

Enzim moduláció

Enzim inhibíció és kinetikája



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

INHIBÍCIÓ

REVERZIBILIS

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

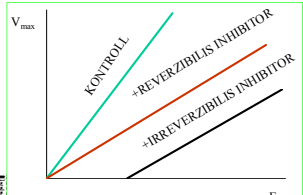

EI

IRREVERZIBILIS

$$E + S \xrightleftharpoons{K_s} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

EI

eldöntése:


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az enzim felületén:

Szubsztrátkötő-hely
 Katalitikus domain = **AKTIV CENTRUM** } lehetnek azonosak is

Az aktivitást befolyásolhatják:
 További kötőhelyek:
 fémionok (ionos és kelát formában)
 modulátor molekulák (inhibitor, aktivátor)

A fehérje kovalens módosítása:
 foszforilezés
 glikozilálás
 proteolízis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

INHIBÍCIÓ

komplett, teljes

Az enzim a kötődés hatására teljesen elveszti aktivitását.

„Lineáris” inhibíció

részleges inhibíció

Az aktivitás csak csökken, egy része megmarad.

„Hiperbolikus” inhibíció →

A DIXON féle linearizált kinetikai diagramok alakjából.

DIXON ábrázolás: $1/v - I$ (inhibitor koncentráció)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ENZIM MODULÁCIÓ

Modulátorok hatása

Inhibitorok:
csökkenti a reakciósebességet

V_i

Az inhibíció mértéke:


$$\mathcal{E}_i = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$$

Aktivátorok:
növelik a reakciósebességet

V_a

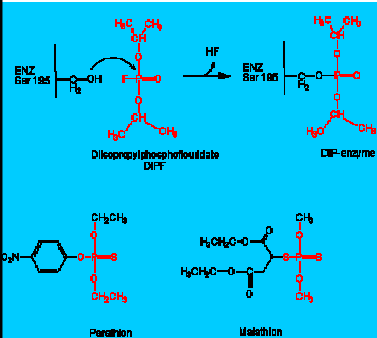
az aktiválás mértéke:

$$\mathcal{E}_a = \frac{v_a - v_0}{v_0}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Irreverzibilis inhibitorok



Dipropionilfoszforfluoridát
DIPF


DIPF-enzim

Parathion

Malathion

Di-izopropyl-foszforfluoridát: a sarin ideggáz prototípusa Irreverzibilisen inaktíválja az acetilkolinészterázt (Ser-proteázokat). A Ser195-hez kovalensen kötődik (az aktív centrumban)

Hasonlók: [Malathion](#), [ethyl parathion](#) (szerves foszfát peszticid)



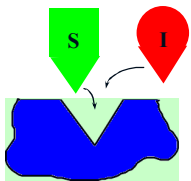
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1. Kompetitív inhibíció

Versengés S és I között az E aktív helyéért, vagy-vagy: kölcsönös kizárás

I lehet:

- szubsztrát analóg
- alternatív szubsztrát
- termék

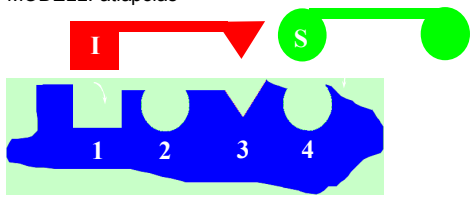


1. MODELL: Klasszikus kompetitív inhibíció
 Az I verseng S-sel ugyanazon aktív hely elfoglalásáért

7

Kompetitív inhibíció

4. MODELL: átlapolás

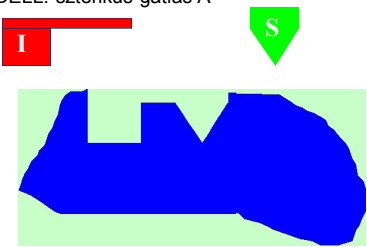


1 és 3 kötőhely köti az inhibitor, a 2 és 4 kötőhely pedig a szubsztrátot, de egymást kölcsönösen kizárják.

10

Kompetitív inhibíció

2. MODELL: sztérikus gátlás A



I kötődése egy másik kötőhelyhez térbelileg gátolja S-nek az aktív helyhez kötését.

