Úloha 9-17 Inhibice enzymových reakcí – částečně kompetitivní inhibice

Pro jistou enzymovou reakci bylo navrženo schema

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

které popisuje částečně kompetitivní inhibici.

(a) Odvoďte vztah pro rychlost této inhibované reakce a porovnejte výrazy pro zdánlivé konstanty K'_M a v'_max s K_M a v_max neinhibované reakce

(b) Odvoďte linerizované výrazy
(i) podle Lineweavera a Burka, (ii) podle Hanese, (iii) podle Eadiea.

(c) Z hodnot počátečních rychlostí, naměřených při různých koncentracích substrátu a inhibitoru:

$\dfrac{c_\mathrm{S}}{\text{mol dm}^{-3}}$	$10^5\, v_\mathrm{i}$ / (mol dm^{-3} s^{-1})				
	$\dfrac{c_\mathrm{I}=0}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I}=0{,}013}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I}=0{,}027}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I}=0{,}075}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I}=0{,}109}{\text{mol dm}^{-3}}$
0,012	5,778	4,841	4,785	4,749	4,733
0,090	6,393	6,216	6,204	6,195	6,192
0,260	6,463	6,399	6,394	6,391	6,390
0,380	6,474	6,430	6,427	6,425	6,424

stanovte hodnoty konstant v rychlostní rovnici.

(d) Sestrojte graf (i) podle Dixona, (ii) podle Huntera a Downse. Jak rozlišíme plně kompetitivní inhibici od částečně kompetitivní?

Řešení:

(a) Při ***částečně* kompetitivní inhibici** se inhibitor, stejně jako při plně kompetitivní inhibici, váže na místo blízké vazebnému místu, ale vznikající komplex ESI se rozkládá na produkt a inaktivní komplex EI, v němž zůstává vázána část enzymu. Rychlostní konstanty rozpadu komplexů ES a ESI jsou stejné, $k_2 = k_6$. Protože vazba inhibitoru ovlivňuje vazbu substrátu, platí pro poměr disociačních konstant (označíme α)

$$\frac{K'_\mathrm{I}}{K_\mathrm{I}} = \frac{K'_\mathrm{S}}{K_\mathrm{S}} = \alpha > 1$$

Rychlost reakce je dána vztahem

$$v_\mathrm{i} = k_2 \cdot c_\mathrm{ES} + k_6 \cdot c_\mathrm{ESI} = k_2 \cdot (c_\mathrm{ES} + c_\mathrm{ESI}) \qquad [1]$$

Koncentraci komplexu ES lze vyjádřit ze vztahu pro disociační konstantu K_S $(= K_\mathrm{M})$:

$$K_\mathrm{S} = K_\mathrm{M} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{S}}{c_\mathrm{ES}} \quad \Rightarrow \quad c_\mathrm{ES} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{M}} \qquad [2]$$

Koncentraci volného enzymu c_E vyjádříme z bilance

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

kde koncentrace komplexu EI je dána disociační konstantou 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':

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

$$(K_S' = \alpha \cdot K_S = \alpha \cdot K_M)$$

nebo K_I':

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

$$(K_I' = \alpha \cdot K_I)$$

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

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

Pro *rychlost inhibované reakce* pak platí

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

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

Rovnici [8] upravíme do tvaru rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_i = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{K_M \left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha}\right) + c_S} = \frac{v_{max}' \cdot c_S}{K_M' + c_S} \qquad [9]$$

kde

$$K_M' = K_M \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha} \qquad [10]$$

$$v_{max}' = k_2 \cdot c_{E0} = v_{max} \qquad [11]$$

(b) Linearizace:

(i) podle Lineweavera a Burka

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

(ii) podle Hanese

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

(iii) podle Eadiea

$$v_i = v_{max}' - K_M' \cdot \frac{v_i}{c_S} = \underbrace{v_{max}}_{\text{úsek}} - \underbrace{K_M \cdot \left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha}\right)}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{v_i}{c_S} \qquad [14]$$

