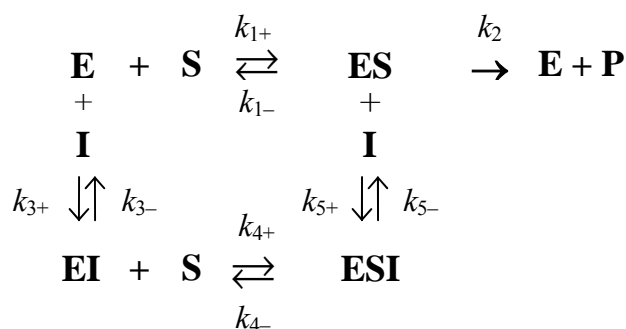


Úloha 9-18 Inhibice enzymových reakcí – plně nekompetitivní inhibice

Enzymová reakce probíhá za přítomnosti inhibitoru podle následujícího schématu:



- (a) Odvodte vztah pro rychlost inhibované reakce. Jak ovlivňuje tato plně nekompetitivní inhibice hodnoty parametrů K_M a v_{\max} v porovnání s neinhibovanou enzymatickou reakcí?
- (b) Odvodte linearizované tvary rychlostní rovnice podle (i) Lineweavera a Burka, (ii) Hanese, (iii) Eadiea a vypočítejte hodnoty kinetických parametrů K_M , v_{\max} , K'_M , v'_{\max} a K_I .
- (c) Pomocí závislostí podle (i) Dixona, (ii) Huntera a Downse ukažte jak lze rozlišit plnou a částečnou kompetitivní inhibici.

c_S mol dm ⁻³	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$				
	$c_I = 0$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,01$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,02$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,03$ mol dm ⁻³	$c_I = 0,04$ mol dm ⁻³
0,026	$4,514 \cdot 10^{-7}$	$2,138 \cdot 10^{-7}$	$1,401 \cdot 10^{-7}$	$1,042 \cdot 10^{-7}$	$8,291 \cdot 10^{-8}$
0,108	$1,459 \cdot 10^{-6}$	$6,913 \cdot 10^{-7}$	$4,529 \cdot 10^{-7}$	$3,368 \cdot 10^{-7}$	$2,681 \cdot 10^{-7}$
0,340	$2,824 \cdot 10^{-6}$	$1,338 \cdot 10^{-6}$	$8,764 \cdot 10^{-7}$	$6,517 \cdot 10^{-7}$	$5,187 \cdot 10^{-7}$
0,570	$3,425 \cdot 10^{-6}$	$1,623 \cdot 10^{-6}$	$1,063 \cdot 10^{-6}$	$7,905 \cdot 10^{-7}$	$6,292 \cdot 10^{-7}$

Řešení:

Při **plně nekompetitivní inhibici**

- (a) Z uvedeného schématu plyne, že pro rychlost inhibované reakce platí

$$v_i = k_2 \cdot c_{\text{ES}} \quad [1]$$

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

$$K_S \left(= \frac{k_{1-}}{k_{1+}} \right) = K_M = \frac{c_E \cdot c_S}{c_{\text{ES}}} \Rightarrow c_{\text{ES}} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \quad [2]$$

Pro koncentraci volného enzymu c_E platí bilance

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

Za koncentraci komplexu EI dosadíme z disociační konstanty K_I :

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

Koncentraci komplexu ESI vyjádříme z disociační konstanty $K'_S (= K_S)$:

$$K'_S \left(= \frac{k_{4-}}{k_{4+}} \right) = K_S = K_M = \frac{c_{\text{EI}} \cdot c_S}{c_{\text{ESI}}} \Rightarrow c_{\text{ESI}} = \frac{c_{\text{EI}} \cdot c_S}{K_M} = \frac{c_E \cdot c_I \cdot c_S}{K_I \cdot K_M} \quad [5]$$

nebo $K_I' (= K_I)$:

$$K_I' \left(= \frac{k_{5-}}{k_{5+}} \right) = K_I \left(= \frac{k_{3-}}{k_{3+}} \right) = \frac{c_{ES} \cdot c_I}{c_{ESI}} \Rightarrow c_{ESI} = \frac{c_{ES} \cdot c_S}{K_I} = \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K_I} \quad [6]$$

Po dosazení z rovnic [2], [4] a [5] do [3]

$$c_{E0} = c_E + \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} + \frac{c_E \cdot c_I}{K_I} + \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K_I} \quad [7]$$

$$c_E = \frac{c_{E0}}{1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I} + \frac{c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K_I}} \quad [8]$$