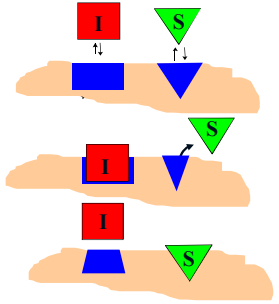
8

Kompetitív inhibíció

5. MODELL:

I kötődése az enzimhez konformáció változást okoz az enzimben és ez megakadályozza S-nek az aktív centrumhoz kötődését.

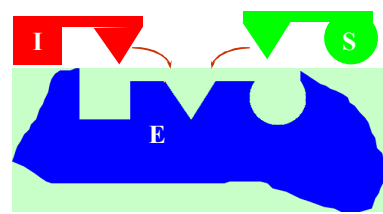
Ilyen a végtermék gátlás (feed back inhibíció) is.



11

Kompetitív inhibíció

3. MODELL: sztérikus gátlás B



I és az S egy analóg része verseng egy közös kötőhelyért.

9

A kompetitív inhibíció kinetikája

A klasszikus kompetitív inhibíció kinetikája:

$$E + S \xrightleftharpoons{k_s} ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

$$E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$$

$$EI \xrightarrow{k_{app}} E + P'$$

$$K_s = \frac{E \cdot S}{(ES)}$$

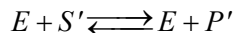
$$K_i = \frac{E \cdot I}{(EI)}$$

- ha $k_{app} > 0$ akkor I alternatív szubsztrát
- ha $k_{app} = 0$ akkor I „dead end” kompetitív inhibitor

12

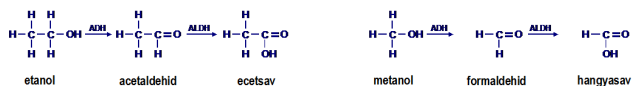
A kompetitív inhibíció kinetikája

Alternatív szubsztrát: az enzim az analóg szerkezetű molekulával is végrehajtja a reakciót → *alternatív termék* keletkezik.



A csoportspecifikus és régióspecifikus enzimeknek értelemszerűen több alternatív szubsztrátja van.

Példa: máj enzimek: alkohol dehidrogenáz, aldehid dehidrogenáz



A kompetitív inhibíció kinetikája

A sebességet végül ebben az egyszerű formában írhatjuk fel:

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

vagy: $V = V_{max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$

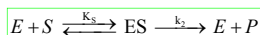
vagy:

$$v_i = \frac{v_{max}(S)}{K_s \left[\frac{K_i + (I)}{K_i} \right] + (S)}$$



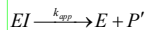
A kompetitív inhibíció kinetikája

Analóg kinetikai levezetés:



+

I
 $\updownarrow K_i$



anyagmérleg az enzimre:

$$K_s = \frac{E \cdot S}{(ES)}$$

$$K_i = \frac{E \cdot I}{(EI)}$$

a „minket érdeklő” reakciósebesség:

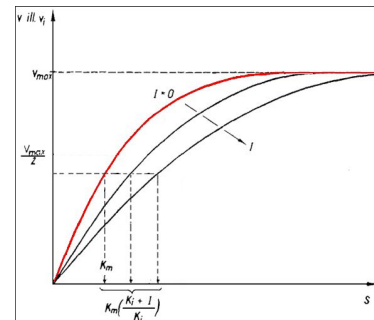
$$V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

$$E_0 = E + (ES) + (EI)$$



A kompetitív inhibíció kinetikája

Figyeljük meg, hogy a két kinetikai paraméter (K_s , V_{max}) közül csak K_s változott, látszólag csökkent az enzim affinitása a szubsztráthoz.



