Úloha 9-19 Inhibice enzymových reakcí – částečně nekompetitivní inhibice

O jisté enzymové reakci se předpokládá, že probíhá podle schématu

$$
\begin{array}{ccccccc}
\mathbf{E} & + & \mathbf{S} & \underset{k_{1-}}{\overset{k_{1+}}{\rightleftarrows}} & \mathbf{ES} & \xrightarrow{k_2} & \mathbf{E + P} \\
+ & & & & + & & \\
\mathbf{I} & & & & \mathbf{I} & & \\
k_{3+} \downarrow\uparrow k_{3-} & & & & k_{5+} \downarrow\uparrow k_{5-} & & \\
\mathbf{EI} & + & \mathbf{S} & \underset{k_{4-}}{\overset{k_{4+}}{\rightleftarrows}} & \mathbf{ESI} & \xrightarrow{k_6} & \mathbf{EI + P}
\end{array}
$$

které popisuje částečně nekompetitivní inhibici. Vyjádřete
(a) rychlost reakce jako funkci koncentrace substrátu a inhibitoru,
(b) nejčastěji používané linearizované tvary rychlostní rovnice
(c) Z dat uvedených v následující tabulce vypočítejte kinetické parametry inhibované i neinhibované reakce

c_S / mol dm^{-3}	v_i / (mol dm^{-3} s^{-1})				
	$c_I = 0$ mol dm^{-3}	$c_I = 0{,}0053$ mol dm^{-3}	$c_I = 0{,}012$ mol dm^{-3}	$c_I = 0{,}025$ mol dm^{-3}	$c_I = 0{,}060$ mol dm^{-3}
0,025	$7{,}054 \cdot 10^{-6}$	$6{,}008 \cdot 10^{-6}$	$5{,}442 \cdot 10^{-6}$	$4{,}979 \cdot 10^{-6}$	$4{,}600 \cdot 10^{-6}$
0,110	$2{,}294 \cdot 10^{-5}$	$1{,}954 \cdot 10^{-5}$	$1{,}770 \cdot 10^{-5}$	$1{,}620 \cdot 10^{-5}$	$1{,}496 \cdot 10^{-5}$
0,250	$3{,}648 \cdot 10^{-5}$	$3{,}107 \cdot 10^{-5}$	$2{,}814 \cdot 10^{-5}$	$2{,}575 \cdot 10^{-5}$	$2{,}379 \cdot 10^{-5}$
0,550	$4{,}883 \cdot 10^{-5}$	$4{,}159 \cdot 10^{-5}$	$3{,}766 \cdot 10^{-5}$	$3{,}446 \cdot 10^{-5}$	$3{,}184 \cdot 10^{-5}$

(d) Sestrojte grafy podle Dixona a podle Huntera a Downse.

Řešení:

Při ***částečně* nekompetitivní inhibici** vazba inhibitoru neovlivňuje vazbu substrátu, tedy $K_I' = K_I$ a $K_S' = K_S$, ternární komplex se však na rozdíl od plně kompetitivní inhibice (viz Úloha 9-18) rozpadá na produkt, ale pomaleji než komplex ES ($k_2 > k_6$):

(a) Rychlost reakce se rovná součtu rychlostí tvorby produktu rozpadem komplexu ES a komplexu ESI:

$$v_i = k_2 \cdot c_{ES} + k_6 \cdot c_{ESI} \qquad [1]$$

Koncentrace komplexu ES je dána vztahem pro disociační konstantu K_S (= K_M) :

$$K_S = K_M = \frac{c_E \cdot c_S}{c_{ES}} \quad \Rightarrow \quad c_{ES} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \qquad [2]$$

Koncentraci volného enzymu c_E vyjádříme z bilance

$$c_{E0} = c_E + c_{ES} + c_{EI} + c_{ESI} \qquad [3]$$

kde koncentraci komplexu EI je dána disociační konstanty K_I:

$$K_I = \frac{c_E \cdot c_I}{c_{EI}} \quad \Rightarrow \quad c_{EI} = \frac{c_E \cdot c_I}{K_I} \qquad [4]$$

a koncentrace komplexu ESI disociační konstantou K_S' (=K_S) :

$$K'_S (= K_S = K_M) = \frac{c_{EI} \cdot c_S}{c_{ESI}} \quad \Rightarrow \quad c_{ESI} = \frac{c_{EI} \cdot c_S}{K_M} = \frac{c_E \cdot c_I \cdot c_S}{K_I \cdot K_M} \qquad [5]$$

nebo K_I' (=K_I):

$$K'_I = K_I = \frac{c_{ES} \cdot c_I}{c_{ESI}} \quad \Rightarrow \quad c_{ESI} = \frac{c_{ES} \cdot c_S}{K_I} = \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K_I} \qquad [6]$$