Kombinací rovnic [1], [2] a [8] dostaneme výraz pro rychlost inhibované reakce

$$v_i = k_2 \cdot \frac{c_{E0}}{1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I} + \frac{c_S \cdot c_I}{K_M \cdot K_I}} \cdot \frac{c_S}{K_M} = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_I} \right) + c_S \left(1 + \frac{c_I}{K_I} \right)} \quad [9]$$

který upravíme do tvaru rovnice Michaelise a Mentenové pro neinhibovanou reakci:

$$v_i = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I} \cdot c_S}{K_M + c_S} = \frac{v'_{\max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \quad [10]$$

Mezi parametry inhibované a neinhibované reakce tedy platí

$$K'_M = K_M \quad [11]$$

$$v'_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I} = v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I} \quad [12]$$

Hodnota Michaelisovy konstanty není tímto typem inhibice ovlivněna, je však snížena hodnota limitní rychlosti. Vazba inhibitoru tedy neovlivňuje vazbu substrátu, ale snižuje rychlost jeho přeměny na produkt. Z kinetického hlediska se systém chová tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru.

(b) Linearizace rychlostní rovnice

(i) podle Lineweavera a Burka

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

(ii) podle Hanese

$$\frac{c_S}{v_i} = \frac{K'_M}{v'_{\max}} + \frac{1}{v'_{\max}} \cdot c_S = \underbrace{\frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_I + c_I}{v_{\max} \cdot K_I}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S \quad [14]$$

(iii) podle Eadiea

$$v_i = v'_{\max} - K'_M \cdot \frac{v_i}{c_S} = \underbrace{v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I}}_{\text{úsek}} - \underbrace{K_M}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{v_i}{c_S} \quad [15]$$

Pro výpočet kinetických parametrů vyjdeme např. z linearizované rovnice podle Hanese:

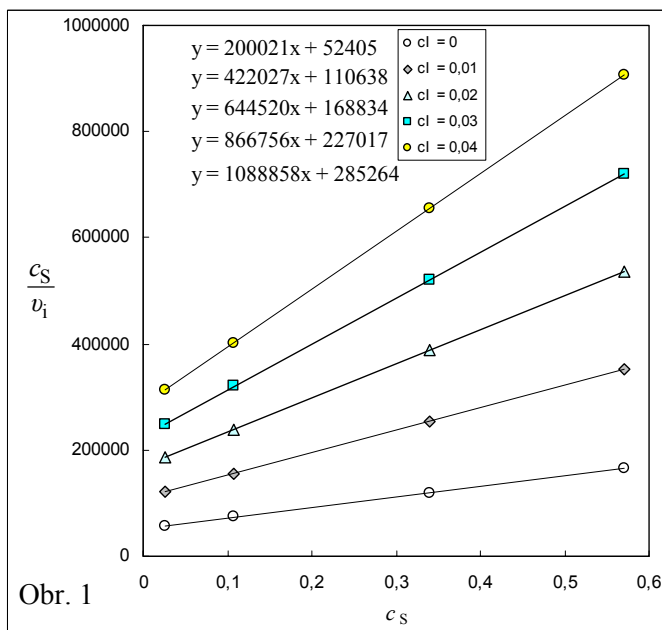
Tabulka 1

c_S	c_S / v				
	$c_I = 0$	$c_I = 0,01$	$c_I = 0,02$	$c_I = 0,03$	$c_I = 0,04$
0,026	$5,760 \cdot 10^4$	$1,216 \cdot 10^5$	$1,856 \cdot 10^5$	$2,495 \cdot 10^5$	$3,136 \cdot 10^5$
0,108	$7,402 \cdot 10^4$	$1,562 \cdot 10^5$	$2,385 \cdot 10^5$	$3,207 \cdot 10^5$	$4,028 \cdot 10^5$
0,340	$1,204 \cdot 10^5$	$2,541 \cdot 10^5$	$3,880 \cdot 10^5$	$5,217 \cdot 10^5$	$6,555 \cdot 10^5$
0,570	$1,664 \cdot 10^5$	$3,512 \cdot 10^5$	$5,362 \cdot 10^5$	$7,211 \cdot 10^5$	$9,059 \cdot 10^5$

Tabulka 2 uvádí konstanty linearizované rychlostní rovnice [14]:

Tabulka 2

c_I	úsek	směrnice
	$\frac{K'_M}{v'_{\max}} =$	$\frac{1}{v'_{\max}} =$
	$\frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}$	$\frac{K_I + c_I}{v_{\max} \cdot K_I}$
0	52405	200021
0,01	110638	422027
0,02	168834	644520
0,03	227017	866756
0,04	285264	1088858



Obr. 1

Z údajů tabulky 2 vypočítáme hodnoty K'_M a v'_{\max} (tab. 3):

