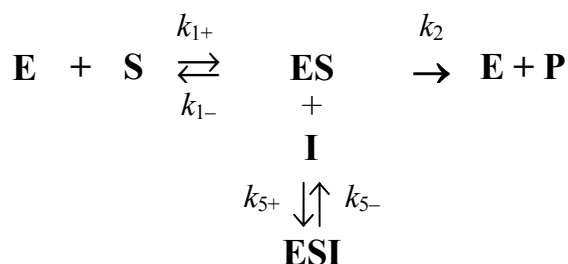


Úloha 9-14 Inhibice enzymových reakcí

Pro plně akompetitivní inhibici probíhající podle schematu



navrhněte rovnici popisující závislost rychlosti této inhibované reakce na koncentraci substrátu a inhibitoru a převed'te rychlostní rovnici do nejčastěji používaných linearizovaných tvarů (Lineweavera a Burka, Hanese, Eadiea). Předpokládejte, že mezi substrátem, enzymem a inhibitorem se rychle ustavuje rovnováha.

Z hodnot počátečních rychlostí, naměřených pro plně akompetitivní inhibici při různých koncentracích substrátu a inhibitoru:

c_S mol dm ⁻³	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$				
	$c_I = 0$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,008$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,018$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,030$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,045$ mol dm ⁻³
0,0008	$5,263 \cdot 10^{-5}$	$4,242 \cdot 10^{-5}$	$3,415 \cdot 10^{-5}$	$2,767 \cdot 10^{-5}$	$2,236 \cdot 10^{-5}$
0,0050	$1,563 \cdot 10^{-4}$	$9,115 \cdot 10^{-5}$	$6,000 \cdot 10^{-5}$	$4,248 \cdot 10^{-5}$	$3,114 \cdot 10^{-5}$
0,0125	$2,016 \cdot 10^{-4}$	$1,049 \cdot 10^{-4}$	$6,560 \cdot 10^{-5}$	$4,525 \cdot 10^{-5}$	$3,260 \cdot 10^{-5}$
0,0250	$2,232 \cdot 10^{-4}$	$1,105 \cdot 10^{-4}$	$6,772 \cdot 10^{-5}$	$4,625 \cdot 10^{-5}$	$3,311 \cdot 10^{-5}$

zjistěte hodnotu disociační konstanty komplexu ESI K'_I , a hodnoty konstant K'_M a v'_{\max} pro jednotlivé koncentrace inhibitoru. Nakreslete Dixonův graf a graf podle Huntera a Downse.

Řešení:

Za nepřítomnosti inhibitoru je rychlost reakce popsána rovnicí Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad [1]$$

Pro rychlost inhibované reakce platí

$$v_i = k_2 \cdot c_{\text{ES}} \quad [2]$$

Koncentrace komplexu ES je dána pomocí substrátové konstanty K_S , která je rovna Michaelisově konstantě K_M pro neinhibovanou reakci

$$\frac{c_E \cdot c_S}{c_{\text{ES}}} = K_S = \frac{k_{1-}}{k_{1+}} = K_M \quad \Rightarrow \quad c_{\text{ES}} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \quad [3]$$

Koncentraci volného enzymu c_E vyjádříme z bilance

$$c_{\text{E0}} = c_E + c_{\text{ES}} + c_{\text{ESI}} \quad [4]$$

Pro koncentraci komplexu ESI platí

$$\frac{c_{\text{ES}} \cdot c_I}{c_{\text{ESI}}} = K'_I = \frac{k_{5-}}{k_{5+}} \quad \Rightarrow \quad c_{\text{ESI}} = \frac{c_{\text{ES}} \cdot c_I}{K'_I} = \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K'_I} \quad [5]$$

Po dosazení z rovnic [3] a [5] do [4]

$$c_{\text{E0}} = c_E + \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} + \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K'_I} \quad [6]$$

$$c_E = \frac{c_{E0}}{1 + \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} + \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K'_I}} \quad [7]$$

Kombinací rovnic [3], [7] a [2] dostaneme

$$v_i = k_2 \cdot \frac{c_{E0}}{1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K'_I}} \cdot \frac{c_S}{K_M} = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{K_M + c_S \left(1 + \frac{c_I}{K'_I}\right)} \quad [8]$$

Výraz pro rychlost inhibované reakce upravíme do tvaru rovnice Michaelise a Mentenové pro neinhibovanou reakci:

$$v_i = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \frac{K'_I}{K'_I + c_I} \cdot c_S}{\frac{K_M \cdot K'_I}{K'_I + c_I} + c_S} = \frac{v'_{\max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \quad [9]$$

Mezi parametry inhibované a neinhibované reakce tedy platí

$$K'_M = K_M \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I} \quad [10]$$

$$v'_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I} = v_{\max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I} \quad [11]$$

