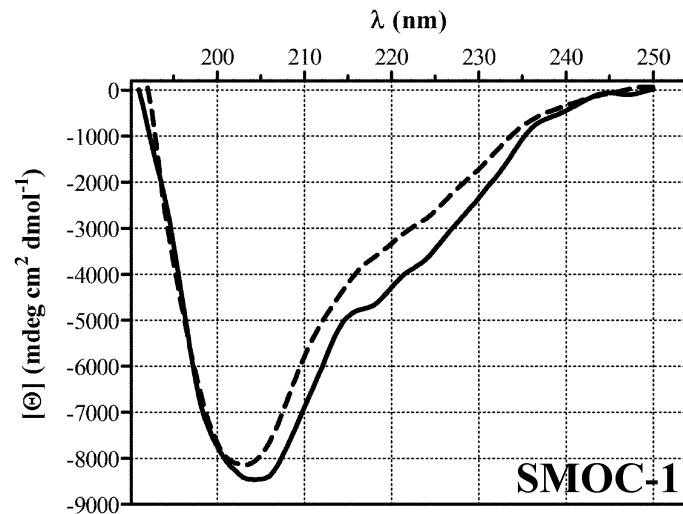
Primer: vezava Ca^{2+} ionov na EC domeno proteina SMOC-1



Dva motiva EF dlani, ki vežeta po en Ca^{2+} ion

$$Y = \frac{\frac{1}{2}[\text{Ca}^{2+}]}{K_{d,1} + [\text{Ca}^{2+}]} + \frac{\frac{1}{2}[\text{Ca}^{2+}]}{K_{d,2} + [\text{Ca}^{2+}]}$$

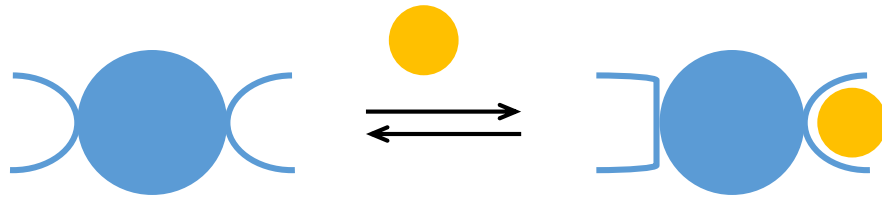
Vezavo kalcija enostavno zasledujemo s CD spektroskopijo ali intrinzično Trp fluorescenco.



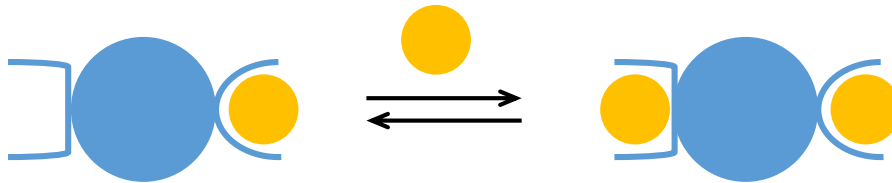
Kooperativnost med dvema identičnima vezavnima mestoma

Prva molekula liganda se z enako verjetnostjo veže na enega od obeh prostih vezavnih mest.

Konstanta vezave za prvi ligand je enaka $K = K_1 = K_2$



Konstanta vezave druge molekule liganda je enaka $K_1 = K_2 = aK$



Če je $a > 1$ pozitivna kooperativnost (druga molekula se veže močnejše kot prva)
 $a < 1$ negativna kooperativnost (druga molekula se veže šibkeje)
 $a = 1$ neodvisni vezavni mesti

Kooperativnost med dvema identičnima vezavnima mestoma

Prva molekula liganda se z enako verjetnostjo veže na enega od obeh prostih vezavnih mest.

Konstanta vezave za prvi ligand je enaka $K = K_1 = K_2$

Konstanta vezave druge molekule liganda je enaka $K_1 = K_2 = aK$

Če je $a > 1$ pozitivna kooperativnost (druga molekula se veže močnejše kot prva)
 $a < 1$ negativna kooperativnost (druga molekula se veže šibkeje)
 $a = 1$ neodvisni vezavni mesti

Adairova enačba za ta sistem je enaka

$$Y = \frac{\kappa_1[L] + 2\kappa_1\kappa_2[L]^2}{1 + \kappa_1[L] + \kappa_1\kappa_2[L]^2}$$

Uporabimo zvezi $\kappa_1 = 2K$ in $\kappa_2 = \frac{1}{2}aK$ in dobimo enačbo:

$$Y = \frac{2K[L] + 2aK^2[L]^2}{1 + 2K[L] + aK^2[L]^2}$$

Kooperativnost med dvema identičnima vezavnima mestoma

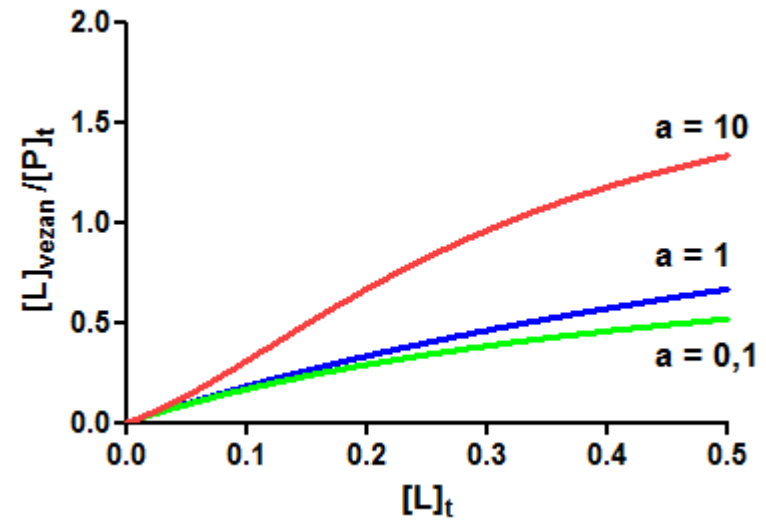
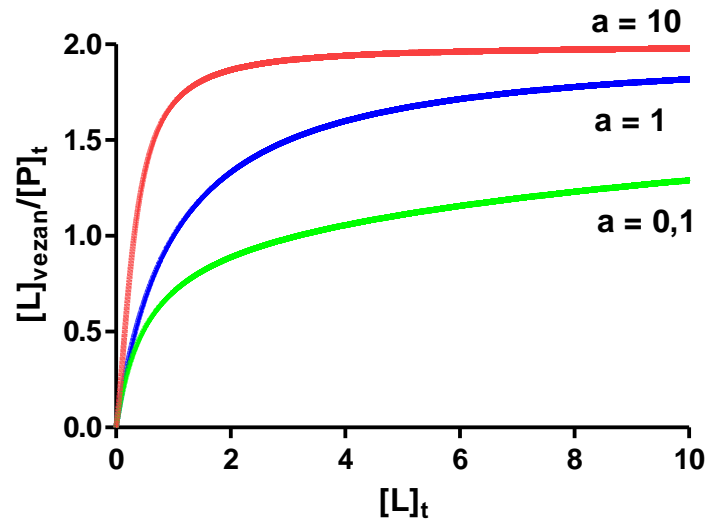
Grafična oblika funkcije je odvisna od vrednosti a .

$$Y = \frac{2K[L] + 2aK^2[L]^2}{1 + 2K[L] + aK^2[L]^2}$$

$a = 1$... hiperbola

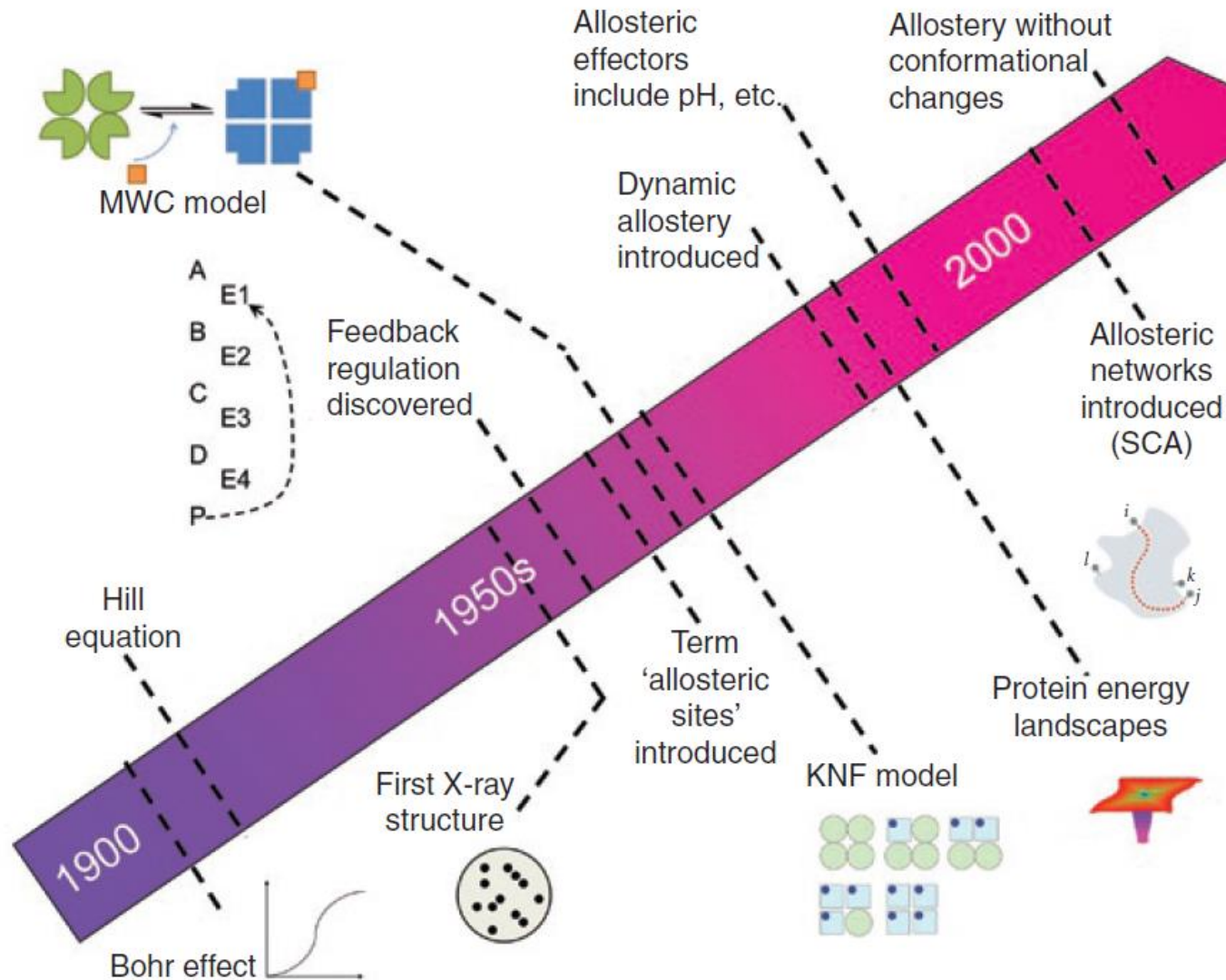
$a > 1$... sigmoida

$a < 1$... hiperbola



Kooperativnost in alosterija

Predpostavimo, da se vsaka podenota lahko nahaja v dveh konformacijskih oblikah:



Alosterija v oligomernih sistemih

Predpostavimo, da se vsaka podenota lahko nahaja v dveh konformacijskih oblikah:



T (tense) oblika – nižja afiniteta do substrata



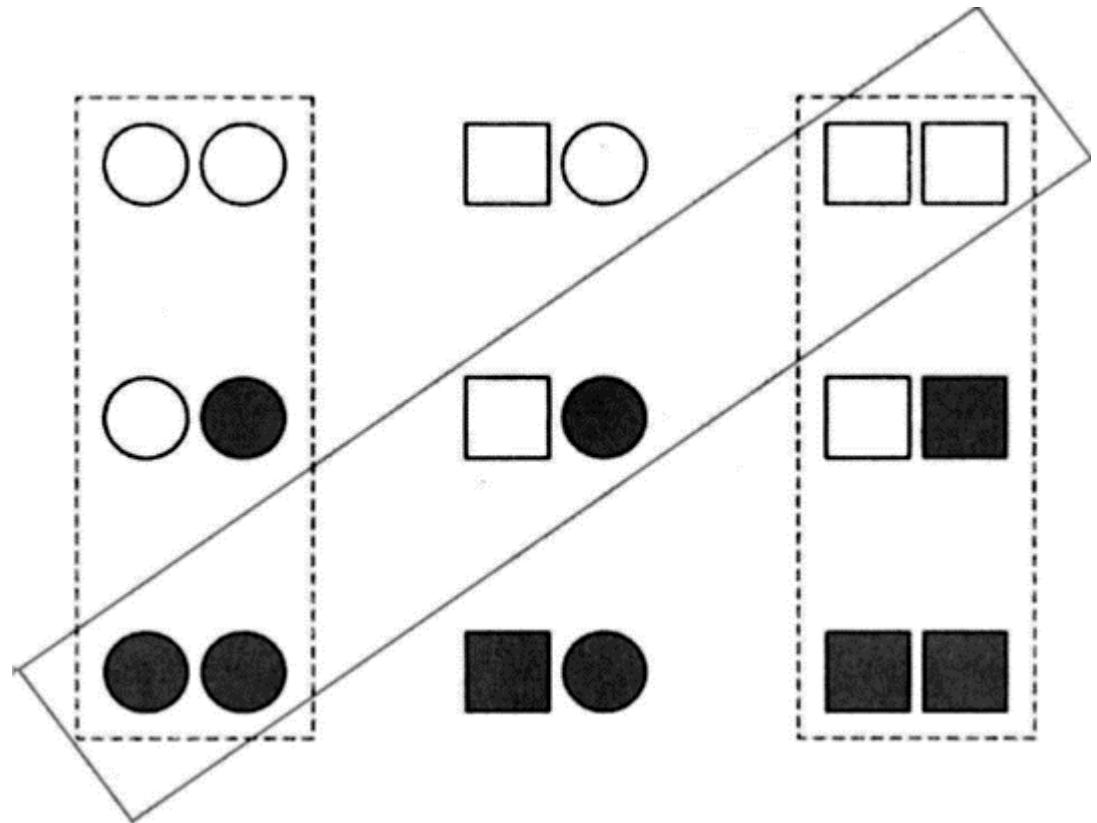
R (relaxed) oblika – višja afiniteta do substrata

KNF model

spremembe v terciarni strukturi vsake podenote ob vezavi liganda

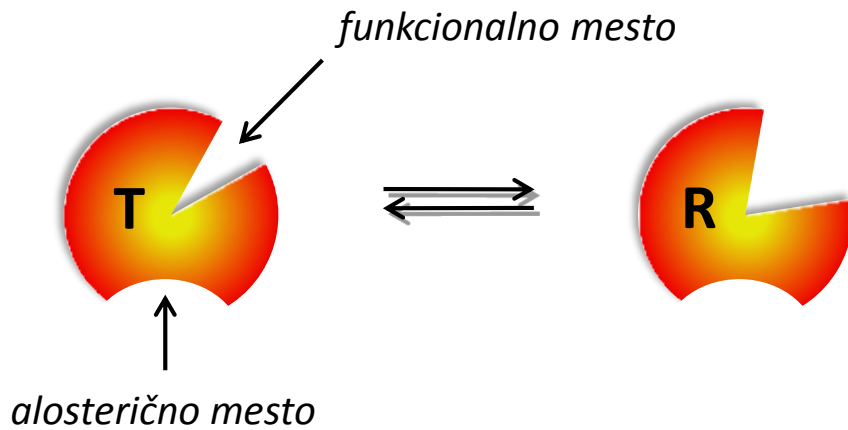
MWC model

spremembe kvartarne strukture – vse podenote so vedno v isti obliki

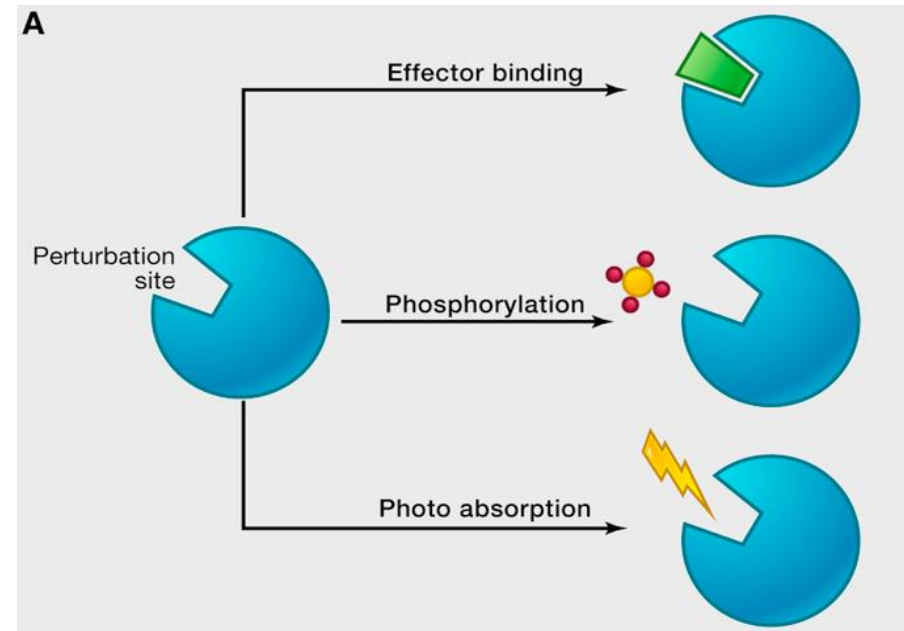


Alosterija v monomernih sistemih

Imamo dve vezavni mesti – eno je **funkcionalno** (veže ligand, v encimih je to aktivno mesto) drugo je **alosterično** (regulatorno). Minimalen sistem predpostavlja ravnotežje med dvema oblikama proteina – T in R, ki se razlikujeta v afiniteti do liganda. Vezava alosteričnih regulatorjev spremeni položaj ravnotežja.



negativna alosterična regulacija



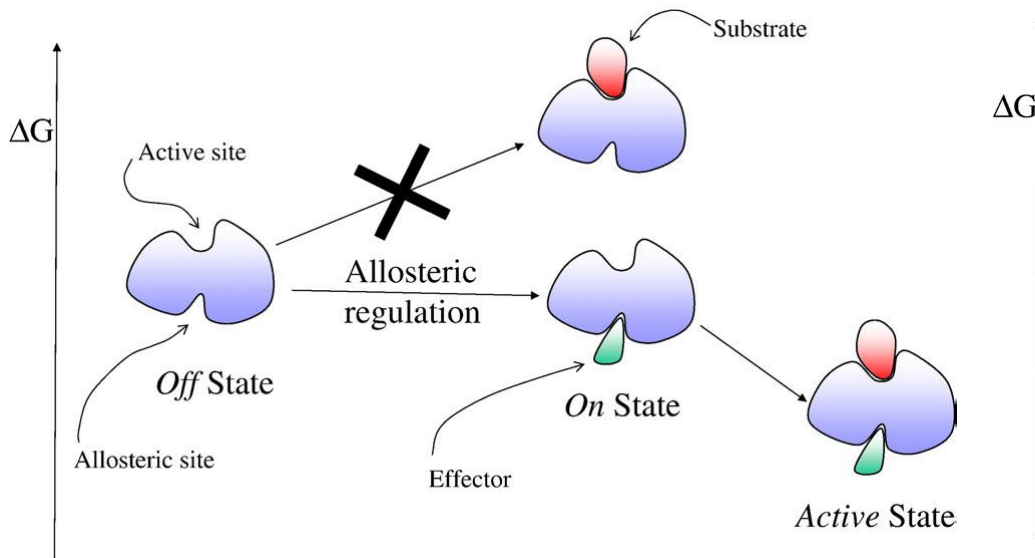
pozitivna alosterična regulacija



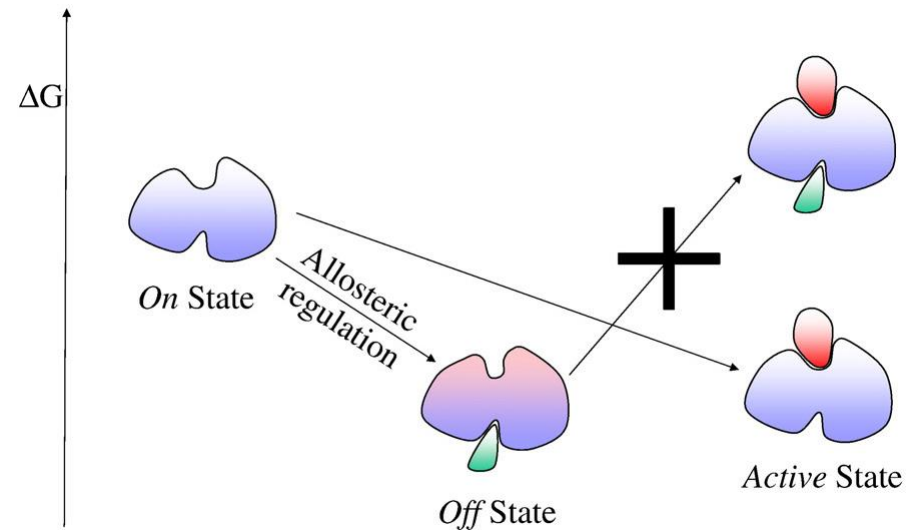
Termodinamski vidik alosterije

Alosterija je povezana z energetskimi spremembami v proteinu. Vezava alosteričnega regulatorja vpliva tako na entalpijo kot na entropijo sistema.