Tabulka 3

c_I	$v'_{\max} = \frac{1}{\text{úsek}}$	$K'_M = \frac{\text{úsek}}{\text{směrnice}}$
mol dm^{-3}	$\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$	mol dm^{-3}
0	$4,99948 \cdot 10^{-6}$	0,2620
0,01	$2,36952 \cdot 10^{-6}$	0,2622
0,02	$1,55154 \cdot 10^{-6}$	0,2620
0,03	$1,15373 \cdot 10^{-6}$	0,2619
0,04	$9,18393 \cdot 10^{-7}$	0,2620

Tabulka 4

c_I	$\frac{v_{\max}}{v'_{\max}}$
mol dm^{-3}	
0,00	1,0000
0,01	2,1099
0,02	3,2223
0,03	4,3333
0,04	5,4437

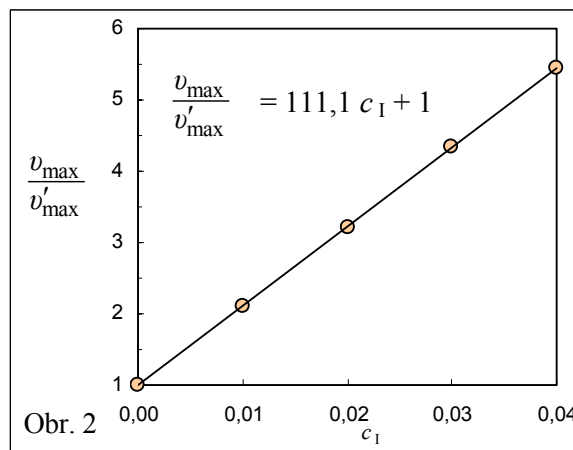
$$v_{\max} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}, K_M = 0,262 \text{ mol dm}^{-3}$$

Pro maximální rychlost inhibované reakce platí vztah [12], z něhož je možno po úpravě do lineárního tvaru stanovit konstantu K_I

$$\frac{v_{\max}}{v'_{\max}} = 1 + \frac{1}{K_I} \cdot c_I \quad [16]$$

$$\frac{1}{K_I} = 111,1 (\text{mol dm}^{-3})^{-1}$$

$$K_I = 9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$



Obr. 2

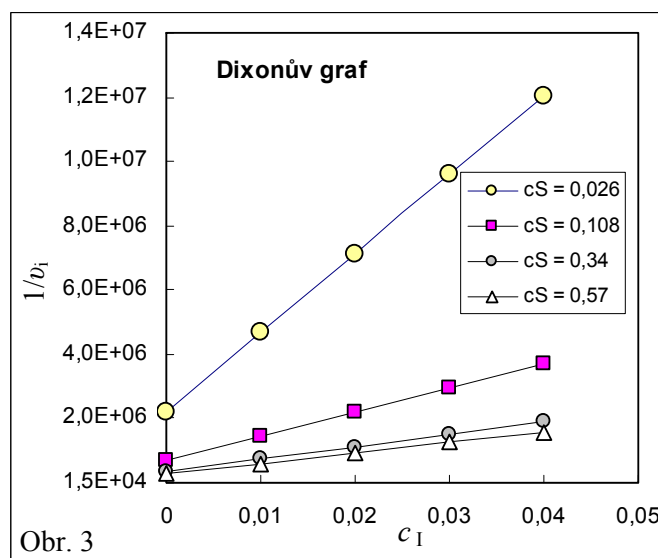
Pro maximální rychlost inhibované reakce podle rovnice [12] potom platí

$$v'_{\max} / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}) = 5 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{9 \cdot 10^{-3}}{9 \cdot 10^{-3} + c_I} = \frac{4,5 \cdot 10^{-9}}{9 \cdot 10^{-3} + c_I}$$

(c) Dixonův graf:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_I}{v_{\max} \cdot K_I} + \frac{c_I}{v_{\max} \cdot K_I} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \underbrace{\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{1}{v_{\max} \cdot K_I} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{směrnice}} \cdot c_I \quad [16]$$

Závislost $1/v_i$ na c_I za konstantní koncentrace substrátu je lineární. Tím se liší plná inhibice od částečně nekompetitivní inhibice, kde má tato závislost hyperbolický průběh (viz Úloha 9-19)



(ii) Graf podle Huntera a Downse: $\frac{c_I - v_i}{v - v_i}$ proti c_S

$$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} = c_I \cdot \frac{\frac{v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I} \cdot c_S}{K_M + c_S}}{\frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} - \frac{v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I} \cdot c_S}{K_M + c_S}} = c_I \cdot \frac{\frac{K_I}{K_I + c_I}}{1 - \frac{K_I}{K_I + c_I}} = c_I \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I - K_I} = K_I \quad [17]$$

V obou případech, pro plnou i částečnou inhibici (viz Úloha 9-19) je hodnota výrazu $\frac{c_I - v_i}{v - v_i}$ konstantní.

U plné inhibice (obr. 4), na rozdíl od inhibice částečné není ani funkcí koncentrace inhibitoru.

