9-15 Inhibice enzymových reakcí – smíšená inhibice

Příkladem typicky smíšené inhibice je případ, kdy v systému dochází k těmto dílčím reakcím:

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{1-}}{\overset{k_{1+}}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{P} + \mathrm{E} \qquad K_\mathrm{S} = \frac{k_{1-}}{k_{1+}}$$

$$\mathrm{E} + \mathrm{I} \underset{k_{3-}}{\overset{k_{3+}}{\rightleftarrows}} \mathrm{EI} \qquad K_\mathrm{I} = \frac{k_{3-}}{k_{3+}}$$

$$\mathrm{EI} + \mathrm{S} \underset{k_{3-}}{\overset{k_{3+}}{\rightleftarrows}} \mathrm{ESI} \qquad K_\mathrm{S}' = \frac{k_{4-}}{k_{4+}}$$

$$\mathrm{ES} + \mathrm{I} \underset{k_{3-}}{\overset{k_{3+}}{\rightleftarrows}} \mathrm{ESI} \qquad K_\mathrm{I}' = \frac{k_{5-}}{k_{5+}}$$

Od plně nekompetitivní inhibice se toto schema liší v tom, že platí

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

Najděte výraz pro rychlost inhibované reakce. Použijte experimentálních dat uvedených v následující tabulce ke stanovení hodnot všech konstant v rychlostní rovnici. Nakreslete Dixonův graf a graf podle Huntera a Downse.

$\dfrac{c_\mathrm{S}}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$	$10^5\, v_\mathrm{i}$ / (mol dm^{-3} s^{-1})				
	$\dfrac{c_\mathrm{I} = 0}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I} = 0{,}005}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I} = 0{,}012}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I} = 0{,}017}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$	$\dfrac{c_\mathrm{I} = 0{,}025}{\mathrm{mol\ dm^{-3}}}$
0,008	4,870	2,804	1,759	1,389	1,040
0,025	6,140	3,588	2,268	1,796	1,347
0,050	6,542	3,840	2,433	1,929	1,448
0,080	6,707	3,944	2,502	1,984	1,490

Řešení:

Při odvození výrazu pro *rychlost inhibované reakce* předpokládáme, že mezi substrátem, enzymem a inhibitorem se rychle ustavuje rovnováha a rychlost reakce je dána vztahem

$$v_\mathrm{i} = k_2 \cdot c_\mathrm{ES} \qquad [1]$$

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

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

Koncentraci volného enzymu c_E vyjádříme z bilance

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

Koncentrace komplexu EI – z disociační konstanty K_I:

$$K_\mathrm{I} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{I}}{c_\mathrm{EI}} \quad \Rightarrow \quad c_\mathrm{EI} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{I}}{K_\mathrm{I}} \qquad [4]$$

Koncentrace komplexu ESI – z disociační konstanty K_S':

$$K_\mathrm{S}' = \frac{c_\mathrm{EI} \cdot c_\mathrm{S}}{c_\mathrm{ESI}} \quad \Rightarrow \quad c_\mathrm{ESI} = \frac{c_\mathrm{EI} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{S}'} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{I} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{I} \cdot \alpha \cdot K_\mathrm{M}} \qquad [5]$$

$$(K_\mathrm{S}' = \alpha \cdot K_\mathrm{S},\; K_\mathrm{S} = K_\mathrm{M})$$

nebo K_I':

$$K_\mathrm{I}' = \frac{c_\mathrm{ES} \cdot c_\mathrm{I}}{c_\mathrm{ESI}} \quad \Rightarrow \quad c_\mathrm{ESI} = \frac{c_\mathrm{ES} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{I}'} = \frac{c_\mathrm{E} \cdot c_\mathrm{S} \cdot c_\mathrm{I}}{K_\mathrm{M} \cdot \alpha \cdot K_\mathrm{I}} \qquad [6]$$

$$(K_\mathrm{I}' = \alpha \cdot K_\mathrm{I})$$

Z rovnic [4] až [6] dosadíme do bilance [3], z níž dostaneme 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

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

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

$$\upsilon_i = \frac{\upsilon'_{max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \qquad [9]$$

$$\upsilon_i = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{K_M\left(\frac{K_I + c_I}{K_I}\right) + c_S\left(\frac{K_I \cdot \alpha + c_I}{K_I \cdot \alpha}\right)} = k_2 \cdot c_{E0} \frac{K_I}{K_I + c_I/\alpha} \cdot \frac{c_S}{K_M\left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I/\alpha}\right) + c_S} \qquad [10]$$