Linearizace rychlostní rovnice

1. podle Lineweavera a Burka

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v'_{\max}} + \frac{K'_M}{v'_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \underbrace{\frac{K'_I + c_I}{v_{\max} \cdot K'_I}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_M}{v_{\max} \cdot K'_I}}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad [12]$$

2. podle Hanese

$$\frac{c_S}{v_i} = \frac{K'_M}{v'_{\max}} + \frac{1}{v'_{\max}} \cdot c_S = \underbrace{\frac{K_M}{v_{\max}}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K'_I + c_I}{v_{\max} \cdot K'_I}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S \quad [13]$$

3. nebo podle Eadiea

$$v_i = v'_{\max} - K'_M \cdot \frac{v_i}{c_S} = \underbrace{v_{\max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I}}_{\text{úsek}} - \underbrace{K_M \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I}}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{v_i}{c_S} \quad [14]$$

Výpočet kinetických parametrů

Pro výpočet kinetických parametrů K'_M a v'_{\max} zvolíme např. linearizaci podle Lineweavera a Burka (rovnice [12])

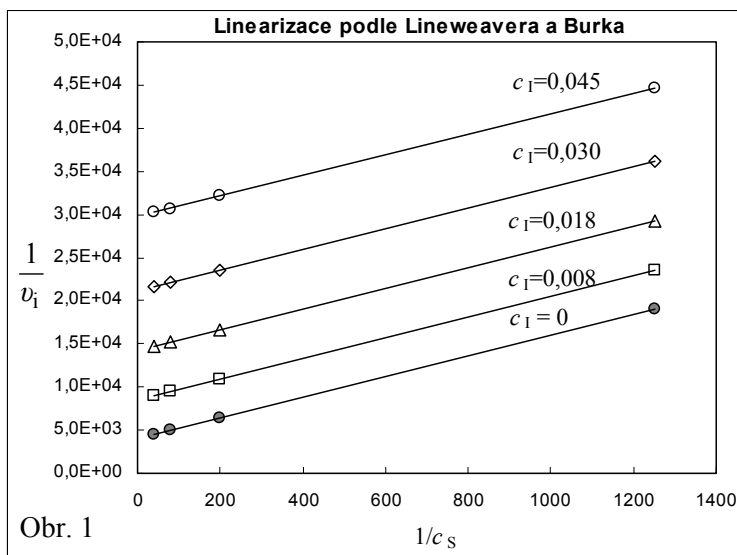
Tabulka 1

	$1/v_0$	$1/v_i$			
$1/c_S$	$c_I = 0$	$c_I = 0,008$	$c_I = 0,018$	$c_I = 0,030$	$c_I = 0,045$
1250	$1,900 \cdot 10^{-4}$	$2,357 \cdot 10^{-4}$	$2,928 \cdot 10^{-4}$	$3,614 \cdot 10^{-4}$	$4,472 \cdot 10^{-4}$
200	$6,398 \cdot 10^{-3}$	$1,097 \cdot 10^{-4}$	$1,667 \cdot 10^{-4}$	$2,354 \cdot 10^{-4}$	$3,211 \cdot 10^{-4}$
80	$4,960 \cdot 10^{-3}$	$9,533 \cdot 10^{-3}$	$1,524 \cdot 10^{-4}$	$2,210 \cdot 10^{-4}$	$3,067 \cdot 10^{-4}$
40	$4,480 \cdot 10^{-3}$	$9,050 \cdot 10^{-3}$	$1,477 \cdot 10^{-4}$	$2,162 \cdot 10^{-4}$	$3,020 \cdot 10^{-4}$

Lineární regresí byly pro jednotlivé koncentrace inhibitoru získány tyto hodnoty konstant rovnice [12]:

Tabulka 2

c_I	směrnice	úsek
	$\frac{K'_M}{v'_{\max}} = \frac{K_M}{v_{\max}}$	$\frac{1}{v'_{\max}} = \frac{K'_I + c_I}{v_{\max} \cdot K'_I}$
mol dm^{-3}	s	$(\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})^{-1}$
0	12,0007	3999,5122
0,008	12,0023	8570,9575
0,018	12,0012	14279,4844
0,03	11,9997	21140,5646
0,045	12,0045	29716,4824



Obr. 1

Při nulové koncentraci inhibitoru z hodnoty úseku dostaneme v_{\max} pro neinhibovanou reakci:

$$v_{\max} = \frac{1}{3999,5122} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Pro Michaelisovu konstantu platí

$$\frac{K_M}{v_{\max}} = 12,0007 \text{ s} \Rightarrow K_M = 12,0007 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