pozitiven alosteričen efekt (aktivacija)



negativen alosteričen efekt (inhibicija)



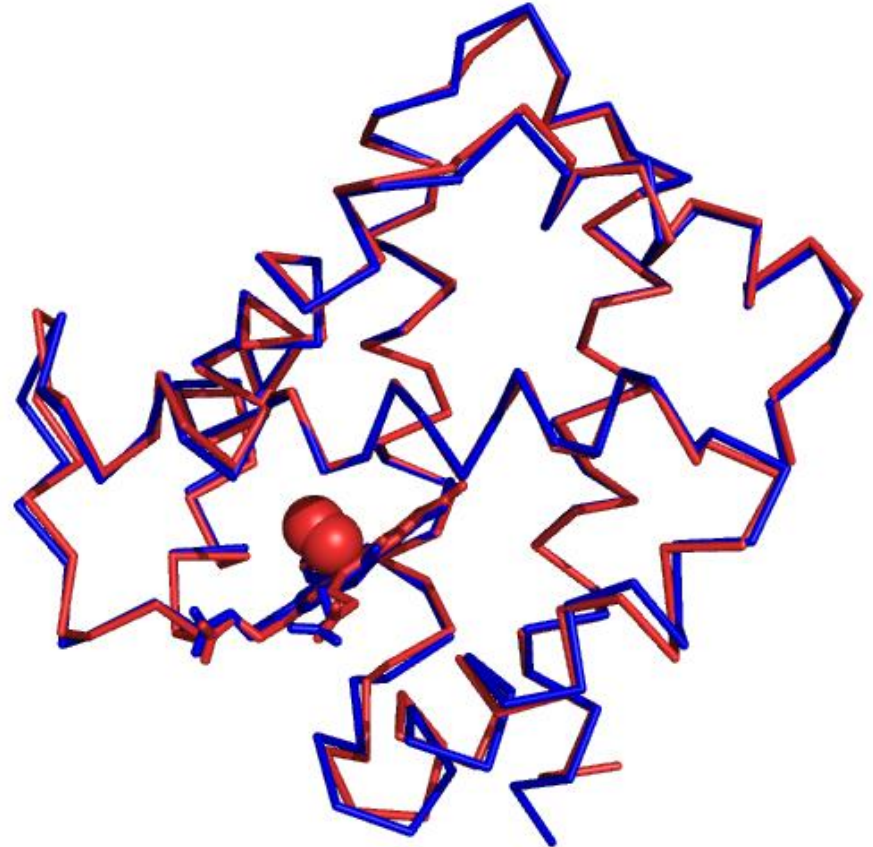
Strukturni vidik alosterije

Glede na obsežnost konformacijskih sprememb terciarne strukture, ki spremljajo alosterične efekte, ločimo štiri razrede konformacijskih sprememb.

1. razred – brez konformacijskih sprememb

Oblika regulacije, kjer se alosterična komunikacija po proteinu prenese brez konformacijskih sprememb glavne verige proteina (spremeni se konformacija največ 1% oz. 3 ostankov), preko spremenjene dinamike proteina ali preko manjših preureditev stranskih verig proteina.

Primer: vezava kisika na hemoglobin



moder – deoksihemoglobin (PDB 2HHB)
rdeč – oksihemoglobin (PDB 1HHO)

Strukturni vidik alosterije

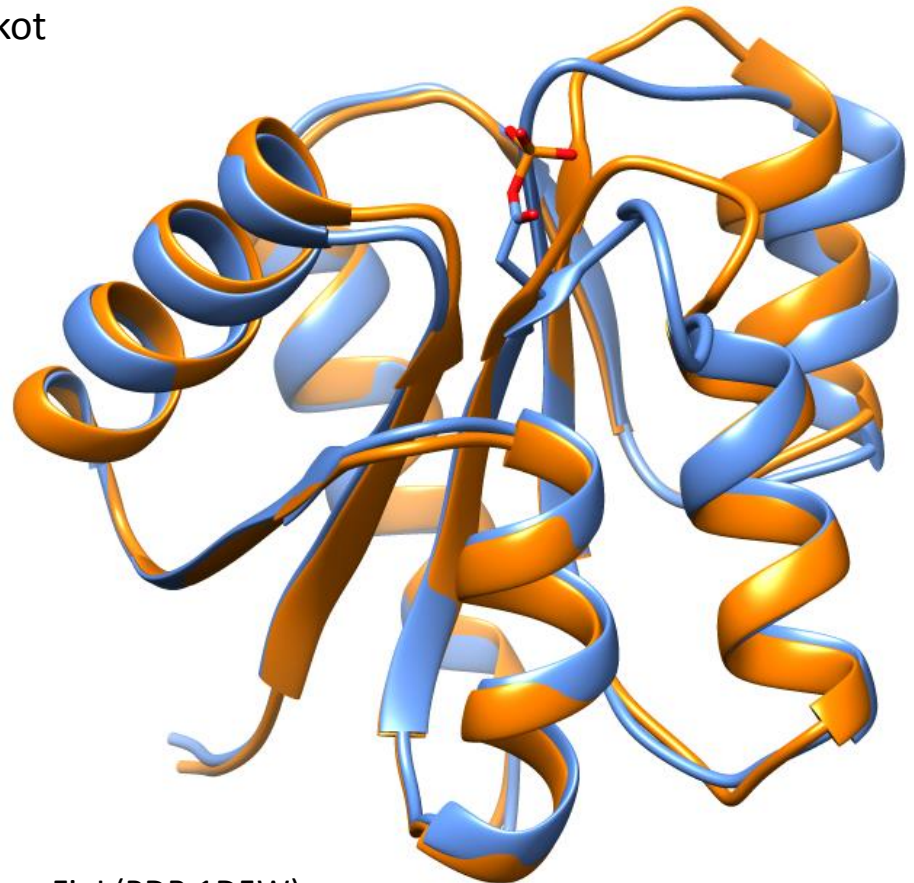
Glede na obsežnost konformacijskih sprememb terciarne strukture, ki spremljajo alosterične efekte, ločimo štiri razrede konformacijskih sprememb.

2. razred – drobne konformacijske spremembe

Spremeni se konformacija manj kot 10% (ali manj kot 10) ostankov.

Primer: FixJ iz bakterij rodu *Sinorhizobium*

transkripcijski faktor, reguliran s fosforilacijo



moder – fosforiliran FixJ (PDB 1D5W)

oranžen – nefosforiliran FixJ (PDB 1DPW)

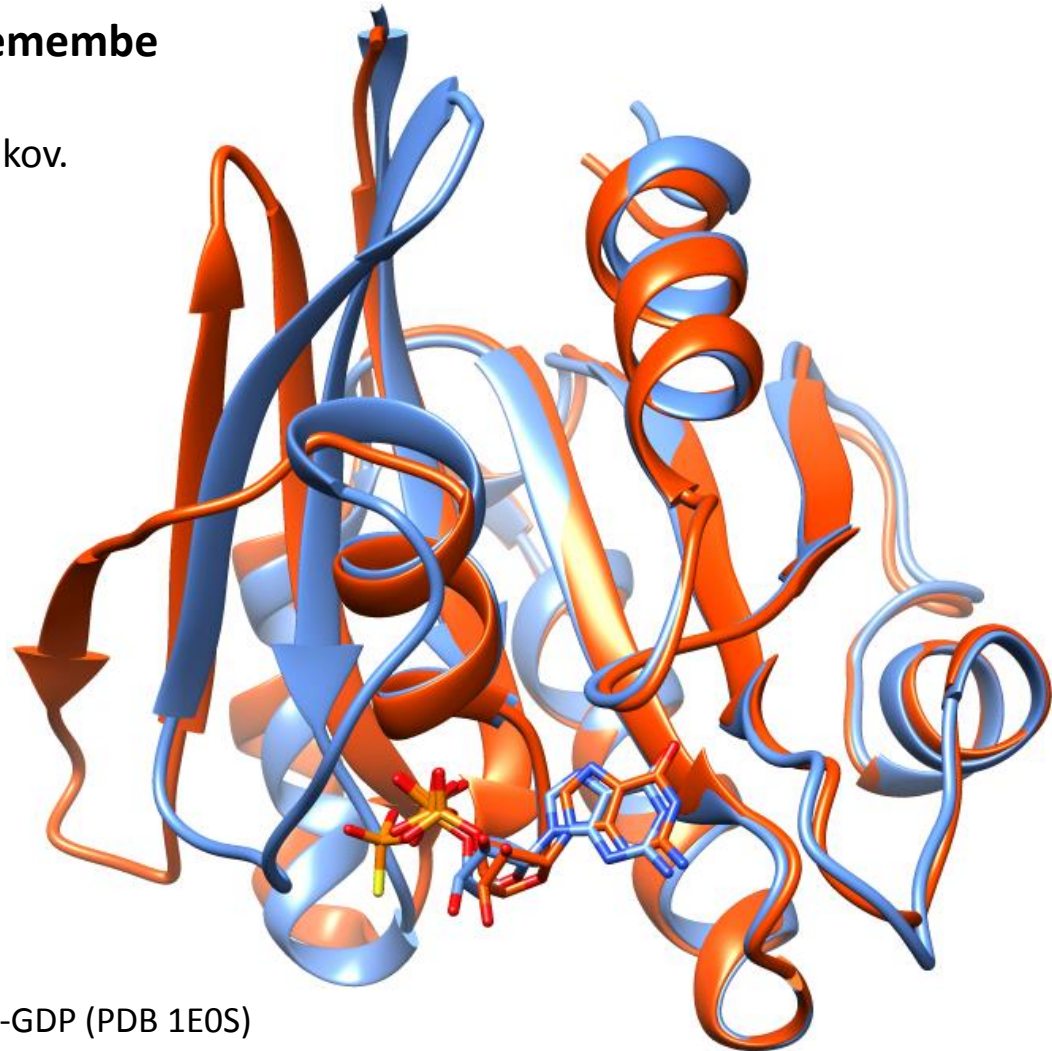
Strukturni vidik alosterije

Glede na obsežnost konformacijskih sprememb terciarne strukture, ki spremljajo alosterične efekte, ločimo štiri razrede konformacijskih sprememb.

3. razred – majhne konformacijske spremembe

Spremeni se konformacija 10% do 35% ostankov.

Primer: ADP ribozilacijski faktor 6 (Arf6)



rdeč – Arf6-GDP (PDB 1E0S)
moder – Arf6-GTP (PDB 2J5X)

Strukturni vidik alosterije

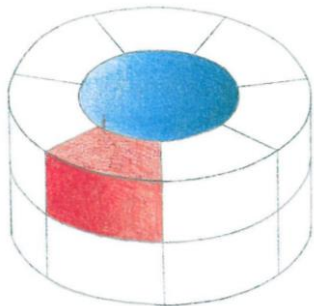
Glede na obsežnost konformacijskih sprememb terciarne strukture, ki spremljajo alosterične efekte, ločimo štiri razrede konformacijskih sprememb.