Porovnáním rovnic [9] a [10] dostaneme pro parametry inhibované enzymové reakce

$$\upsilon'_{max} = \underbrace{k_2 \cdot c_{E0}}_{\upsilon_{max}} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I/\alpha} \qquad [11]$$

$$K'_M = K_M \cdot \left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I/\alpha}\right) \qquad [12]$$

Linearizace:

1. podle Lineweavera a Burka

$$\frac{1}{\upsilon_i} = \frac{1}{\upsilon'_{max}} + \frac{K'_M}{\upsilon'_{max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \underbrace{\frac{K_I + c_I/\alpha}{\upsilon_{max} \cdot K_I}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_M}{\upsilon_{max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{1}{c_S} \qquad [13]$$

2. podle Hanese

$$\frac{c_S}{\upsilon_i} = \frac{K'_M}{\upsilon'_{max}} + \frac{1}{\upsilon'_{max}} \cdot c_S = \underbrace{\frac{K_M}{\upsilon_{max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_I + c_I/\alpha}{\upsilon_{max} \cdot K_I}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S \qquad [14]$$

3. podle Eadiea

$$\upsilon_i = \upsilon'_{max} - K'_M \cdot \frac{\upsilon_i}{c_S} = \underbrace{\upsilon_{max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I/\alpha}}_{\text{úsek}} - \underbrace{K_M \cdot \left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I/\alpha}\right)}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{\upsilon_i}{c_S} \qquad [15]$$

Zpracování experimentálních dat linearizací podle Lineweavera a Burka

Tabulka 1

	$1/\upsilon$				
$1/c_S$	$c_I = 0$	$c_I = 0{,}005$	$c_I = 0{,}012$	$c_I = 0{,}017$	$c_I = 0{,}025$
125	$2{,}053 \cdot 10^4$	$3{,}566 \cdot 10^4$	$5{,}685 \cdot 10^4$	$7{,}199 \cdot 10^4$	$9{,}615 \cdot 10^4$
40	$1{,}629 \cdot 10^4$	$2{,}787 \cdot 10^4$	$4{,}409 \cdot 10^4$	$5{,}568 \cdot 10^4$	$7{,}424 \cdot 10^4$
20	$1{,}529 \cdot 10^4$	$2{,}604 \cdot 10^4$	$4{,}110 \cdot 10^4$	$5{,}184 \cdot 10^4$	$6{,}906 \cdot 10^4$
12,5	$1{,}491 \cdot 10^4$	$2{,}535 \cdot 10^4$	$3{,}997 \cdot 10^4$	$5{,}040 \cdot 10^4$	$6{,}711 \cdot 10^4$

Z hodnot směrnic a úseků závislosti [13], získaných lineární regresí dat z tab. 1 vypočteme kinetické parametry.

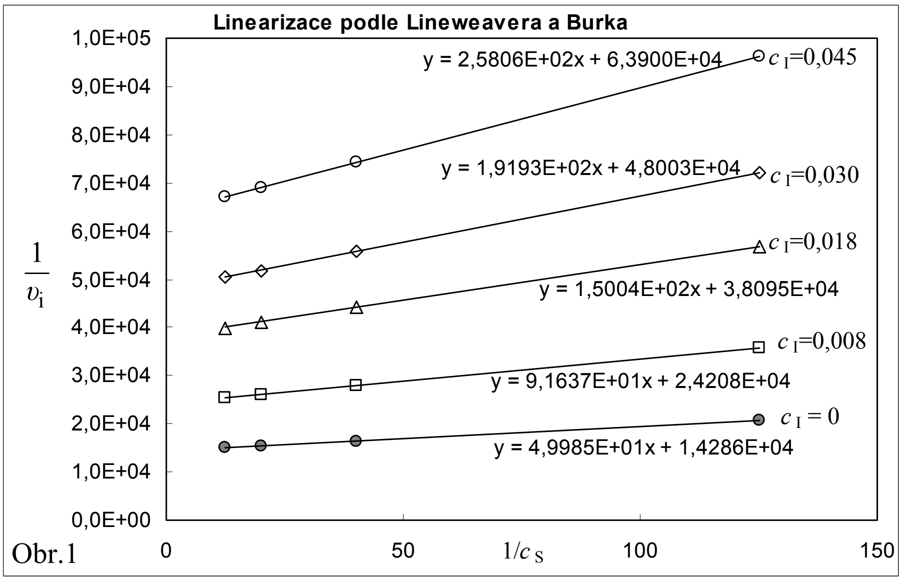
V lineárních závislostech (viz obr. 1)