V_{max} értéke nem változik, a K_m növekszik



A kompetitív inhibíció kinetikája

Osszuk el a két egyenletet:

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EI)}$$

Helyettesítsük be:

$$K_s = \frac{E \cdot S}{(ES)}$$

$$K_i = \frac{E \cdot I}{(EI)}$$

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 E \frac{S}{K_s}}{E + E \frac{S}{K_s} + E \frac{I}{K_i}} \rightarrow \frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i}}$$

$$V_{max} = k_2 E_0$$



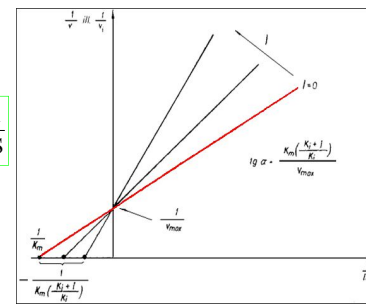
A kompetitív inhibíció kinetikája

A Lineweaver-Burk féle lineáris ábrázolásban az egyenes egyenlete:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_s}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{S}$$

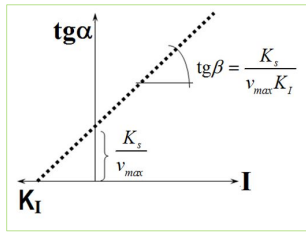
$1/V_{max}$ értéke nem változik (közös metszéspont), az $1/K_m$ csökken.

Így azonosítható a kompetitív inhibíció!



A kompetitív inhibíció kinetikája

A Lineweaver-Burk féle lineárisított egyenesekből másodlagos ábrázolással további információt kaphatunk: a meredkségeket az inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva a tengelymetszet megadja a K_I -t.

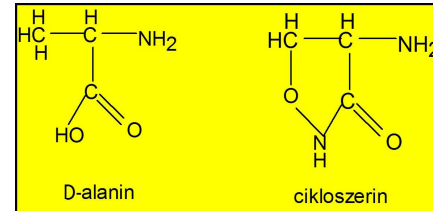


$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_s}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) = \frac{K_s}{V_{\max}} + \frac{K_s}{K_I V_{\max}} I$$

Kompetitív inhibíció

Alternatív szubsztrátok : hexokináz: glükóz, fruktóz

S-analógok: gyógyszerek:



Néhány számítás

A L-B egyenes meredksége arányos az I koncentrációval. Mekkora I duplázza meg az inhibitor nélküli L-B egyenes meredkségét?

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_s}{V_{\max}} \cdot I$$

$$2 \operatorname{tg} \alpha = \frac{K_s}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right)$$

$$2 = \left(1 + \frac{I}{K_I} \right)$$

$$I = K_I$$

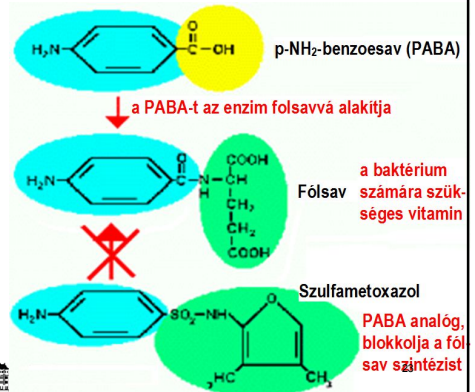
Azaz $I=K_I$ esetben lesz kétszeres a meredkség.

De ez nem jelent 50%-os inhibíciót!

$v_i/v = 0,5$ kiszámítása: →

Kompetitív inhibíció

Szulfonamidok (mikrobaellenes szerek) hatásmechanizmusa:

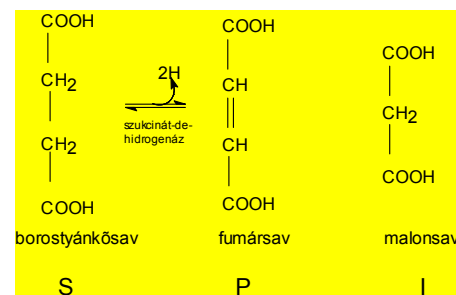


Néhány számítás

Adott S-nél melyik az az I, amelyik 50%-os inhibíciót okoz?

$$\frac{V_i}{V} = 0,5 = \frac{\frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + S}}{\frac{S}{K_s + S}}$$

$$I = K_I \left(\frac{S}{K_s} + 1 \right)$$



Szuccinát-dehidrogenáz(1.3.99.1)

S = szuccinát

I = fumarát

$K_I = 1,9 \cdot 10^{-3}$ mmol/l

Analog inhbíciók

kompetitív inhbíció:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

termék inhbíció:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

alternatív, versengő szubsztátok esetén:

$$V_1 = V_{1\max} \frac{S_1}{K_{S1} \left(1 + \frac{S_2}{K_{S2}}\right) + S_1}$$

$$V_2 = V_{2\max} \frac{S_2}{K_{S2} \left(1 + \frac{S_1}{K_{S1}}\right) + S_2}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