4. razred – premik domen

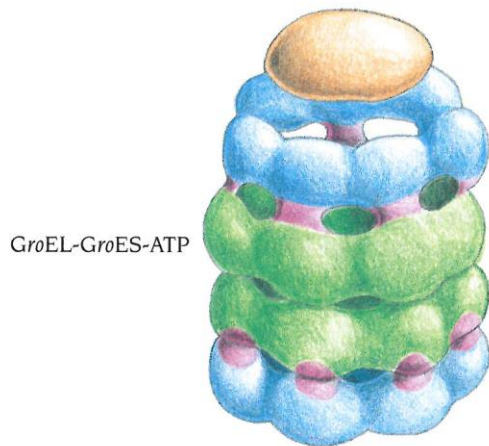
Spremeni se konformacija nad 35% (oz nad 60) ostankov.

Primer: GroEL

2 obroča iz po enakih 7 podenot

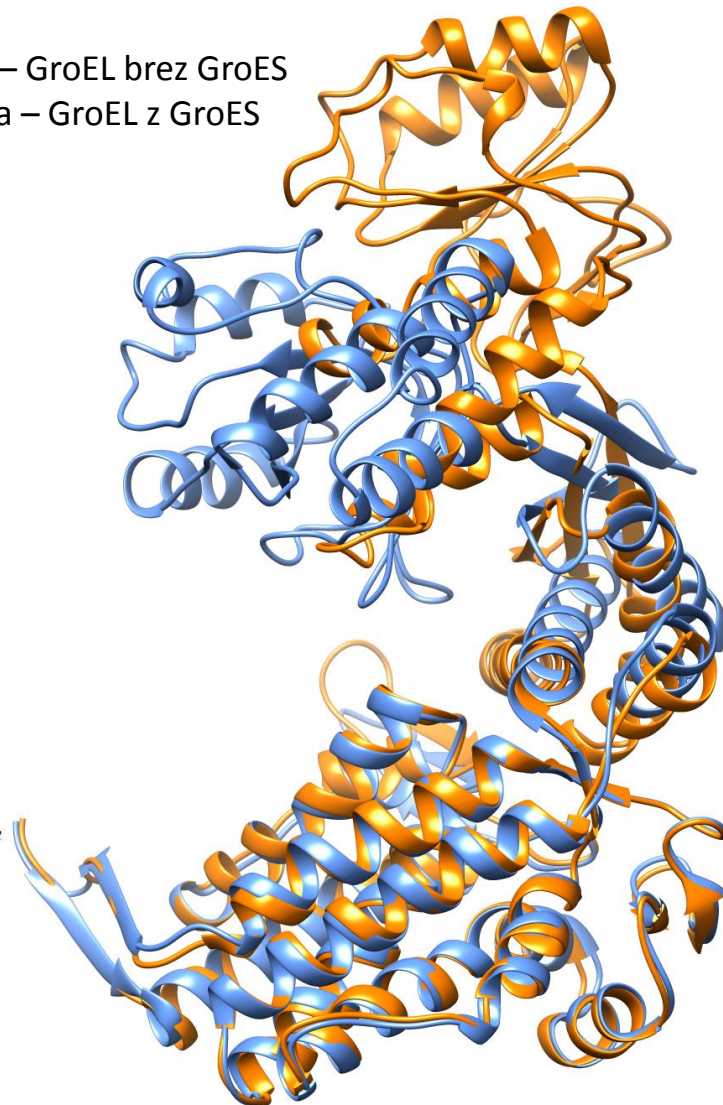


apical
intermediate
equatorial



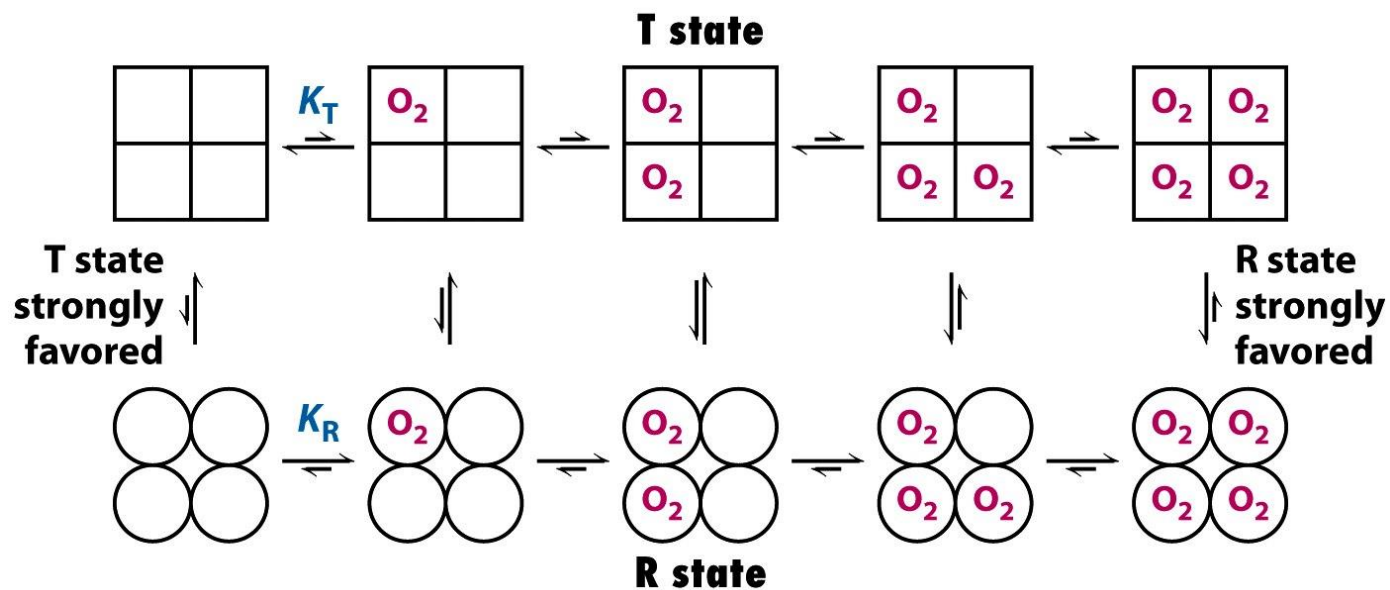
GroES
apical
intermediate
equatorial

modra – GroEL brez GroES
oranžna – GroEL z GroES



Kooperativnost in alosterija v hemoglobinu

MWC model



KNF model



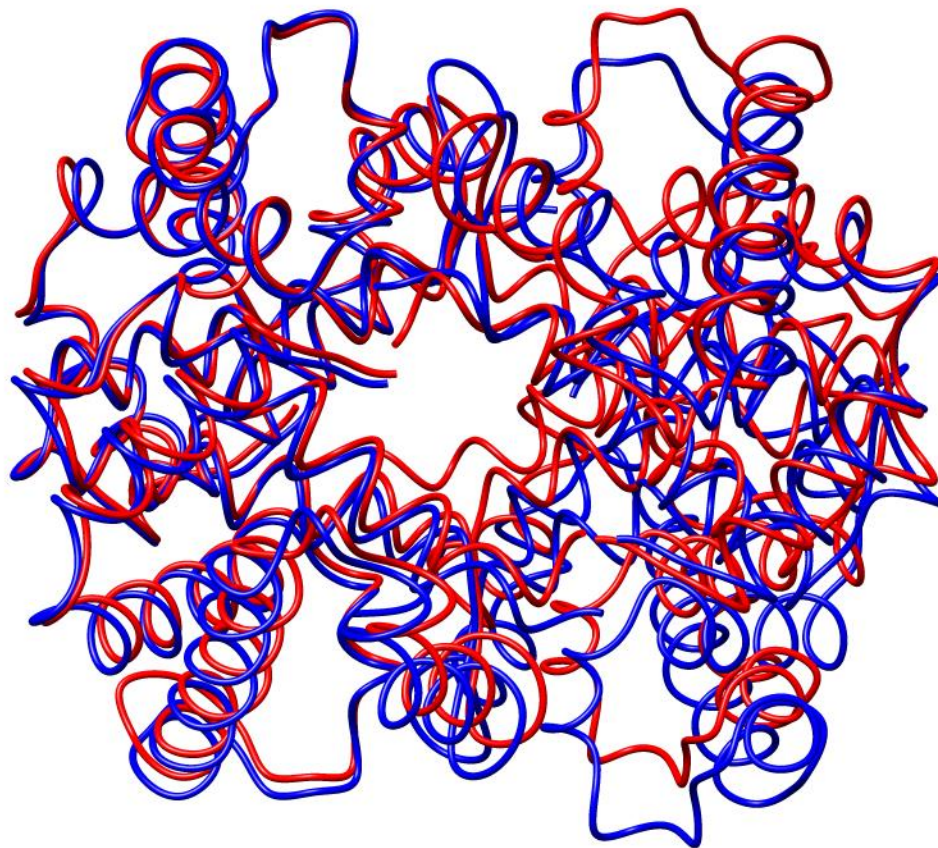
Hemoglobin

Hemoglobin je dimer dveh $\alpha\beta$ dimerov. Znotraj dimera ne pride do konformacijskih sprememb. Pride pa do premika enega dimera glede na drugega za okoli 15° .