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

jsou

$$B = \frac{K'_M}{\upsilon'_{max}} = \frac{K_M}{\upsilon_{max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}$$

$$A = \frac{1}{\upsilon'_{max}} = \frac{K_I + c_I/\alpha}{\upsilon_{max} \cdot K_I}$$



Obr.1

Tabulka 2

c_I	A	B	$\upsilon'_{max} = 1/A$	$K'_M = B \cdot \upsilon'_{max}$
mol dm^{-3}	(mol dm^{-3} s^{-1})$^{-1}$	s	mol dm^{-3} s^{-1}	mol dm^{-3}
0	49,985	14286	$6{,}99986 \cdot 10^{-5}$	0,00349888
0,005	91,637	24208	$4{,}13087 \cdot 10^{-5}$	0,003785402
0,012	150,04	38095	$2{,}62502 \cdot 10^{-5}$	0,003938575
0,017	191,93	48003	$2{,}0832 \cdot 10^{-5}$	0,003998292
0,025	258,06	63900	$1{,}56495 \cdot 10^{-5}$	0,004038498

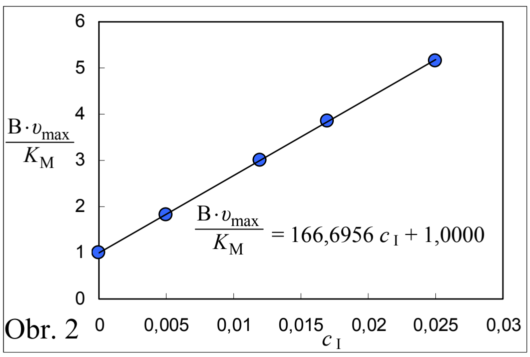
První řádek tabulky uvádí hodnoty pro enzymovou reakci bez přítomnosti inhibitoru:

$$\upsilon_{max} = 7 \cdot 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}\ \text{s}^{-1} \quad \text{a} \quad K_M = 0{,}0035\ \text{mol dm}^{-3}$$

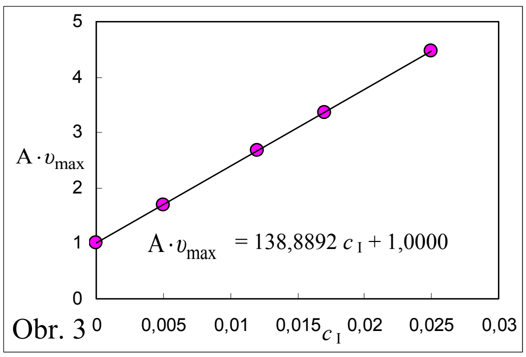
A i B jsou lineárními funkcemi koncentrace inhibitoru, což umožňuje stanovit hodnoty konstant K_I. Obě rovnice upravíme do vhodnějších tvarů (tab. 3) :

Tabulka 3

c_I	$\frac{B \cdot \upsilon_{max}}{K_M} = 1 + \frac{1}{K_I} \cdot c_I$ (obr. 2)	$A \cdot \upsilon_{max} = 1 + \frac{1}{\alpha \cdot K_I} c_I$ (obr. 3)
0	1	1
0,005	1,8333	1,6945
0,012	3,0017	2,6666
0,017	3,8397	3,3601
0,025	5,1627	4,4729



Obr. 2



Obr. 3

Pro konstantu K_I platí (viz tab. 3 a obr. 2)

$$\frac{1}{K_I} = 166{,}6956 \quad \Rightarrow \quad K_I = 0{,}006 \text{ mol dm}^{-3}$$

a pro konstantu α

$$\frac{1}{\alpha \cdot K_I} = 138{,}8892 \quad \Rightarrow \quad \alpha = \frac{1}{138{,}8892 \cdot 0{,}006} = 1{,}2$$