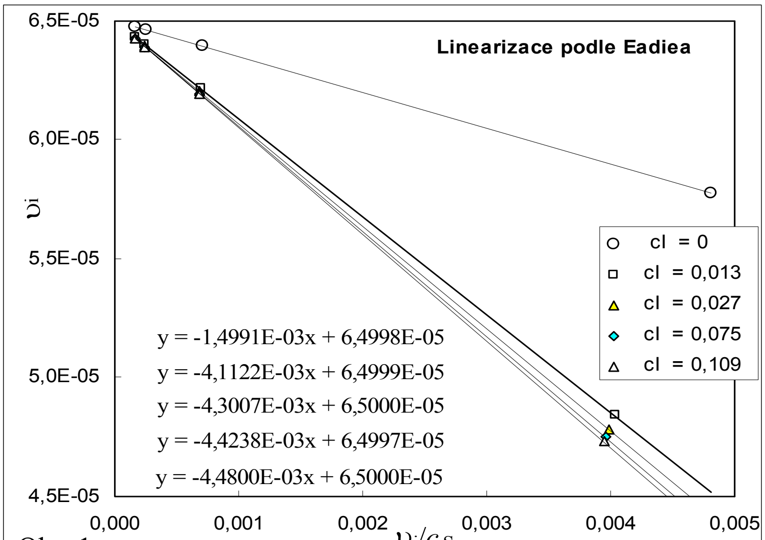
(c) Výpočet kinetických parametrů z linearizovaného tvaru podle Eadiea

Tabulka 1	c_S /(mol dm^{-3})	0,012	0,09	0,26	0,38
$c_I = 0$ mol dm^{-3}	υ_i/(mol dm^{-3} s^{-1})	$5{,}7780\cdot10^{-5}$	$6{,}3930\cdot10^{-5}$	$6{,}4630\cdot10^{-5}$	$6{,}4740\cdot10^{-5}$
	υ/c_S /(s^{-1})	$4{,}8150\cdot10^{-3}$	$7{,}1033\cdot10^{-4}$	$2{,}4858\cdot10^{-4}$	$1{,}7037\cdot10^{-4}$
$c_I = 0{,}013$ mol dm^{-3}	υ_i/(mol dm^{-3} s^{-1})	$4{,}8410\cdot10^{-5}$	$6{,}2160\cdot10^{-5}$	$6{,}3990\cdot10^{-5}$	$6{,}4300\cdot10^{-5}$
	υ_i/c_S /(s^{-1})	$4{,}0342\cdot10^{-3}$	$6{,}9067\cdot10^{-4}$	$2{,}4612\cdot10^{-4}$	$1{,}6921\cdot10^{-4}$
$c_I = 0{,}027$ mol dm^{-3}	υ_i/(mol dm^{-3} s^{-1})	$4{,}7850\cdot10^{-5}$	$6{,}2040\cdot10^{-5}$	$6{,}3940\cdot10^{-5}$	$6{,}4270\cdot10^{-5}$
	υ_i/c_S /(s^{-1})	$3{,}9875\cdot10^{-3}$	$6{,}8933\cdot10^{-4}$	$2{,}4592\cdot10^{-4}$	$1{,}6913\cdot10^{-4}$
$c_I = 0{,}075$ mol dm^{-3}	υ_i/(mol dm^{-3} s^{-1})	$4{,}7490\cdot10^{-5}$	$6{,}1950\cdot10^{-5}$	$6{,}3910\cdot10^{-5}$	$6{,}4250\cdot10^{-5}$
	υ_i/c_S /(s^{-1})	$3{,}9575\cdot10^{-3}$	$6{,}8833\cdot10^{-4}$	$2{,}4581\cdot10^{-4}$	$1{,}6908\cdot10^{-4}$
$c_I = 0{,}109$ mol dm^{-3}	υ_i/(mol dm^{-3} s^{-1})	$4{,}7330\cdot10^{-5}$	$6{,}1920\cdot10^{-5}$	$6{,}3900\cdot10^{-5}$	$6{,}4240\cdot10^{-5}$
	υ_i/c_S /(s^{-1})	$3{,}9442\cdot10^{-3}$	$6{,}8800\cdot10^{-4}$	$2{,}4577\cdot10^{-4}$	$1{,}6905\cdot10^{-4}$