NEMKOMPETITÍV INHBÍCIÓ

$$E + S \xrightleftharpoons{K_s} ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

$$E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$$

$$EI + S \xrightleftharpoons{K_s} ESI$$

$$K_s = \frac{E \cdot S}{ES} = \frac{E \cdot S}{ESI} \quad \text{és} \quad K_i = \frac{E \cdot I}{EI} = \frac{E \cdot I}{ESI}$$

$$V = k_p(ES)$$

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{ES}{E + ES + EI + ESI}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

NEMKOMPETITÍV INHBÍCIÓ

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

NEMKOMPETITÍV INHBÍCIÓ

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i} + \frac{S \cdot I}{K_s K_i}}$$

vagy

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

illetve

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}} \frac{S}{K_s + S}$$

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{ES}{E + ES + EI + ESI}$$

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{ahol} \quad V_{\max} = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

Az inhbitor a látszólagos V_{\max} értéket változtatja meg, K_s (illetve K_m) értékét nem befolyásolja.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

NEMKOMPETITÍV INHBÍCIÓ

Az inhbitor az enzimnek egy másik kötőhelyéhez kapcsolódik és nem befolyásolja a szubsztát kötődését – nem változtatja meg az enzimnek a szubsztárhoz való affinitását.

Csak a rapid ekvilibrium körülményei között létezik, $K_s = K_m$.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

NEMKOMPETITÍV INHBÍCIÓ

$$\text{tg } \alpha = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} K_i} I$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

NEMKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

Példák:

Mekkora I duplázza meg a L-B egyenes meredekségét?
 Mekkora I okoz 50%-os inhibíciót?

$$tg\alpha = \frac{K_S}{V_{max}} \cdot 1$$

Ugyanaz a megoldás: $\rightarrow I = K_I$

$$2tg\alpha = \frac{K_S}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)$$

Példák:

Kreatinkináz (2.7.3.2)

S= kreatin/ATP inhibitor: ADP $K_I = 2 \cdot 10^{-3}$

Fruktóz-bifoszfátáz (3.1.3.11)

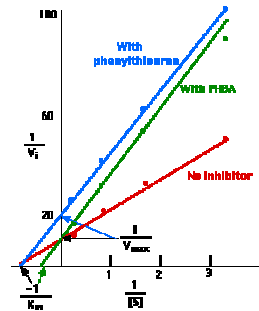
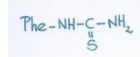
S=Dfr-1,6bP inhibitor: AMP $K_I = 1,1 \cdot 10^{-4}$



NEMKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

A katechin-oxidáz kompetitív inhibitora:
 para-hidroxi-benzoésav (PHBA),
 ugyanoda kötődik, mint a katechin.

nem-kompetitív inhibitora: feniltiourea – ez egy rézionhoz kötődik, ami szükséges az enzim működéshez.



NEMKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

Példák:

H⁺ ionok hatása a kimotripszin esetében. Itt az aktív centrumban egy proton akceptor hely van, amely inhiheálható növekvő H⁺-ion koncentrációval.

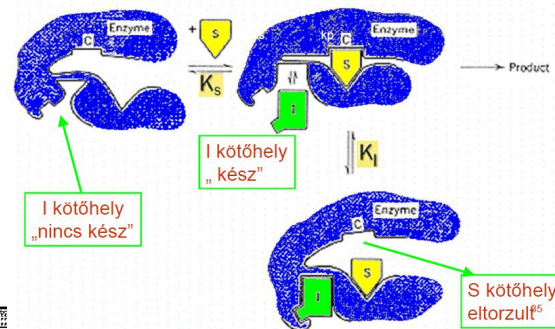
(A L-B ábrázolás tiszta nemkompetitív inhibíciót mutat, azonban ne feledkezzünk meg arról, hogy a pH-nak hatása van a fehérje molekula más részeire is).

nehézfém molekulák (-SH reagensek) vagy **cianidok**. Ezeknél azonban a hatás gyakran irreverzibilis.