Z rovnic [4] až [6] dosadíme do bilance [3] a vyjádříme koncentraci volného enzymu, potřebnou pro vyjádření c_{ES}.:

$$c_E = \frac{c_{E0}}{\left(1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I} + \frac{c_I \cdot c_S}{K_I \cdot K_M}\right)}\ , \qquad [7]$$

Pro *rychlost inhibované reakce* pak platí

$$v_i = k_2 \cdot \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} + k_6 \cdot \frac{c_E \cdot c_I \cdot c_S}{K_I \cdot K_M} = (k_2 + k_6 \cdot \frac{c_I}{K_I}) \cdot \frac{c_{E0} \cdot c_S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I} + \frac{c_I \cdot c_S}{K_I \cdot K_M}\right)} =$$

$$= (1 + \frac{k_6}{k_2} \cdot \frac{c_I}{K_I}) \cdot \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{\left(K_M + c_S + \frac{c_I}{K_I} \cdot K_M + \frac{c_I \cdot c_S}{K_I}\right)} = (1 + \frac{k_6}{k_2} \cdot \frac{c_I}{K_I}) \cdot \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{\left(K_M \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) \cdot c_S\right)} \qquad [8]$$

Pro poměr rychlostních konstant k_6/k_2 je zvykem používat symbolu β. Rovnici [8] upravíme do tvaru rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_i = \left(\frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I}\right) \cdot \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{K_M + c_S} = \frac{v'_{max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \qquad [9]$$

kde

$$K'_M = K_M \qquad [10]$$

$$v'_{max} = \left(\frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I}\right) \cdot k_2 \cdot c_{E0} = \left(\frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I}\right) \cdot v_{max} \qquad [11]$$

(b) Linearizované tvary rychlostní rovnice:

1. podle Lineweavera a Burka

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

2. podle Hanese

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

3. podle Eadiea

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

(c) Výpočet kinetických parametrů K'_M, v'_{max}, K_I a β

Použijeme např. linearizovaného tvaru Lineweavera a Burka

Tabulka 1

	$1/v_0$	$1/v_i$			
$1/c_S$	$c_I = 0$	$c_I = 0{,}0053$	$c_I = 0{,}012$	$c_I = 0{,}025$	$c_I = 0{,}060$
40,000	$1{,}418 \cdot 10^5$	$1{,}664 \cdot 10^5$	$1{,}838 \cdot 10^5$	$2{,}008 \cdot 10^5$	$2{,}174 \cdot 10^5$
9,091	$4{,}359 \cdot 10^4$	$5{,}118 \cdot 10^4$	$5{,}650 \cdot 10^4$	$6{,}173 \cdot 10^4$	$6{,}684 \cdot 10^4$
4,000	$2{,}741 \cdot 10^4$	$3{,}219 \cdot 10^4$	$3{,}554 \cdot 10^4$	$3{,}883 \cdot 10^4$	$4{,}203 \cdot 10^4$
1,818	$2{,}048 \cdot 10^4$	$2{,}404 \cdot 10^4$	$2{,}655 \cdot 10^4$	$2{,}902 \cdot 10^4$	$3{,}141 \cdot 10^4$

Konstanty linearizované rovnice [12]

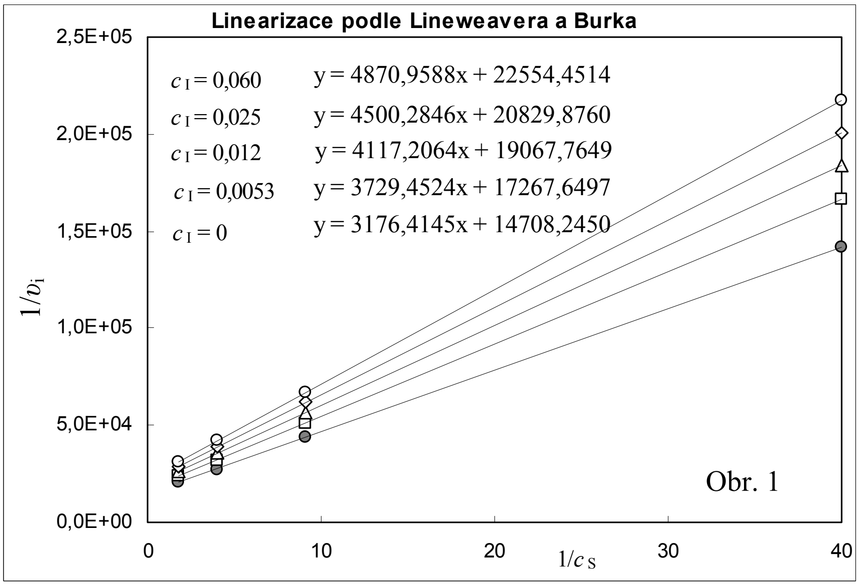
$$y = A\,x + B$$

$$A = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I + \beta \cdot c_I}$$

$$B = \frac{1}{v_{max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I + \beta \cdot c_I}$$

$$K'_M = K_M = A/B$$

$$v'_{max} = v_{max} \cdot \left(\frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I} \right) = \frac{1}{B}$$