Z dat v tab. 1 byly lineární regresí získány konstanty rovnice [14], které jsou rovny kinetickým parametrům:

Tabulka 2

c_I	úsek υ'_{max}	směrnice K'_M
mol dm^{-3}	mol dm^{-3} s^{-1}	mol dm^{-3}
0	$6{,}500\cdot10^{-5}$	$1{,}4991\cdot10^{-3}$
0,013	$6{,}500\cdot10^{-5}$	$4{,}1122\cdot10^{-3}$
0,027	$6{,}500\cdot10^{-5}$	$4{,}3007\cdot10^{-3}$
0,075	$6{,}500\cdot10^{-5}$	$4{,}4238\cdot10^{-3}$
0,109	$6{,}500\cdot10^{-5}$	$4{,}4800\cdot10^{-3}$



Obr. 1

Údaje v první řádce tab. 2 platí pro enzymovou reakci bez přítomnosti inhibitoru,

$\upsilon_{max} = 6{,}500\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} s^{-1} , $K_M = 1{,}4991\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3}

Konstanta K'_M je funkcí koncentrace inhibitoru (rovnice [10]). Jestliže upravíme tento vztah do lineárního tvaru,

$$\frac{K_M}{K'_M} = \frac{K_I/c_I + 1/\alpha}{K_I/c_I + 1}$$

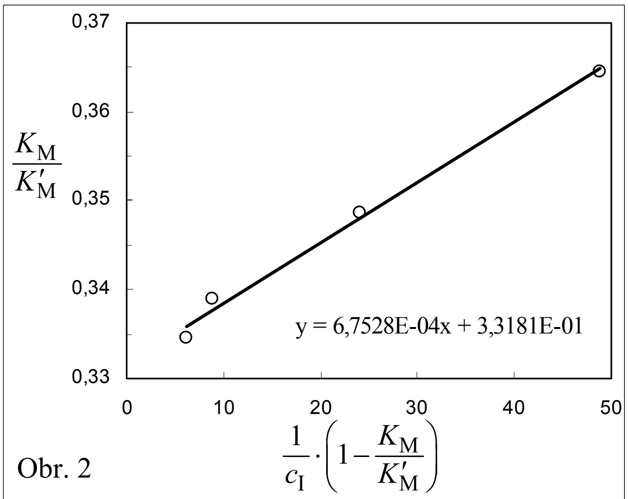
$$\frac{K_M}{K'_M}\cdot\frac{K_I}{c_I} + \frac{K_M}{K'_M} = \frac{K_I}{c_I} + \frac{1}{\alpha}$$

$$\frac{K_M}{K'_M} = \frac{1}{\alpha} + K_I\cdot\left[\frac{1}{c_I}\cdot\left(1 - \frac{K_M}{K'_M}\right)\right] \qquad [15]$$

můžeme ze závislosti poměru $\dfrac{K_M}{K'_M}$ na $\dfrac{1}{c_I}\cdot\left(1 - \dfrac{K_M}{K'_M}\right)$ vypočítat hodnoty konstant K_I a α:

Tabulka 3

$x = \frac{1}{c_I}\cdot\left(1-\frac{K_M}{K'_M}\right)$	$y = \frac{K_M}{K'_M}$
48,8808	0,3645
24,1270	0,3486
8,8150	0,3389
6,1044	0,3346