dimer



tetramer

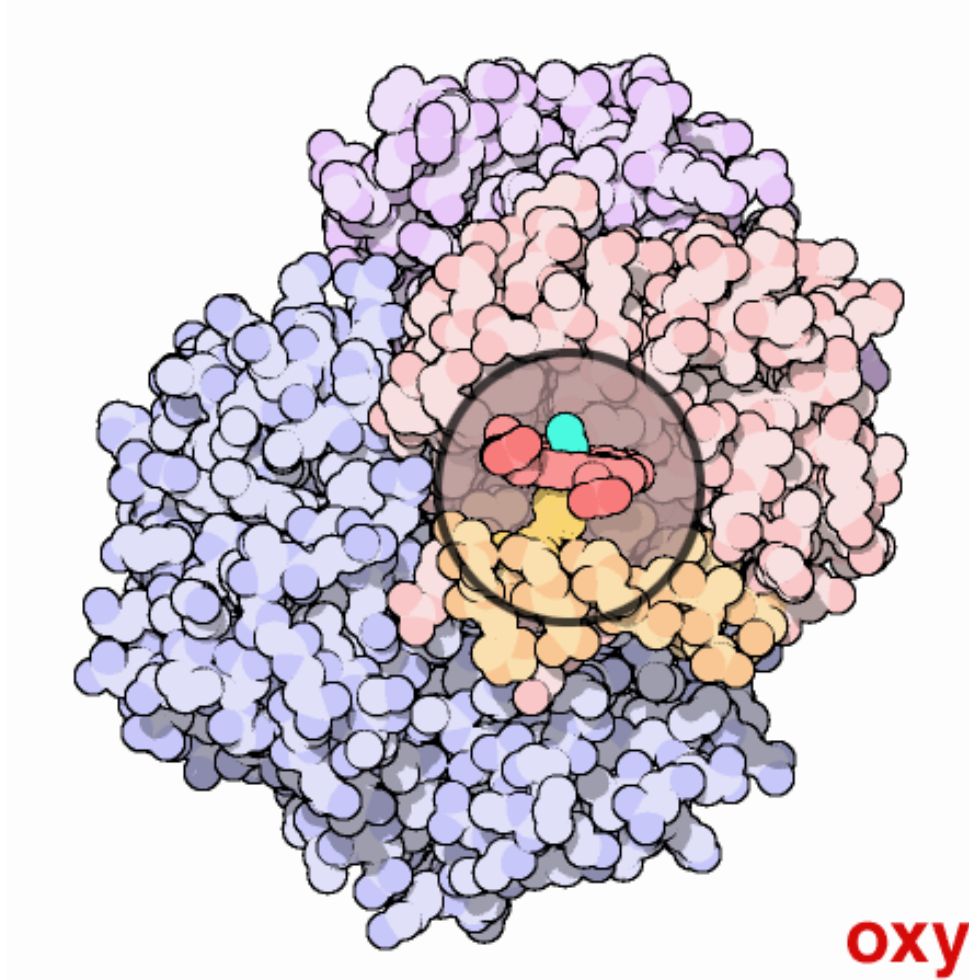


moder – deoksihemoglobin (PDB 2HHB)

rdeč – oksihemoglobin (PDB 1HHO)

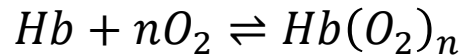
Hemoglobin

Hemoglobin je dimer dveh $\alpha\beta$ dimerov. Znotraj dimera ne pride do konformacijskih sprememb. Pride pa do premika enega dimera glede na drugega za okoli 15° .



Kooperativnost v hemoglobinu – Hillova enačba

1910 – britanski fiziolog Archibald Hill predstavil prvi model kooperativnosti v hemoglobinu. Predpostavil je, da je hemoglobin v odsotnosti kisika monomer, v prisotnosti kisika pa polimer. Njegov model ne vključuje delno nasičenih oblik hemoglobina.



Stehiometrična konstanta vezave za ta sistem je enaka:

$$\kappa = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb][O_2]^n}$$

Stopnja nasičenja je enaka

$$Y = \frac{[O_2]_{vezan}}{[Hb]_t} = \frac{n[Hb(O_2)_n]}{[Hb] + [Hb(O_2)_n]}$$

Z uporabo zveze $[Hb(O_2)_n] = \kappa[Hb][O_2]^n$ dobimo

$$Y = \frac{n\kappa[Hb][O_2]^n}{[Hb] + \kappa[Hb][O_2]^n} = \frac{n\kappa[O_2]^n}{1 + \kappa[O_2]^n}$$

Hillova enačba

Kooperativnost v hemoglobinu – Hillova enačba

Namesto absolutnega nasičenja lahko izrazimo relativno stopnjo nasičenosti $Y_{rel} = \frac{Y}{n}$

$$Y_{rel} = \frac{\kappa[O_2]^{n_H}}{1 + \kappa[O_2]^{n_H}} \quad \text{ozioroma v splošni obliki} \quad Y_{rel} = \frac{\kappa[L]^{n_H}}{1 + \kappa[L]^{n_H}}$$

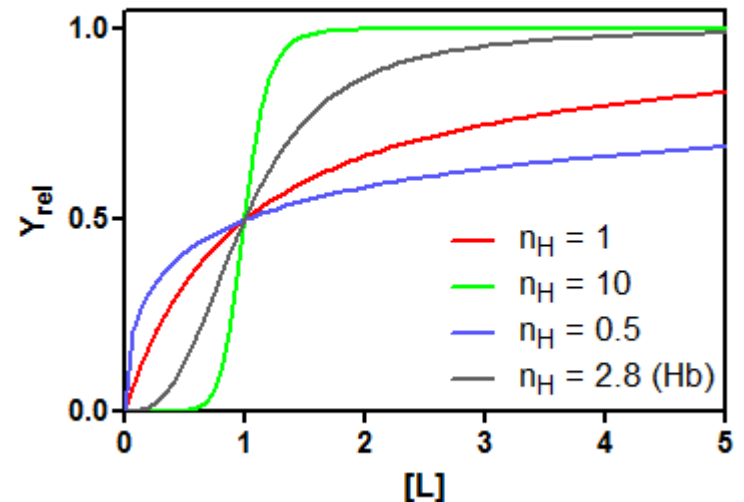
n_H ... Hillov koeficient (mera kooperativnosti)

$n_H = 1$... neodvisna vezava

$n_H < 1$... negativna kooperativnost

$n_H > 1$... pozitivna kooperativnost

Hillova predpostavka o zgolj dveh oblikah akceptorja (prosti in polno zasedeni) velja le v primeru ekstremne pozitivne kooperativnosti. V tem primeru $n_H \rightarrow n$. Če obstajajo tudi vmesni kompleksi, potem je $n_H < n$.



Kooperativnost v hemoglobinu – Adairova enačba

Adair je svojo enačbo razvil, da bi pojasnil odprta vprašanja Hillove teorije. Pokazal je, da je hemoglobin zgrajen iz štirih podenot, ki postopoma vežejo vsaka po eno molekulo kisika.

Za receptor s 4 vezavnimi mesti pričakujemo 4 različne konstante κ in 24 različnih konstant K . Ker ima hemoglobin štiri praktično identične podenote, lahko sistem zadovoljivo opišemo s štirimi K .

Z upoštevanjem zveze $\kappa_i = \frac{(n-i+1)}{i}K$ dobimo naslednje zveze:

$$\kappa_1 = 4K$$

$$\kappa_2 = \frac{3}{2}aK \quad a \dots \text{faktor kooperativnosti za vezavo druge molekule liganda}$$

$$\kappa_3 = \frac{2}{3}abK \quad b \dots \text{faktor kooperativnosti za vezavo tretje molekule liganda}$$

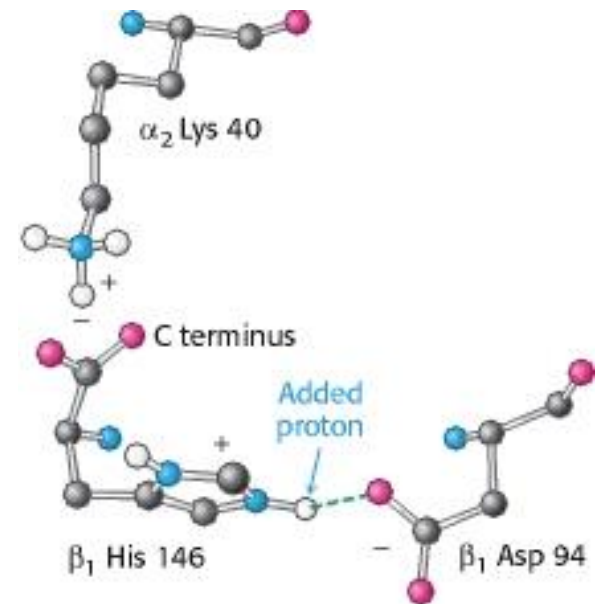
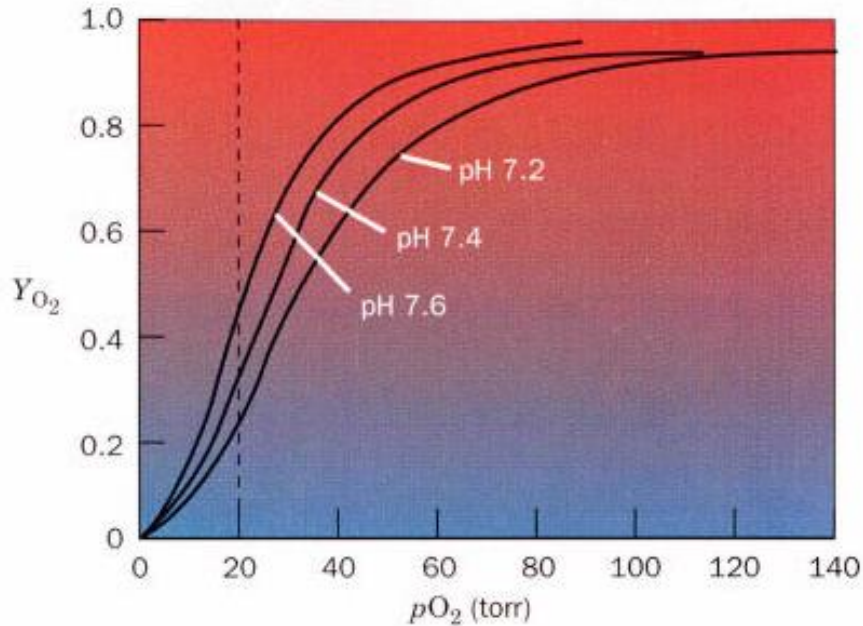
$$\kappa_4 = \frac{1}{4}abcK \quad c \dots \text{faktor kooperativnosti za vezavo četrte molekule liganda}$$

Adairova enačba za hemoglobin:

$$Y = \frac{4K[L] + 12aK^2[L]^2 + 12a^2bK^3[L]^3 + 4a^3b^2cK^4[L]^4}{1 + 4K[L] + 6aK^2[L]^2 + 4a^2bK^3[L]^3 + a^3b^2cK^4[L]^4}$$

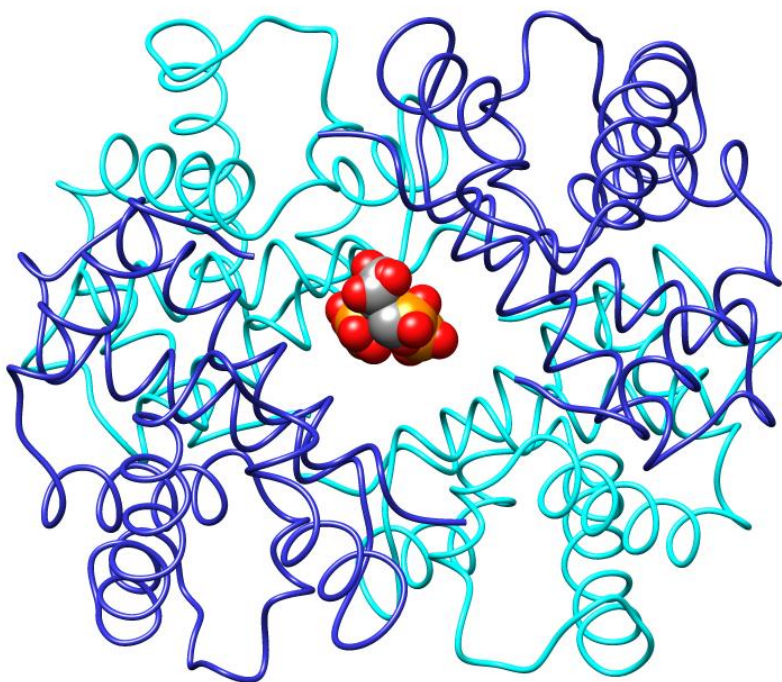
Alsterična regulacija hemoglobina

Bohrov efekt – afiniteta do kisika pada s padajočim pH. Protonacija C-končnega His stabilizira T obliko.