Tabulka 2

c_I	úsek B	směrnice A	$K'_M = K_M$	v'_{max}
mol dm^{-3}	(mol dm^{-3} s^{-1})$^{-1}$	s	mol dm^{-3}	mol dm^{-3} s^{-1}
0	14708,245	3176,415	0,21596	$6{,}7989 \cdot 10^{-5}$
0,0053	17267,650	3729,452	0,21598	$5{,}7912 \cdot 10^{-5}$
0,012	19067,765	4117,206	0,21592	$5{,}2445 \cdot 10^{-5}$
0,025	20829,876	4500,285	0,21605	$4{,}8008 \cdot 10^{-5}$
0,06	22554,451	4870,959	0,21596	$4{,}4337 \cdot 10^{-5}$

Údaje v prvém řádku tabulky platí pro průběh enzymové reakce bez přítomnosti inhibitoru.

$v_{max} = 6{,}8 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} s^{-1}, $K_M = 0{,}216$ mol dm^{-3} ,

Konstanty K_I a β

vypočítáme z linearizovaného výrazu [11] pro v'_{max} :

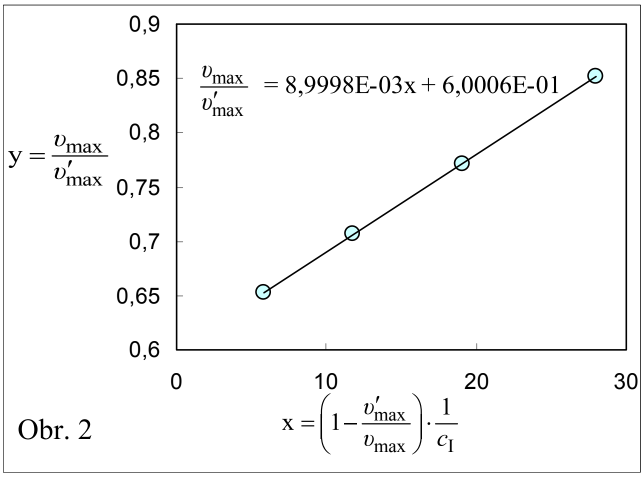
$$\underbrace{\frac{v'_{max}}{v_{max}}}_{y} = \beta + K_I \cdot \underbrace{\left(1 - \frac{v'_{max}}{v_{max}}\right) \cdot \frac{1}{c_I}}_{x} \qquad [15]$$

Konstanta β je rovna úseku a konstanta K_I směrnici této lineární závislosti. Jejich hodnoty byly získány lineární regresí dat z tab. 3 (obr. 2):

$\beta = 0{,}6$, $K_I = 0{,}009$ mol dm^{-3}

Tabulka 3

c_I	$y = \frac{v_{max}}{v'_{max}}$	$x = \left(1 - \frac{v'_{max}}{v_{max}}\right)\cdot\frac{1}{c_I}$
0	1	
0,0053	0,8518	27,9660
0,012	0,7714	19,0527
0,025	0,7061	11,7555
0,06	0,6521	5,7980



Obr. 2

Pro závislost maximální rychlosti inhibované reakce na koncentraci inhibitoru pak platí

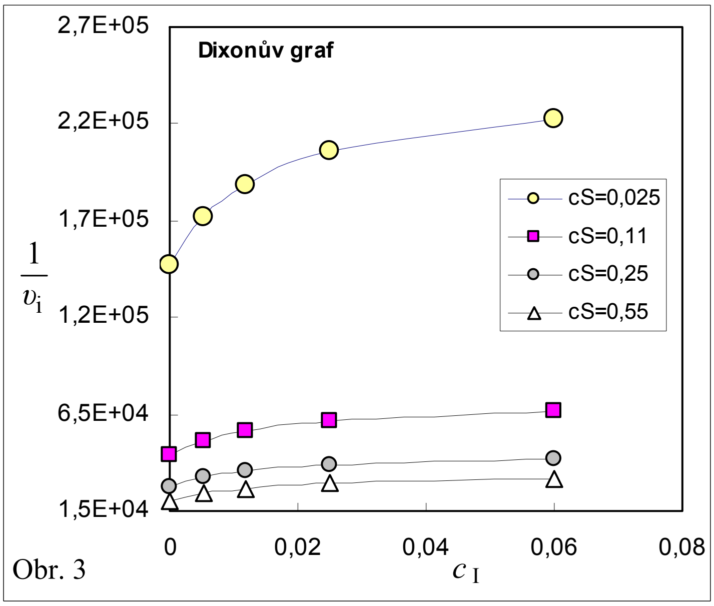
$$v'_{max} = 6,8\cdot10^{-5}\cdot\left(\frac{9\cdot10^{-3}+0,6\cdot c_I}{9\cdot10^{-3}+c_I}\right) = \frac{6,12\cdot10^{-7}+4,08\cdot10^{-5}\cdot c_I}{9\cdot10^{-3}+c_I} \qquad [16]$$