Obr. 2

Lineární regresí získáme vztah

$$\frac{K_M}{K'_M} = 0{,}33181 + 6{,}7528\cdot 10^{-4}\cdot\left[\frac{1}{c_I}\cdot\left(1-\frac{K_M}{K'_M}\right)\right]$$

a jeho porovnáním s rovnicí [15] dostaneme

$$K_I = 6{,}7528\cdot 10^{-4}\ \mathrm{mol\ dm^{-3}} \quad \text{a} \quad 1/\alpha = 0{,}33181 \ \Rightarrow\ \alpha = 3{,}014$$

Ze známých hodnot K_M , K_I , a α vypočítáme hodnoty zbývajících kinetických parametrů:

$$K'_I = K_I\cdot\alpha = 6{,}7528\cdot 10^{-4}\cdot 3{,}014 = 2{,}0351\cdot 10^{-3}\ \mathrm{mol\ dm^{-3}}$$

$$K'_S = K_S\cdot\alpha = K_M\cdot\alpha = 1{,}4991\cdot 10^{-3}\cdot 3{,}014 = 4{,}5179\cdot 10^{-3}\ \mathrm{mol\ dm^{-3}}$$

$$(K_S = K_M)$$

a závislost zdánlivých kinetických parametrů inhibované reakce na koncentraci inhibitoru (rovnice [10] a [11]):

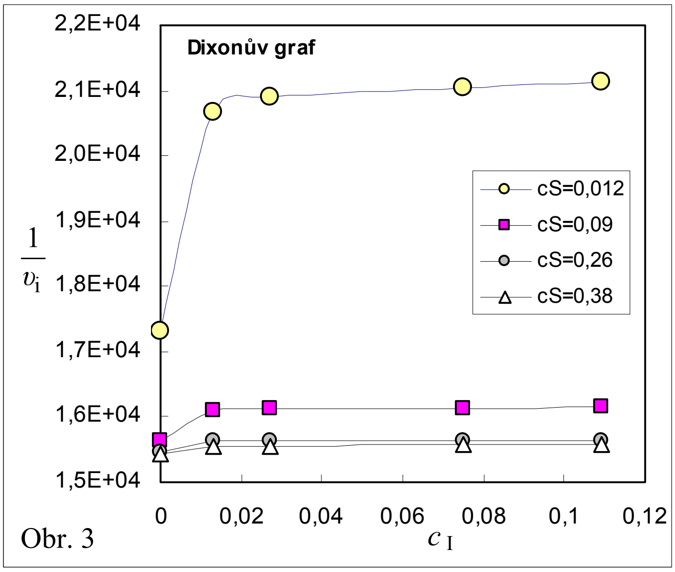
$$K'_M = 1{,}4991\cdot 10^{-3}\cdot\frac{6{,}7528\cdot 10^{-4}+c_I}{6{,}7528\cdot 10^{-4}+c_I/3{,}014} = 4{,}5183\cdot 10^{-3}\cdot\frac{6{,}7528\cdot 10^{-4}+c_I}{2{,}0353\cdot 10^{-3}+c_I}$$

$$\upsilon'_{max} = \upsilon_{max}$$

(d) (i) Dixonův graf

$$\frac{1}{\upsilon_i} = \frac{1}{\upsilon'_{max}} + \frac{K'_M}{\upsilon'_{max}}\cdot\frac{1}{c_S} = \frac{1}{\upsilon_{max}} + \frac{K_M}{\upsilon_{max}}\cdot\frac{1}{c_S}\cdot\frac{K_I+c_I}{K_I+c_I/\alpha} \qquad [16]$$

závislost $1/\upsilon_i$ na c_I za konstantní koncentrace substrátu -je nelineární – tím lze rozlišit částečně kompetitivní inhibici od inhibice plné, jejíž Dixonův graf je lineární (viz Úloha 9-16).