Konstantu K'_I stanovíme z hodnot úseku lineární závislosti [12] (viz tab. 2). Vztah pro úsek upravíme do tvaru

$$\frac{v_{\max}}{v'_{\max}} = \frac{1}{K'_I} \cdot c_I + 1 \quad [15]$$

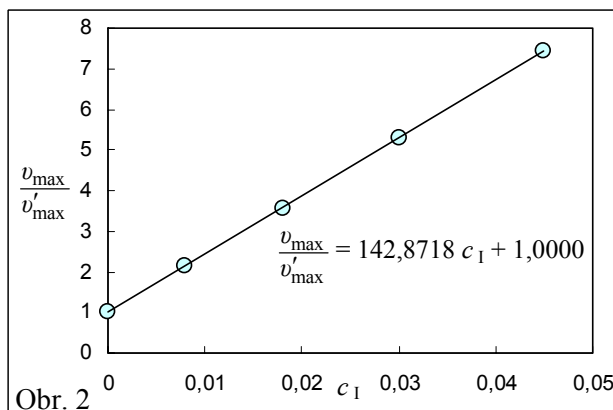
a lineární regresí vypočítáme směrnici, pro kterou platí

$$\frac{1}{K'_I} = 142,8718$$

$$K'_I = 7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

Tabulka 3

c_I	v_{\max} / v'_{\max}
0	1
0,008	2,143
0,018	3,570
0,03	5,286
0,045	7,430



Pro kinetické parametry inhibované reakce v závislosti na koncentraci inhibitoru (mol dm^{-3}) tedy podle vztahů [10] a [11] platí

$$K'_M / (\text{mol dm}^{-3}) = 3 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{7 \cdot 10^{-3}}{7 \cdot 10^{-3} + c_I} = \frac{2,1 \cdot 10^{-6}}{7 \cdot 10^{-3} + c_I}$$

$$v'_{\max} / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{7 \cdot 10^{-3}}{7 \cdot 10^{-3} + c_I} = \frac{1,75 \cdot 10^{-6}}{7 \cdot 10^{-3} + c_I}$$

Dixonův graf:

$1/v_i$ proti c_I za konstantní koncentrace substrátu

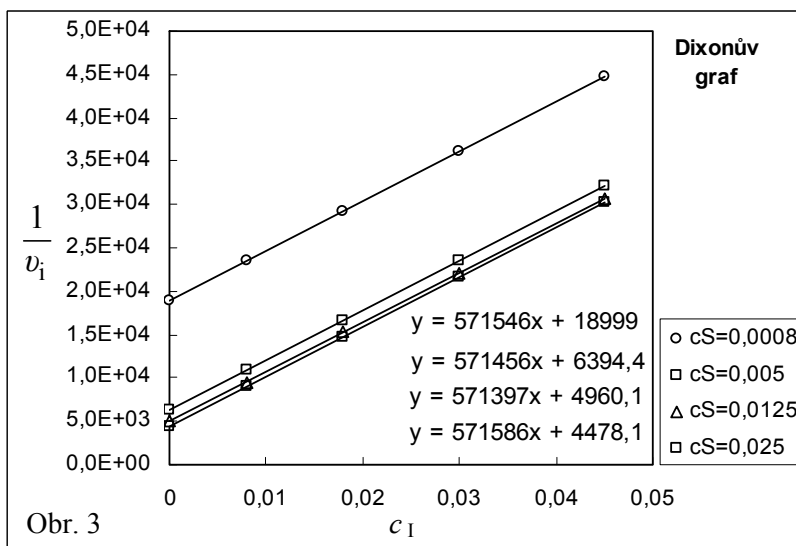
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K'_I}{v_{\max} \cdot K'_I} + \frac{c_I}{v_{\max} \cdot K'_I} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \underbrace{\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{1}{v_{\max} \cdot K'_I}}_{\text{směrnice}} \cdot c_I \quad [15]$$

Konstantu K'_I je možno zjistit také ze směrnice Dixonova grafu, jejíž střední hodnota je

$$\frac{1}{v_{\max} \cdot K'_I} = 571496,25$$

$$K'_I = \frac{1}{2,5 \cdot 10^{-4} \cdot 571496,25}$$

$$K'_I = 7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$



Graf podle Huntera a Downse:

$$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} = \frac{c_I \cdot \frac{v_{\max} \cdot c_S \cdot K'_I}{K_M \cdot K'_I + c_S \cdot (K'_I + c_I)}}{\frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} - \frac{v_{\max} \cdot c_S \cdot K'_I}{K_M \cdot K'_I + c_S \cdot (K'_I + c_I)}} = \frac{c_I \cdot K'_I \cdot (K_M + c_S)}{\cancel{K_M \cdot K'_I} + \cancel{c_S \cdot K'_I} + c_S \cdot c_I - \cancel{K_M \cdot K'_I} - \cancel{c_S \cdot K'_I}}$$

$$\begin{aligned} \frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} &= \frac{K'_I \cdot K_M}{c_S} + K'_I \\ &= \frac{2,1 \cdot 10^{-6}}{c_S} + 7 \cdot 10^{-3} \end{aligned} \quad [16]$$