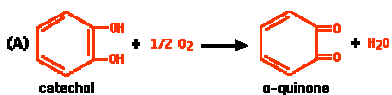
UNKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

I csak a már létrejött ES komplexhez kötődik.

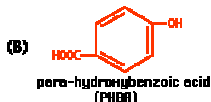


NEMKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

Az alma szelet levegőn megbarnul: o-difenol-oxidáz, katechin-oxidáz:
 catechin \rightarrow o-kinon



ez tovább oxidálódik barna termékké

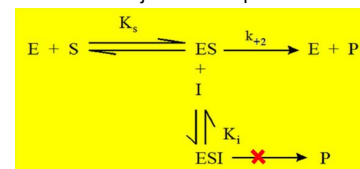


(hasonló enzim: tirozináz [tirozin](#) \rightarrow [melanin](#).)



UNKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

I csak a már létrejött ES komplexhez kötődik



$$V = kp(ES)$$

$$K_S = \frac{E \cdot S}{ES} \quad \text{és} \quad K_I = \frac{ES \cdot I}{ESI}$$

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{ES}{E + ES + ESI}$$



UNKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{S \cdot I}{K_s K_i}}$$

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i} + \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}}$$

mint a nemkomp.inh.

a kompetitív fordítottja, K_s csökken

Az unkompetitív I a K_s és V_{\max} értékét ugyanolyan mértékben csökkenti



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

KEVERT TÍPUSÚ INHIBÍCIÓ

A kevert típusú inhibíció kinetikájának levezetése megegyezik a nem-kompetitívval, annyi eltéréssel, hogy az ESI hármas komplex koncentrációjának behelyettesítésénél bekerül az α tényező:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_i} + \frac{S \cdot I}{\alpha K_s K_i}}$$

vagy kissé átalakítva:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$



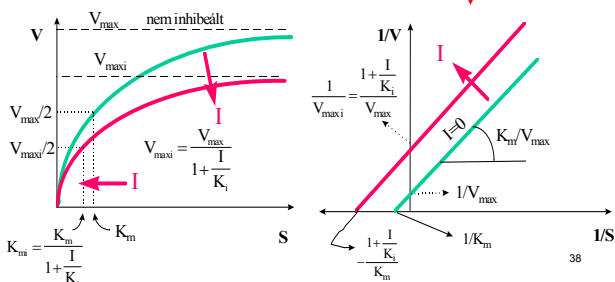
BME /

40

UNKOMPETITÍV INHIBÍCIÓ

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i} + \frac{K_m}{K_m} \frac{S}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)$$



38

KEVERT TÍPUSÚ INHIBÍCIÓ

Vagy ha a két kinetikai paraméter változását fejezzük ki:

$$V = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \cdot \frac{S}{K_s \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

$$V_{\max i} = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

$$K_{si} = K_s \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

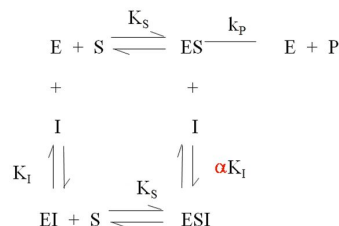


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

4. KEVERT TÍPUSÚ INHIBÍCIÓ

A kevert inhibíció sémája a nem-kompetitív inhibícióra hasonlít,



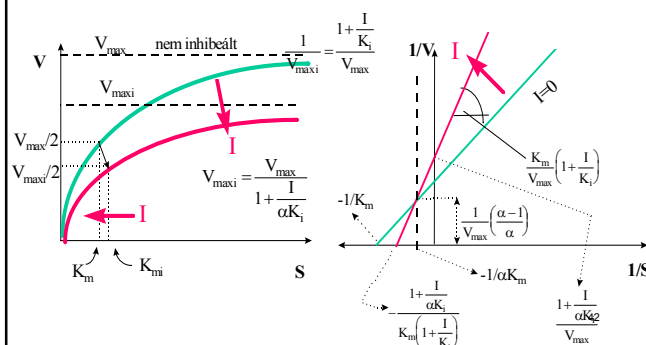
de:
 az I jelenléte módosítja S -nek ES -ről történő disszociációját.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