Obr. 3

(ii) Graf podle Huntera a Downse - je lineární, stejně jako u plně kompetitivní inhibice (viz úlohu 9-16):

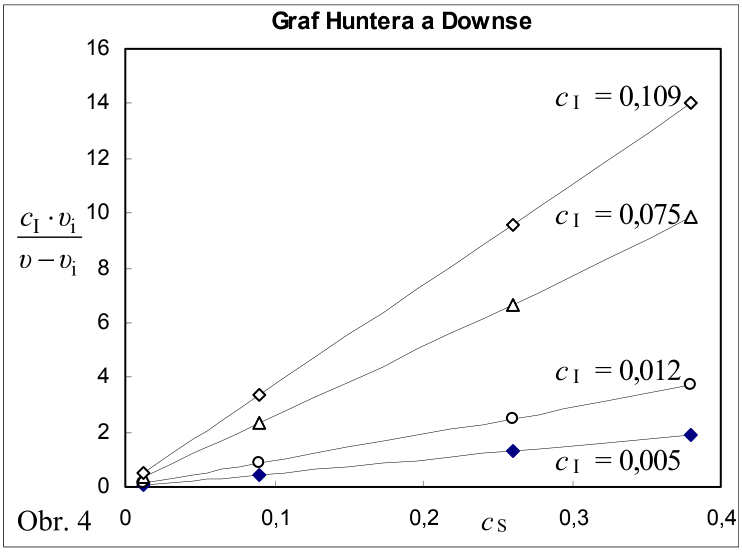
$$\frac{c_\mathrm{I}\cdot v_\mathrm{i}}{v-v_\mathrm{i}}=\frac{c_\mathrm{I}\cdot\dfrac{v_{\max}\cdot c_\mathrm{S}\cdot(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)}{K_\mathrm{M}\cdot K_\mathrm{I}+K_\mathrm{M}\cdot c_\mathrm{I}+K_\mathrm{I}\cdot c_\mathrm{S}+c_\mathrm{S}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha}}{\dfrac{v_{\max}\cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S}}-\dfrac{v_{\max}\cdot c_\mathrm{S}\cdot(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)}{K_\mathrm{M}\cdot K_\mathrm{I}+K_\mathrm{M}\cdot c_\mathrm{I}+K_\mathrm{I}\cdot c_\mathrm{S}+c_\mathrm{S}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha}}$$

$$=\frac{c_\mathrm{I}\cdot(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}{K_\mathrm{M}\cdot K_\mathrm{I}+K_\mathrm{M}\cdot c_\mathrm{I}+K_\mathrm{I}\cdot c_\mathrm{S}+c_\mathrm{S}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha-(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}$$

$$=\frac{c_\mathrm{I}\cdot(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}{\cancel{K_\mathrm{M}\cdot K_\mathrm{I}}+K_\mathrm{M}\cdot c_\mathrm{I}+\cancel{K_\mathrm{I}\cdot c_\mathrm{S}}+\cancel{c_\mathrm{S}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha}-\cancel{K_\mathrm{I}\cdot K_\mathrm{M}}-K_\mathrm{M}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha-\cancel{K_\mathrm{I}\cdot c_\mathrm{S}}-\cancel{c_\mathrm{S}\cdot c_\mathrm{I}/\alpha}}$$

$$=\frac{\cancel{c_\mathrm{I}}\cdot(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}{K_\mathrm{M}\cdot\cancel{c_\mathrm{I}}-K_\mathrm{M}\cdot\cancel{c_\mathrm{I}}/\alpha}=\frac{(K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I}/\alpha)\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}{K_\mathrm{M}\cdot(1-1/\alpha)}=\frac{(\alpha\cdot K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I})\cdot(K_\mathrm{M}+c_\mathrm{S})}{K_\mathrm{M}\cdot(\alpha-1)}$$

$$\frac{c_\mathrm{I}\cdot v_\mathrm{i}}{v-v_\mathrm{i}}=\underbrace{\frac{(\alpha\cdot K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I})}{(\alpha-1)}}_{\text{úsek}}+\underbrace{\frac{(\alpha\cdot K_\mathrm{I}+c_\mathrm{I})}{K_\mathrm{M}\cdot(\alpha-1)}}_{\text{směrnice}}\cdot c_\mathrm{S}\qquad[17]$$



Obr. 4