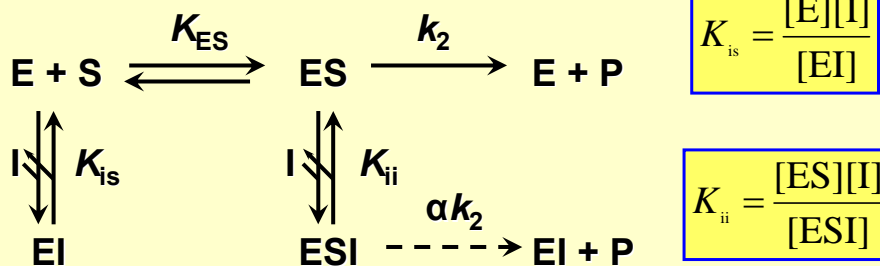


## Inhibice enzymové aktivity

- inhibitory = látky snižující specificky aktivitu daného enzymu
- ztráta aktivity může být dočasná, aktivita se obnoví odstraněním inhibitoru (např. dialýsa, gelová filtrace, ...) = **reverzibilní** inhibitory
- **ireverzibilní** inhibice = ztráta aktivity je nevratná (za normálních podmínek), aktivita obvykle ubývá postupně v čase

## Reverzibilní inhibitory



- obecné schema reversibilní inhibice
- $K_{ES}$  ... rovnovážná konstanta reakce enzymu se substrátem, obvykle platí  $K_{ES} \sim K_m$
- $K_{is}$  ... rovnovážná inhibiční konstanta (slope - směrnice)
- $K_{ii}$  ... rovnovážná inhibiční konstanta (intercept - úseková)
- plná inhibice ( $\alpha=0$ ), parciální inhibice ( $0 < \alpha < 1$ )
- jsou to disociační konstanty - nižší hodnota znamená větší inhibici

## Rychlost inhibované reakce

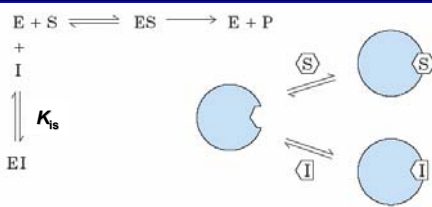
$$v = \frac{V'_{\max} [S]}{K'_m + [S]}$$

"zdánlivý" parametr ' = faktor x "skutečný" parametr

Inhibice	$V'_{\max} =$	$K'_m =$
kompetitivní ( $K_{ii} \rightarrow \infty$ )	$V_{\max}$	$K_m(1 + [I]/K_{is})$
nekompetitivní ( $K_{ii} = K_{is} \equiv K_i$ )	$V_{\max}/(1 + [I]/K_i)$	$K_m$
akompetitivní ( $K_{is} \rightarrow \infty$ )	$V_{\max}/(1 + [I]/K_{ii})$	$K_m/(1 + [I]/K_{ii})$
směsná ( $K_{ii} \neq 0, K_{ii} \neq K_{is}, K_{is} \neq 0$ )	$V_{\max}/(1 + [I]/K_{ii})$	$K_m(1 + [I]/K_{is})/(1 + [I]/K_{ii})$

pomocí hodnot z tabulky pak lze zkonstruovat kinetickou rovnici

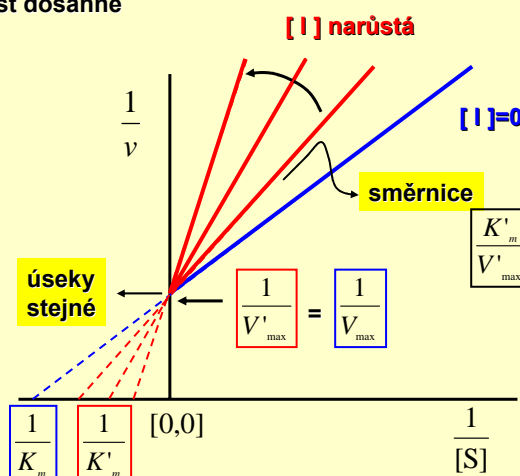
## Kompetitivní inhibice



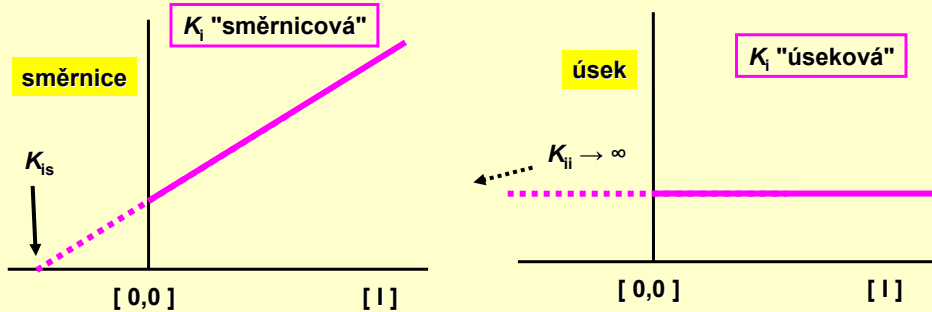
- inhibitor i substrát se váží do stejného aktivního místa enzymu - kompetice (obvykle jsou strukturně podobné)
- při velkém nadbytku substrátu se vliv inhibitoru "překoná" a rychlost dosáhne původního maxima  $V_{\max}$
- ( $K_{ii} \rightarrow \infty$ )

$$v_{i,komp} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_{is}} \right) + [S]}$$