Pro závislost v'_{max} a K'_M na koncentraci inhibitoru dostaneme po dosazení za K'_I a α do rovnic [11] a [12]

$$v'_{max} = 7 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{6 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3} + c_I / 1{,}2} = \frac{5{,}04 \cdot 10^{-7}}{7{,}2 \cdot 10^{-3} + c_I}$$

$$K'_M = 3{,}5 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{6 \cdot 10^{-3} + c_I}{6 \cdot 10^{-3} + c_I / 1{,}2} \right) = 4{,}2 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{6 \cdot 10^{-3} + c_I}{7{,}2 \cdot 10^{-3} + c_I} \right)$$

A protože pro konstanty K'_S a K'_I platí

$$\frac{K'_I}{K_I} = \frac{K'_S}{K_S} = \alpha \ ,$$

dostaneme

$$K'_I = \alpha \cdot K_I = 1{,}2 \cdot 0{,}006 = 0{,}0072 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$K'_S = \alpha \cdot K_S = \alpha \cdot K_M = 1{,}2 \cdot 0{,}0035 = 0{,}0042 \text{ mol dm}^{-3}$$

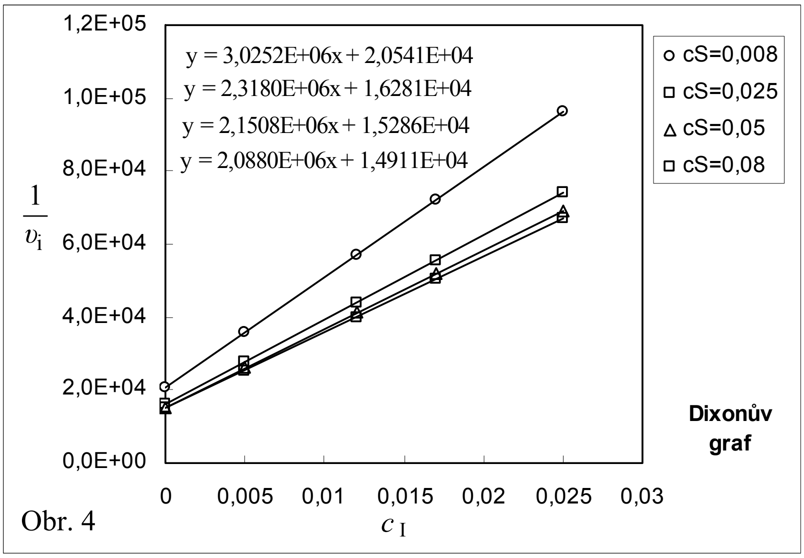
Dixonův graf:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max} \cdot K_I \cdot \alpha} \cdot c_I + \frac{K_M}{v_{max} \cdot c_S} + \frac{K_M}{v_{max} \cdot c_S \cdot K_I} \cdot c_I$$

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

Ze směrnic jednotlivých přímek pro konstantní c_S,
$y = C \cdot x + D$
lze podle rovnice [16] rovněž zjistit hodnoty K_I a α
Směrnice C je lineárně závislá na $1/c_S$ (viz obr. 5)

$$C = \frac{1}{v_{max} \cdot K_I \cdot \alpha} + \frac{K_M}{v_{max} \cdot K_I} \cdot \frac{1}{c_S}$$



Obr. 4

Tabulka 4

$1/c_S$	C
125	$3{,}0252 \cdot 10^6$
40	$2{,}3180 \cdot 10^6$
20	$2{,}1508 \cdot 10^6$
12,5	$2{,}0880 \cdot 10^6$

lineární regresí:

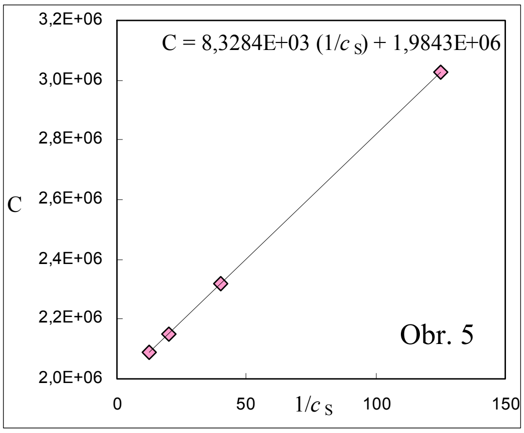
$C = 8{,}3284\cdot10^3\ (1/c_S) + 1{,}9843\cdot10^6$