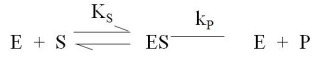
39

KEVERT TÍPUSÚ INHIBÍCIÓ



KEVERT TÍPUSÚ INHIBÍCIÓ

A kevert típusú inhibícióból szinte mindegyik előbb tárgyalat levezethető a reakcióséma részeinek elhagyásával:



$\alpha < 1$ unkompetitív = ∞ kompetitív



INHIBÍCIÓK ÖSSZEFOGLALÁSA

A kinetikai paraméterek (v_{max} , K_s) meghatározásához nem szükséges az egyenletek linearizálása. Az inhibíció típusának azonosításához viszont nagy segítséget nyújt:



INHIBÍCIÓK ÖSSZEFOGLALÁSA

S és I kölcsönösen kizárják egymást az enzimről

KOMPETITÍV

S és I egymástól függetlenül kötődnek az enzimre

NEMKOMPETITÍV

mint az előző, de az I megváltoztatja az enzim affinitását

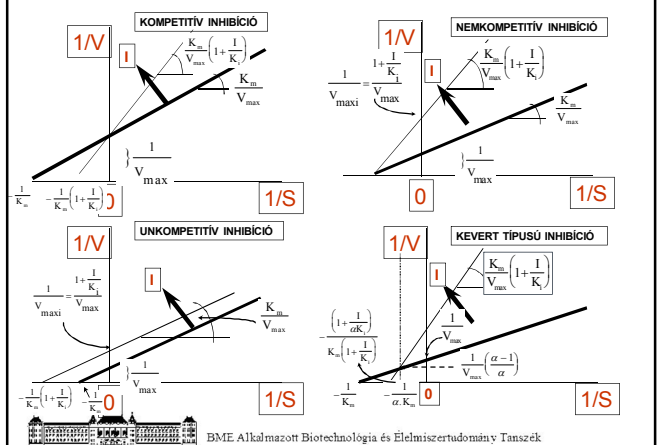
KEVERT TÍPUSÚ

I csak a S után kötődik

UNKOMPETITÍV



LINWEAVER-BURKÁBRÁZOLÁS



INHIBÍCIÓK ÖSSZEFOGLALÁSA

kompetitív

$$V = V_{max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

nemkompetitív

$$V = V_{max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \frac{S}{K_s + S}$$