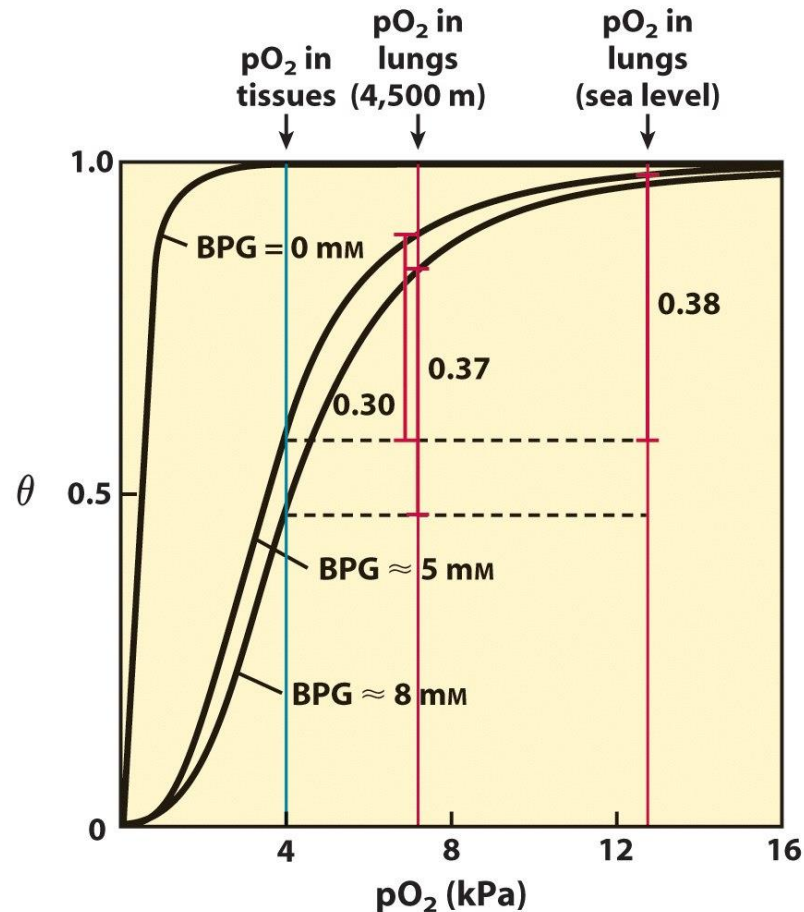
Alosterična regulacija hemoglobina

2,3-bisfosfoglicerat je alosteričen efektor hemoglobina. Veže se preferenčno na T obliko in jo stabilizira.



PDB 4L7V

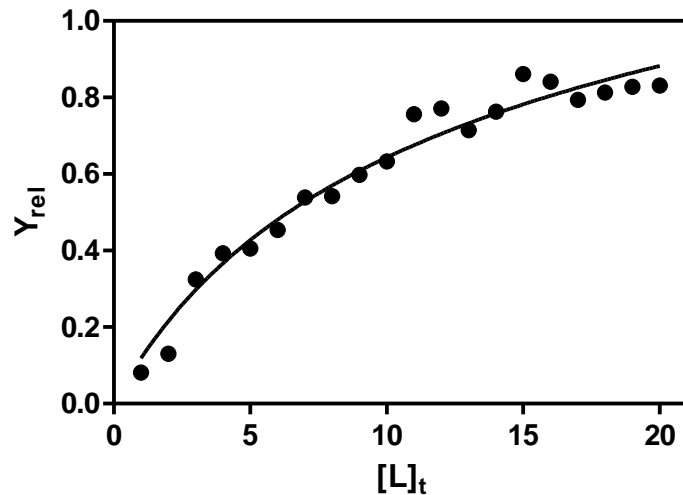
α podenoti - ciano
 β podenoti – modri



Grafične metode za analizo vezave ligandov

Direkten diagram

Odvisnost stopnje nasičenja od koncentracije liganda



Slabosti:

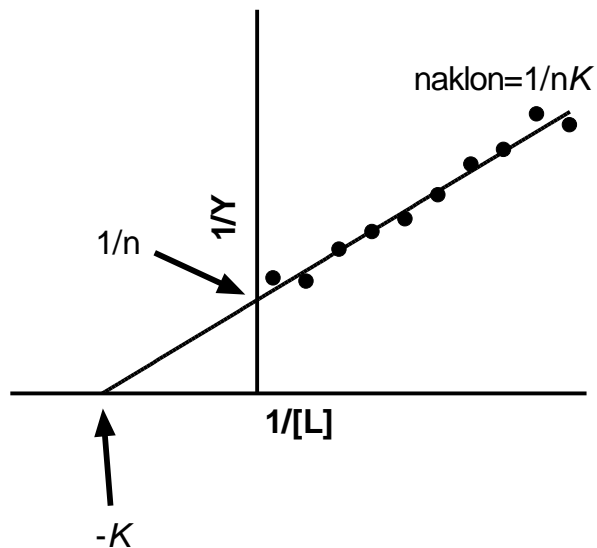
- Težko ocenimo maksimalno stopnjo nasičenja (plato)
- težko določimo kooperativnost
- Velik vpliv eksperimentalne napake pri vrednotenju modelov

Grafične metode za analizo vezave ligandov

Dvojni obratni diagram

$$Y = \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad \Rightarrow \quad \frac{1}{Y} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nK[L]}$$

Je analogen Lineweaver-Burk-ovemu diagramu pri encimski kinetiki in ima iste slabosti.



Slabosti:

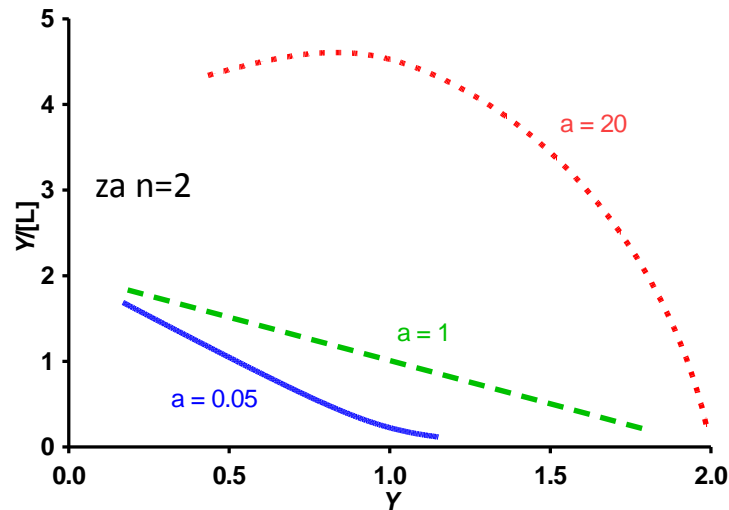
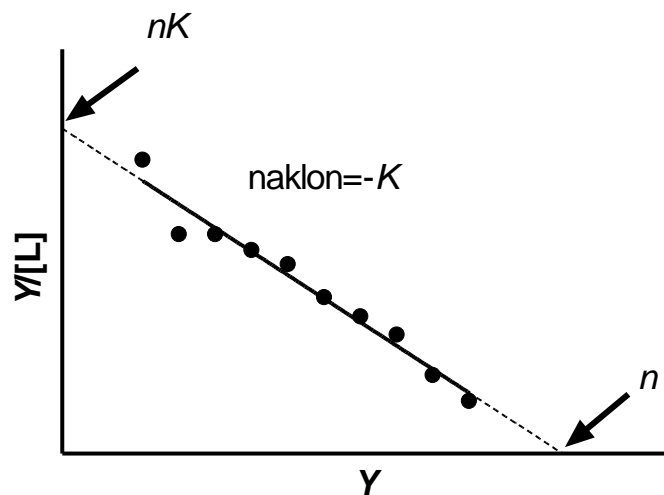
- Neenakomerna porazdelitev eksperimentalnih napak
- Primeren samo za nekooperativne mehanizme, kjer ima zgornja odvisnost dejansko obliko premice (kooperativni mehanizmi dajo druge krivulje).

Grafične metode za analizo vezave ligandov

Skatchardov diagram

Ob pravilni uporabi je zelo dober diagnostičen pripomoček.

$$Y = \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad \Rightarrow \quad \frac{Y}{[L]} = nK - YK$$



Alosterični mehanizmi dajo nelinearne diagrame

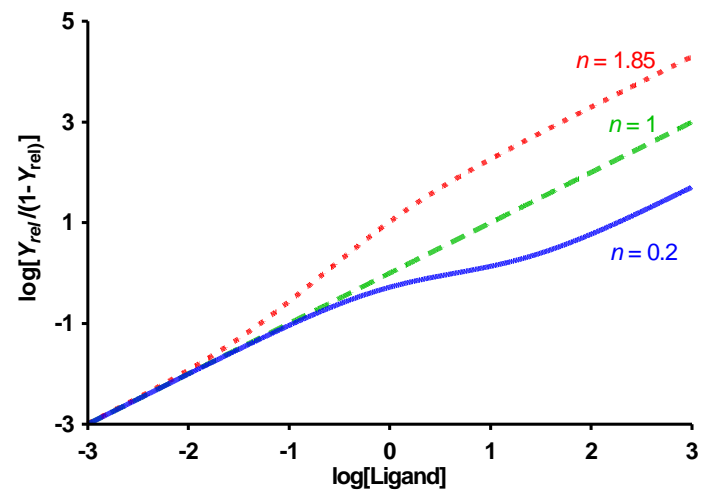
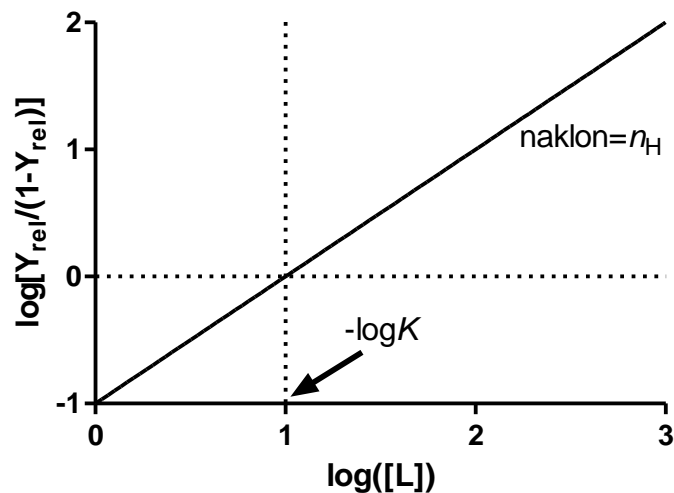
Grafične metode za analizo vezave ligandov