$$\frac{K_M}{v_{max}\cdot K_I} = 8{,}3284\cdot10^3$$

$$K_I = \frac{3{,}5\cdot10^{-3}}{7\cdot10^{-5}\cdot 8{,}3284\cdot10^3} = 0{,}006\ \text{mol dm}^{-3}$$

$$\frac{1}{v_{max}\cdot K_I\cdot\alpha} = 1{,}9843\cdot10^6$$

$$\alpha = \frac{1}{7\cdot10^{-5}\cdot 0{,}006\cdot 1{,}9843\cdot10^6} = 1{,}2$$



Obr. 5

Graf podle Huntera a Downse – je nelineární:

$$\frac{c_I\cdot v_i}{v-v_i} = \frac{c_I\cdot\dfrac{v_{max}\cdot c_S\cdot K_I}{K_M\cdot K_I + K_M\cdot c_I + K_I\cdot c_S + c_S\cdot c_I/\alpha}}{\dfrac{v_{max}\cdot c_S}{K_M + c_S} - \dfrac{v_{max}\cdot c_S\cdot K_I}{K_M\cdot K_I + K_M\cdot c_I + K_I\cdot c_S + c_S\cdot c_I/\alpha}}$$

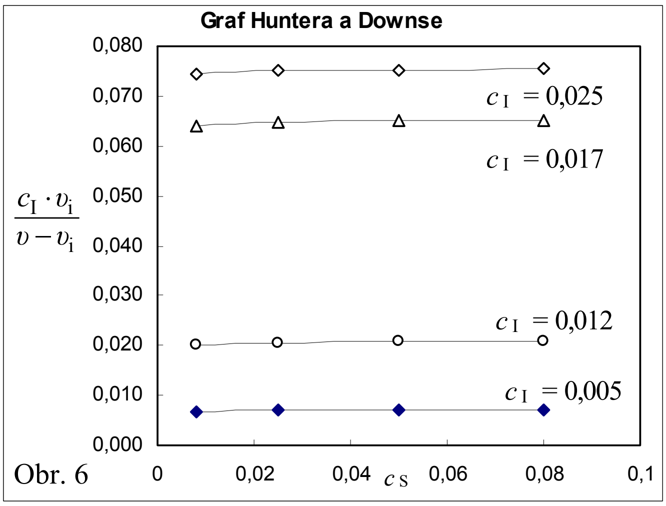
$$= \frac{\cancel{c_I}\cdot\dfrac{K_I}{\cancel{(K_M\cdot K_I + K_M\cdot c_I + K_I\cdot c_S + c_S\cdot c_I/\alpha)}}}{\dfrac{\cancel{K_M\cdot K_I} + K_M\cdot\cancel{c_I} + \cancel{K_I\cdot c_S} + c_S\cdot\cancel{c_I}/\alpha - \cancel{K_M\cdot K_I} - \cancel{K_I\cdot c_S}}{(K_M + c_S)\cdot\cancel{(K_M\cdot K_I + K_M\cdot c_I + K_I\cdot c_S + c_S\cdot c_I/\alpha)}}}$$

$$\frac{c_I\cdot v_i}{v-v_i} = \frac{c_I\cdot K_I\cdot(K_M + c_S)}{K_M + c_S/\alpha} \qquad [17]$$

Závislost $\dfrac{c_I\cdot v_i}{v-v_i}$ na koncentraci substrátu, daná rovnicí [17], je nelineární (obr. 6).

Tabulka 5

c_S /(mol dm^{-3})	c_I /(mol dm^{-3})			
	0,005	0,012	0,017	0,025
0,008	$6{,}786\cdot10^{-3}$	$2{,}020\cdot10^{-2}$	$6{,}382\cdot10^{-2}$	$7{,}450\cdot10^{-2}$
0,025	$7{,}030\cdot10^{-3}$	$2{,}062\cdot10^{-2}$	$6{,}469\cdot10^{-2}$	$7{,}500\cdot10^{-2}$
0,05	$7{,}106\cdot10^{-3}$	$2{,}075\cdot10^{-2}$	$6{,}507\cdot10^{-2}$	$7{,}526\cdot10^{-2}$
0,08	$7{,}137\cdot10^{-3}$	$2{,}082\cdot10^{-2}$	$6{,}511\cdot10^{-2}$	$7{,}540\cdot10^{-2}$



Obr. 6