unkompetitív

$$V = V_{max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

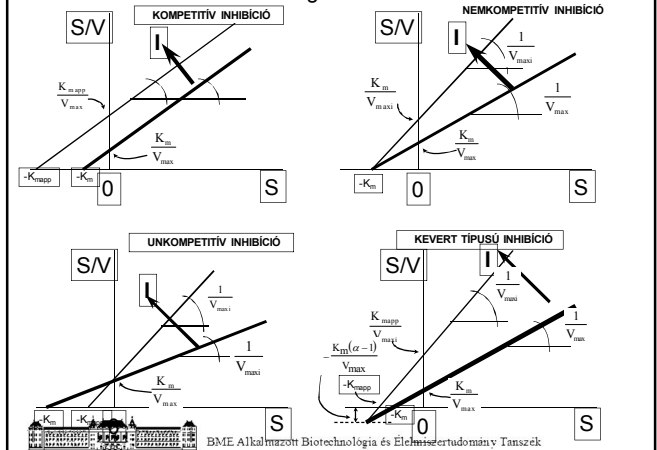
kevert

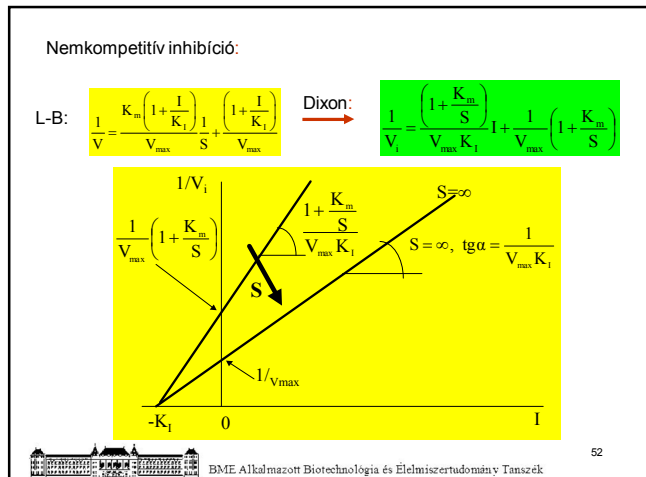
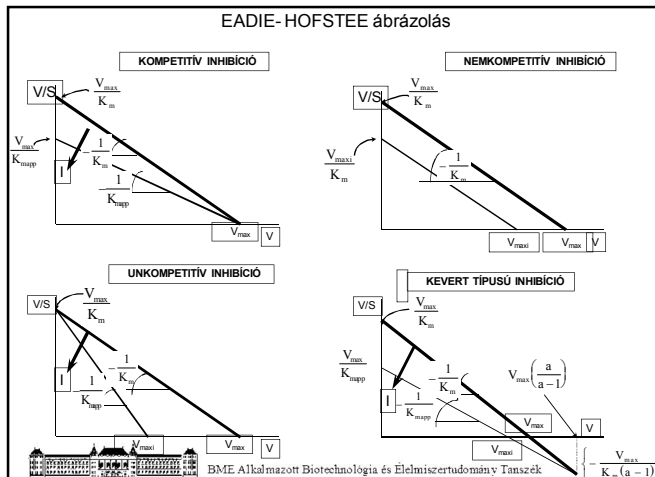
$$V = V_{max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

$$V = V_{max} \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$



Hanes – Langmuir ábrázolás

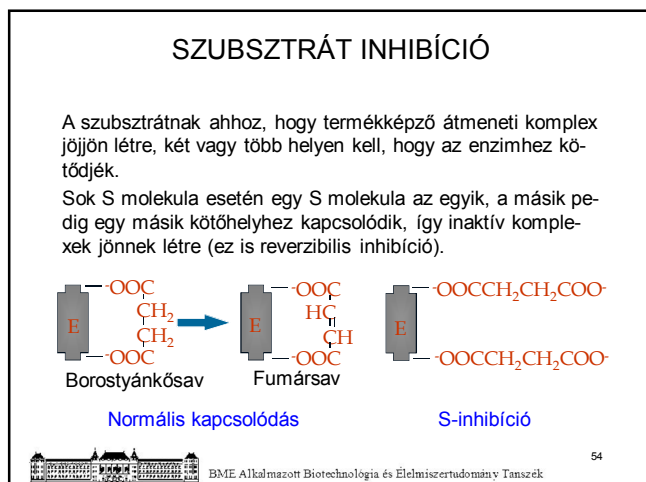
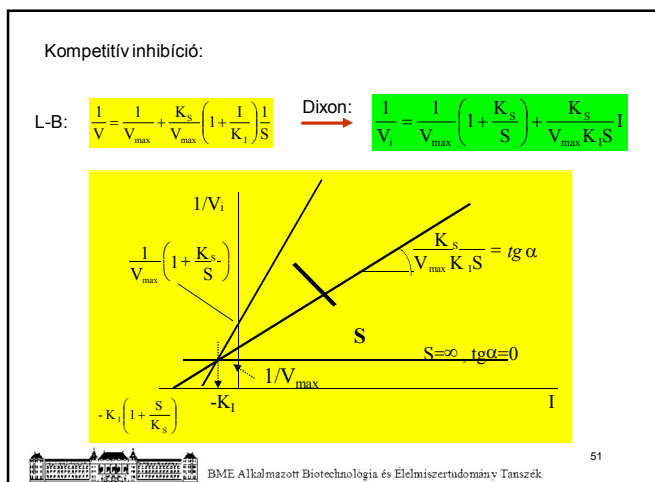
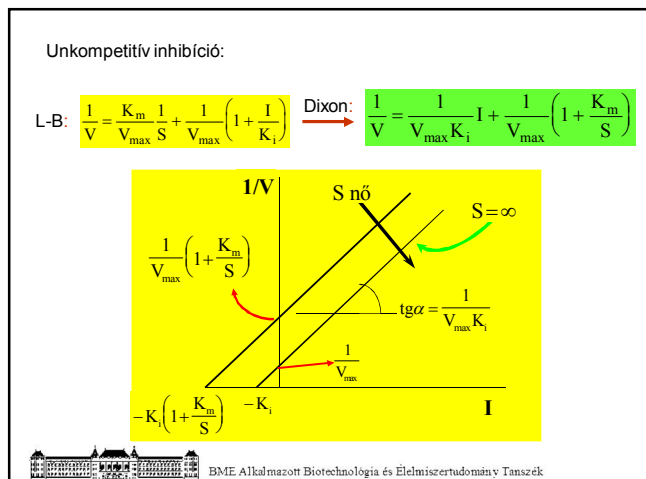