Logaritemski Hillov diagram

$$Y_{rel} = \frac{\kappa[L]^{n_H}}{1 + \kappa[L]^{n_H}}$$

lineariziramo:

$$\log \frac{Y_{rel}}{1 - Y_{rel}} = \log K + n_H \log[L]$$

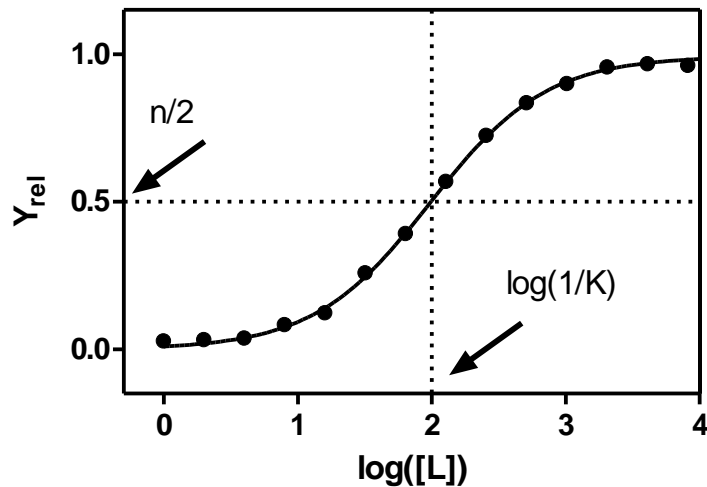


Grafične metode za analizo vezave ligandov

Semilogaritemski diagram

Včasih ga imenujejo tudi titracijska krivulja zaradi podobnosti s titracijo kislina-baza

$$Y = \frac{10^{(\log n + \log K + \log [L])}}{1 + 10^{(\log K + \log [L])}}$$



Manjši vpliv eksperimentalnih napak

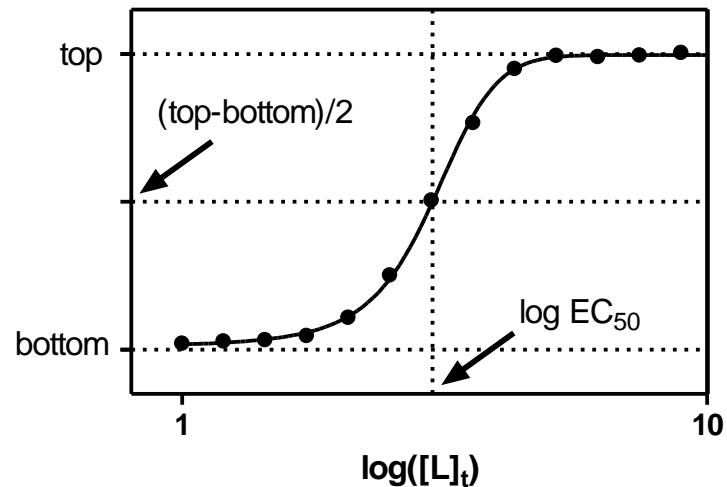
Grafične metode za analizo vezave ligandov

Sigmoidna krivulja odziva na odmerek (Sigmoidal-dose response curve)

Je inačica semilogaritemskega diagrama, ki je zelo priljubljena v farmakologiji.

$$response = bottom + \frac{(top - bottom)}{1 + 10^{\log EC_{50} - \log[L]}}$$

EC_{50} ... efektivna koncentracija, ki da 50 % maksimalnega odziva



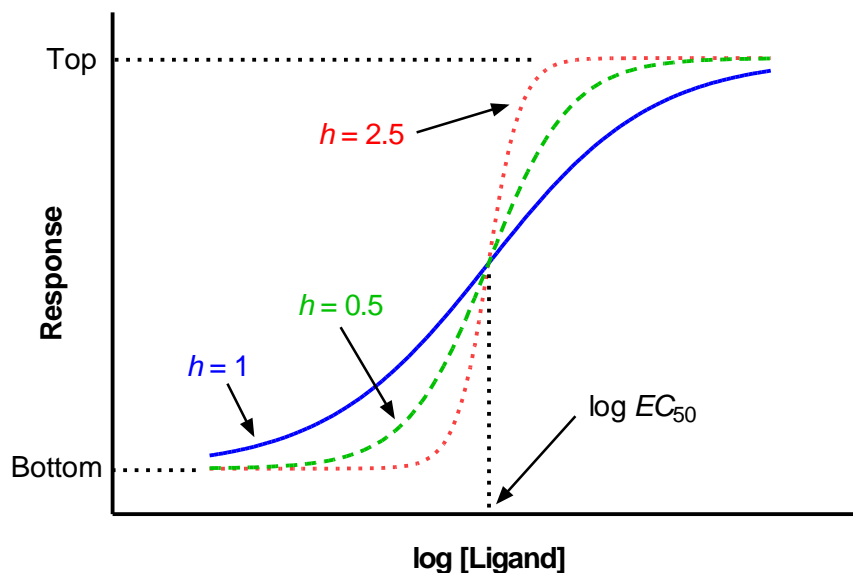
Grafične metode za analizo vezave ligandov

Logistični diagram s štirimi parametri (four-parameter logistic plot)

Imenovan tudi sigmoidna krivulja odziva na odmerek z variabilnim naklonom. Primeren za podatke, ki obsegajo koncentracije liganda v razponu več redov velikosti.

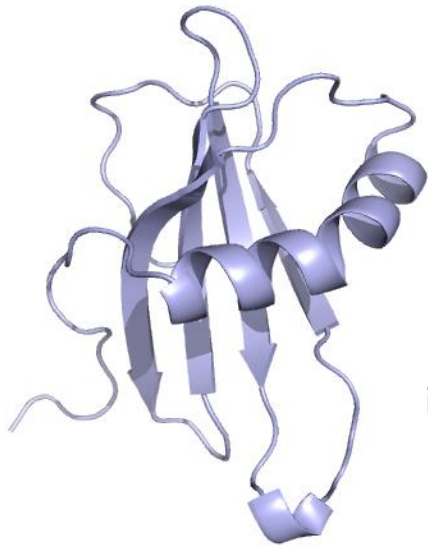
$$response = bottom + \frac{(top - bottom)}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log[L])h}}$$

Parameter h ima enak pomen kot n_H . Matematično je h naklon krivulje v središnji točki (prevoju).

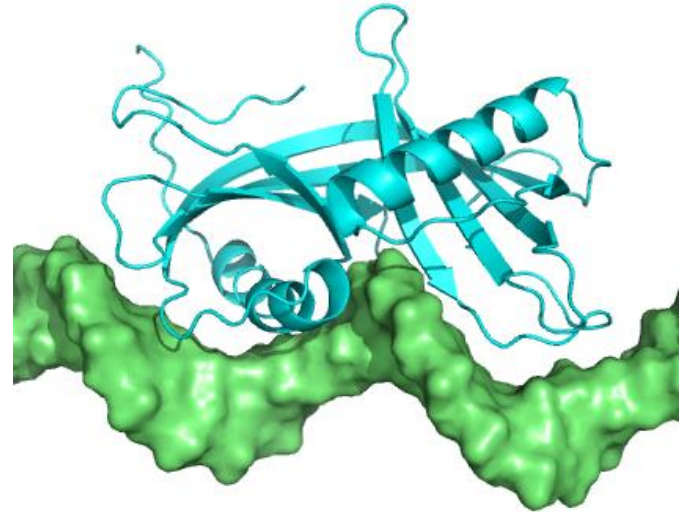


Vezava ligandov

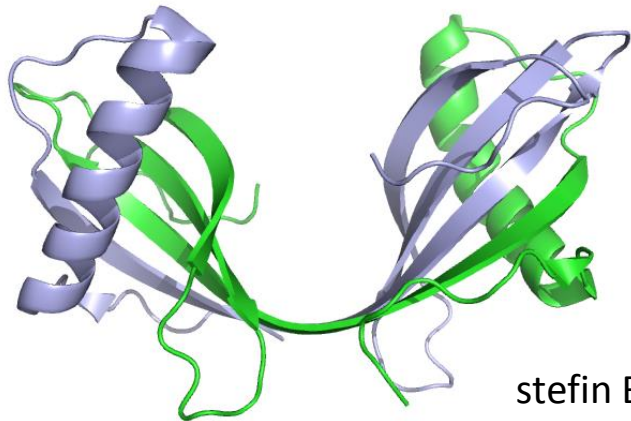
Primer: vezava dimera stefina B na DNA



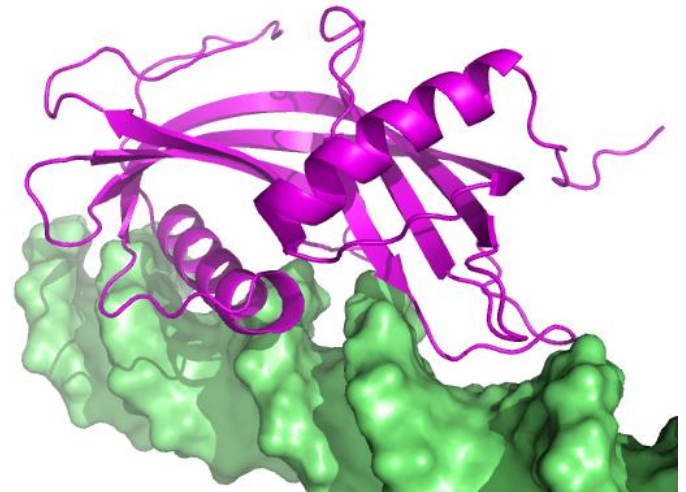
stefin B monomer je inhibitor cisteinskih proteaz