(d) Dixonův graf:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v'_{max}} + \frac{K'_M}{v'_{max}}\cdot\frac{1}{c_S} = \frac{1}{v_{max}}\cdot\frac{K_I+c_I}{K_I+\beta\cdot c_I} + \frac{K_M}{v_{max}}\cdot\frac{K_I+c_I}{K_I+\beta\cdot c_I}\cdot\frac{1}{c_S}$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{(K_M+c_S)\cdot(K_I+c_I)}{v_{max}\cdot c_S\cdot(K_I+\beta\cdot c_I)} \qquad [17]$$

Na obr. 3 jsou vyneseny hodnoty $1/v_i$ proti koncentraci inhibitoru (viz tab. 1). Závislost má hyperbolický průběh (pro plně nekompetitivní inhibici by byla lineární)



Obr. 3

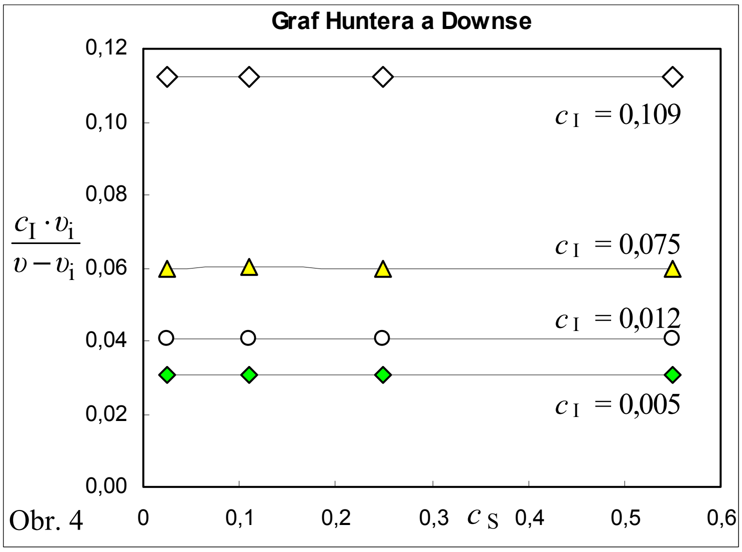
Graf podle Huntera a Downse:

$$\frac{c_I\cdot v_i}{v-v_i} = \frac{c_I\cdot\frac{K_I+\beta\cdot c_I}{K_I+c_I}\cdot\frac{v_{max}\cdot c_S}{K_M+c_S}}{(K_M+c_S)\cdot\left(\frac{v_{max}\cdot c_S}{K_M+c_S} - \frac{K_I+\beta\cdot c_I}{K_I+c_I}\cdot\frac{v_{max}\cdot c_S}{K_M+c_S}\right)} = \frac{K_I+\beta\cdot c_I}{1-\beta} \qquad [18]$$

Výraz $\frac{c_\mathrm{I}\cdot v_\mathrm{i}}{v-v_\mathrm{i}}$ nezávisí na c_S. Jak ukazuje obr. 4, rovnice [18] dobře vyhovuje experimentálním datům.

Tabulka 4

	$\frac{c_\mathrm{I}\cdot v_\mathrm{i}}{v-v_\mathrm{i}}$			
c_S	$c_\mathrm{I}=0{,}0053$	$c_\mathrm{I}=0{,}012$	$c_\mathrm{I}=0{,}025$	$c_\mathrm{I}=0{,}060$
0,025	$3{,}044\cdot10^{-2}$	$4{,}051\cdot10^{-2}$	$5{,}999\cdot10^{-2}$	$1{,}125\cdot10^{-1}$
0,11	$3{,}046\cdot10^{-2}$	$4{,}053\cdot10^{-2}$	$6{,}009\cdot10^{-2}$	$1{,}125\cdot10^{-1}$
0,25	$3{,}044\cdot10^{-2}$	$4{,}049\cdot10^{-2}$	$6{,}000\cdot10^{-2}$	$1{,}125\cdot10^{-1}$
0,55	$3{,}045\cdot10^{-2}$	$4{,}046\cdot10^{-2}$	$5{,}995\cdot10^{-2}$	$1{,}124\cdot10^{-1}$



Obr. 4