Egy újabb linearizálás: DIXON

Az inhibíciós kinetikák vizsgálatához használható az $1/v - I$ (Dixon féle) ábrázolás is. Itt azonos S értékekhez tartozó sebesség értékeket vizsgálunk. Ha ezek egyenest adnak, akkor az inhibíció lineáris. Az egyenesek elhelyezkedése segít beazonosítani az inhibíció típusát és kinetikai konstansait.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ

- Nagy S koncentrációnál egy S molekula olyan kötőhelyhez is kapcsolódhat az enzimen, amely nem az aktív centrum része, az ilyen kötődés NEMKOMPETITÍV (v. unkompetitív) módon megakadályozza a normális S kötődést.
- Az enzim működéséhez szükség lehet egy AKTIVÁTOR molekulára. Ha ez kapcsolódni képes a szubsztráttal, sok S molekula "elvonja" az enzimtől az aktivátort, így csökkentve annak tényleges aktivitását.
- Két (vagy több) szubsztrátos reakciók esetén az egyik szubsztrát feleslege lekötöheti a másik szubsztrát kötő helyeit, megakadályozva a szükséges második szubsztrát kapcsolódását, így inaktív komplexek jönnek létre.
- Nagy S koncentráció aspecifikus módon is gátolhatja a reakciót, például az ionerősség megnövekedése miatt.



SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ

A szubsztrát inhibíció értelmezhető az unkompetitív inhibíció egy speciális eseteként, amikor a szubsztrát viselkedik inhibitorként: eredeti: I helyett S:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{1}{K_i}\right)}$$

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

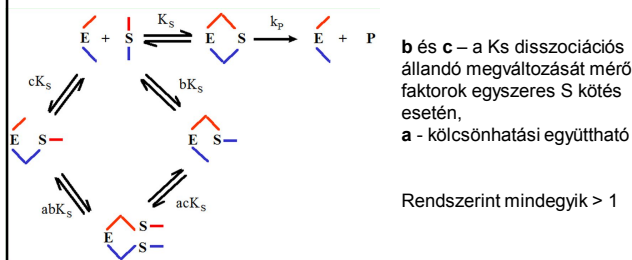
A szubsztrát inhibícióra levezettük:

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{a \cdot K_s}} = V_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Látható az analógia, $K_i = a \cdot K_s$



SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ



$$V = V_{\max} \frac{S}{1 + \frac{S}{K_s} \left(1 + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \left(\frac{S}{K_s}\right)^2 \frac{1}{abc}\right)}$$

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{a \cdot K_s}}$$

elhanyagolható

a^*

SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Kis szubsztrát koncentrációknál $S/K_i \rightarrow 0$, ekkor visszakapjuk a M-M alakot:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

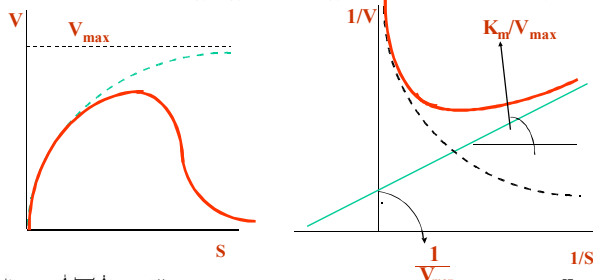
Nagy szubsztrát koncentrációknál K_s elhanyagolható, így a reakciósebesség hiperbolikusan csökken:

$$V = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{S}{K_i}}$$



SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ

L-B ábrázolásban egy egyenes és egy hiperbola szuperpozíciója.



SZUBSZTRÁT INHIBÍCIÓ