Model kompleksa stefin B (dimer)/ssDNA



stefin B dimer

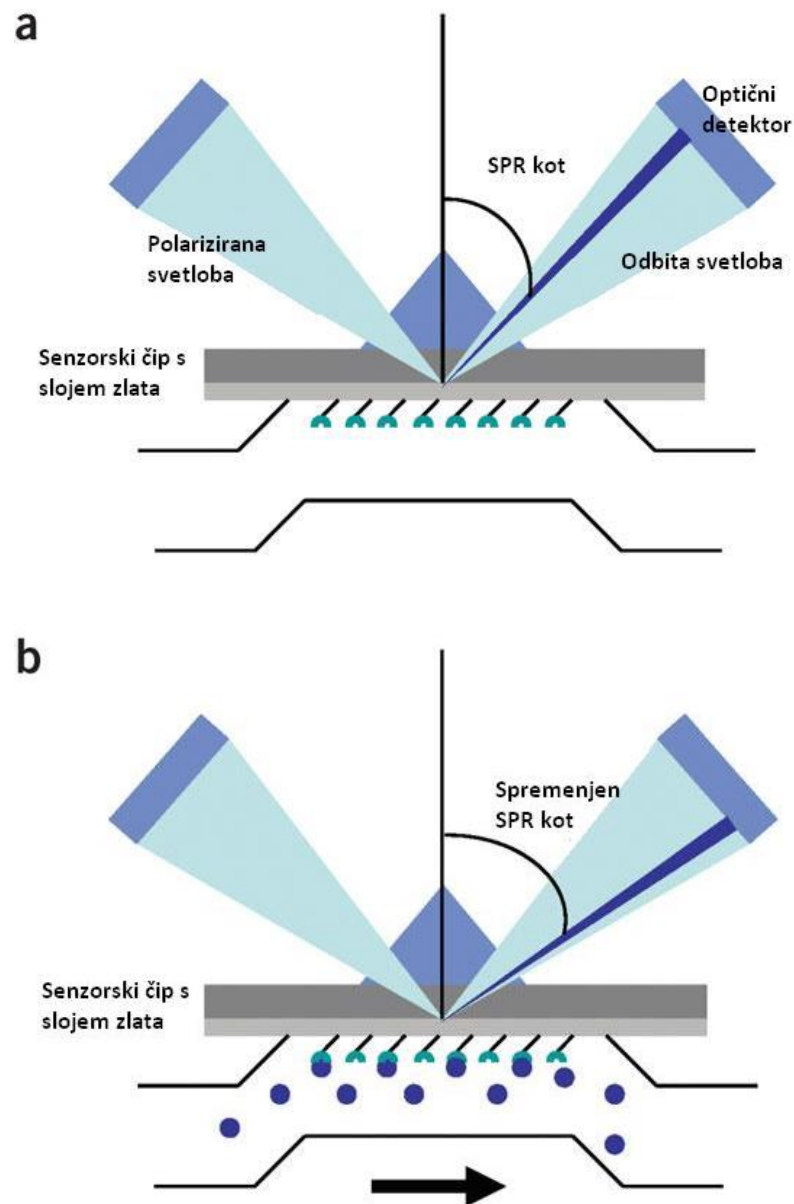
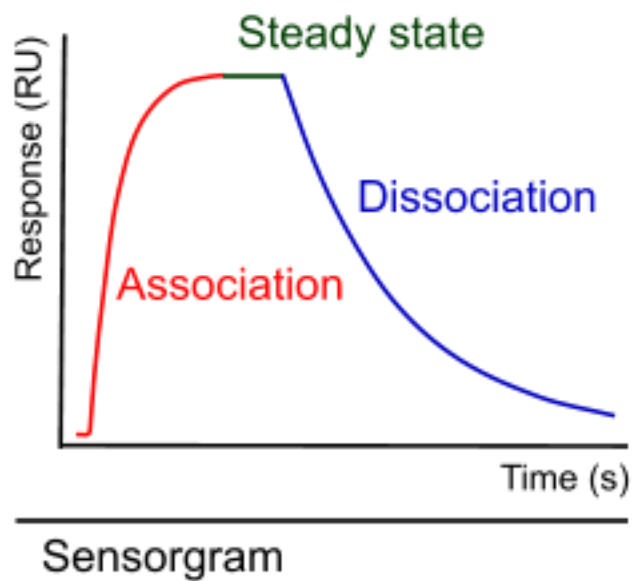


Model kompleksa stefin B (dimer)/dsDNA

Vezava ligandov

Primer: vezava dimera stefina B na DNA

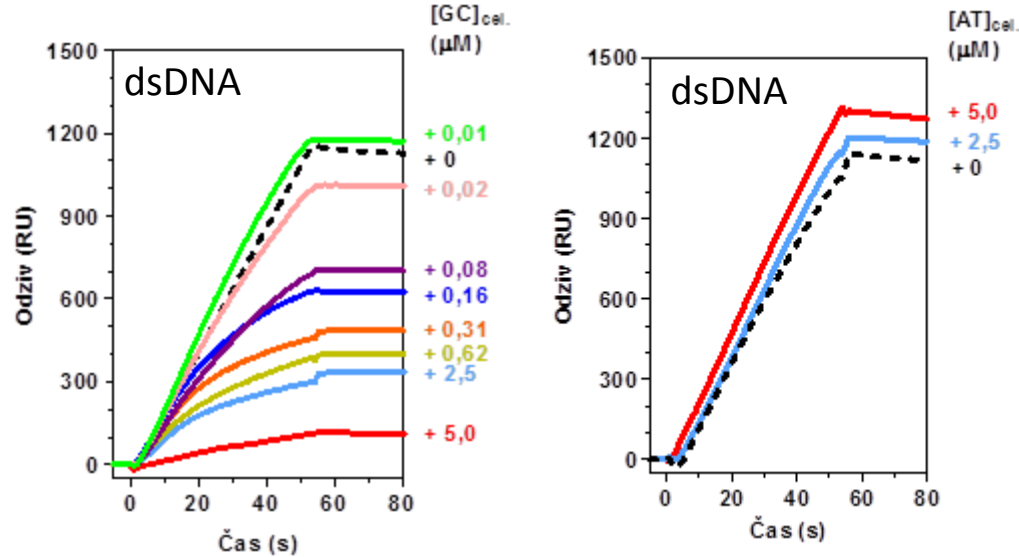
Metoda - površinska plazmonska resonanca



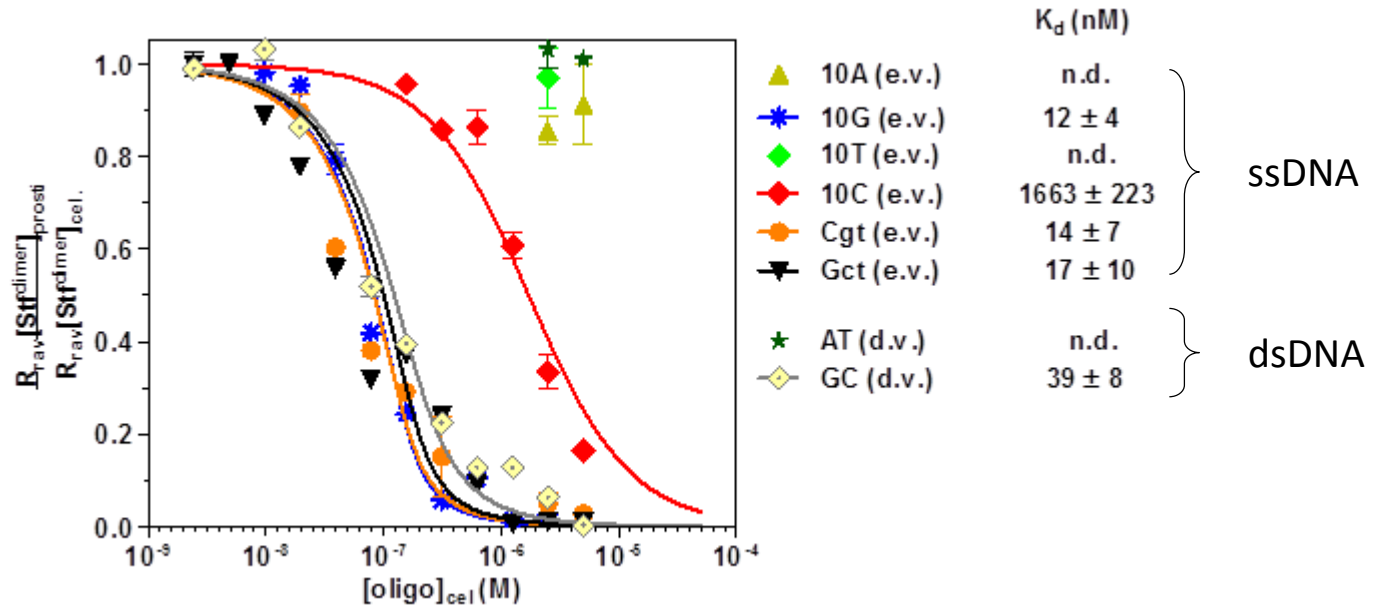
Vezava ligandov

Primer: vezava dimera stefina B na DNA.

Primeri
senzorgramov



Analiza
podatkov



Priloga

Zveza med makroskopskimi in mikroskopskimi konstantami:

Imamo eno vrednost K in n vrednosti κ

Predpostavimo, da se receptor polni postopoma in izrazimo hitrost asociacije (v_{as}) in disociacije (v_{dis}) za vsako molekulo liganda:

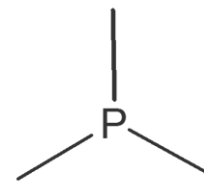
prva molekula liganda:

$$v_{as,1} = nk_1[P][L]$$

$$v_{dis,1} = k_{-1}[PL]$$

n prostih vezavnih mest

1 možnost disociacije



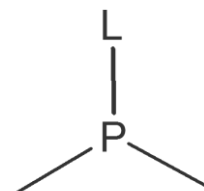
druga molekula liganda:

$$v_{as,2} = (n - 1)k_1[PL][L]$$

$$v_{dis,2} = 2k_{-1}[PL_2]$$

$(n-1)$ prostih vezavnih mest

2 možnosti disociacije



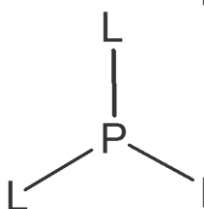
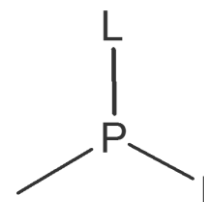
n -ta molekula liganda:

$$v_{as,n} = k_1[PL_{n-1}][L]$$

$$v_{dis,n} = nk_{-1}[PL_n]$$

eno prosto vezavno mesto

n možnosti disociacije



Priloga

Zveza med makroskopskimi in mikroskopskimi konstantami:

V ravnotežju velja, da je $v_{as} = v_{dis}$, torej izenačimo obe enačbi:

prva molekula liganda:

$$nk_1[P][L] = k_{-1}[PL] \quad \Rightarrow \quad n \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \kappa_1$$

druga molekula liganda:

$$(n-1)k_1[PL][L] = 2k_{-1}[PL_2] \quad \Rightarrow \quad \frac{n-1}{2} \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PL_2]}{[PL][L]} = \kappa_2$$

n-ta molekula liganda:

$$k_1[PL_{n-1}][L] = nk_{-1}[PL_n] \quad \Rightarrow \quad \frac{1}{n} \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PL_n]}{[PL_{n-1}][L]} = \kappa_n$$

Splošno: $\kappa_i = \frac{(n-i+1)}{i} K$