- určení inhibiční konstanty:** soubor primárních LB grafů pro každou danou  $[I]$
- získá se soubor směrnic a úseků



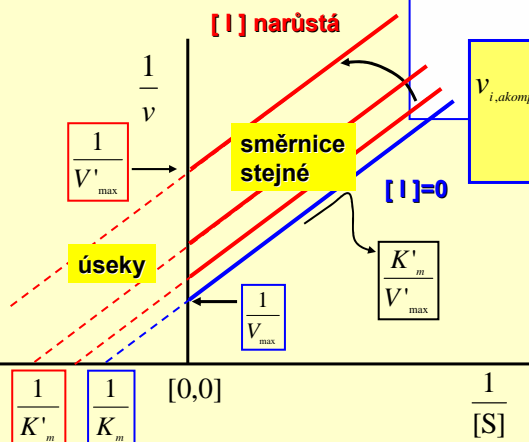
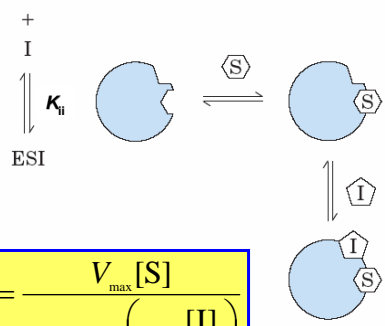
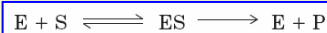
## Určení inhibičních konstant (komp.)



- dva sekundární grafy - výnosy hodnot směrnic resp. úseků proti odpovídajícím koncentracím inhibitoru
- obecný postup pro všechny typy vratných inhibicí

## Akometitivní inhibice

- angl. uncompetitive
- inhibitor se váže pouze na komplex ES a ne na volný E
- v LB prim. výnosu se získá soubor rovnoběžek ( $K_{is} \rightarrow \infty$ )

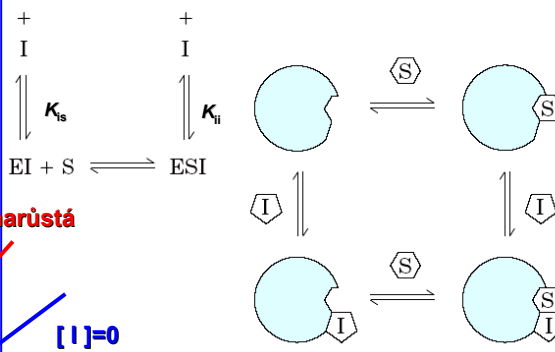
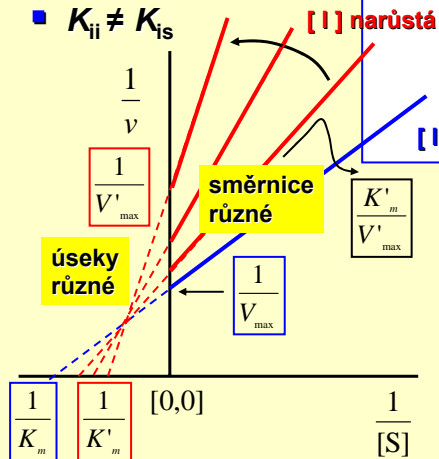


$$v_{i,akomp} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_{is}} \right)}$$

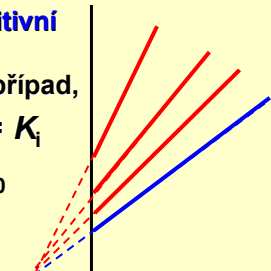
- obvykle pozorováno u dvousubstrátových reakcí

## Inhibice směsná a nekompetitivní

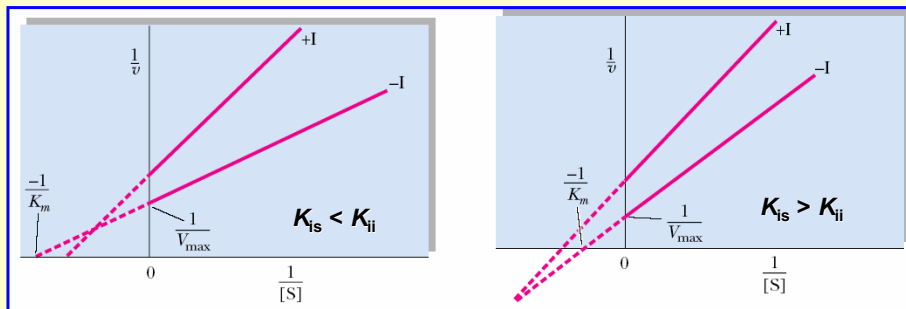
- angl. mixed resp. noncompetitive
- směsná inhibice** je obecný případ,
- $K_{ii} \neq K_{is}$

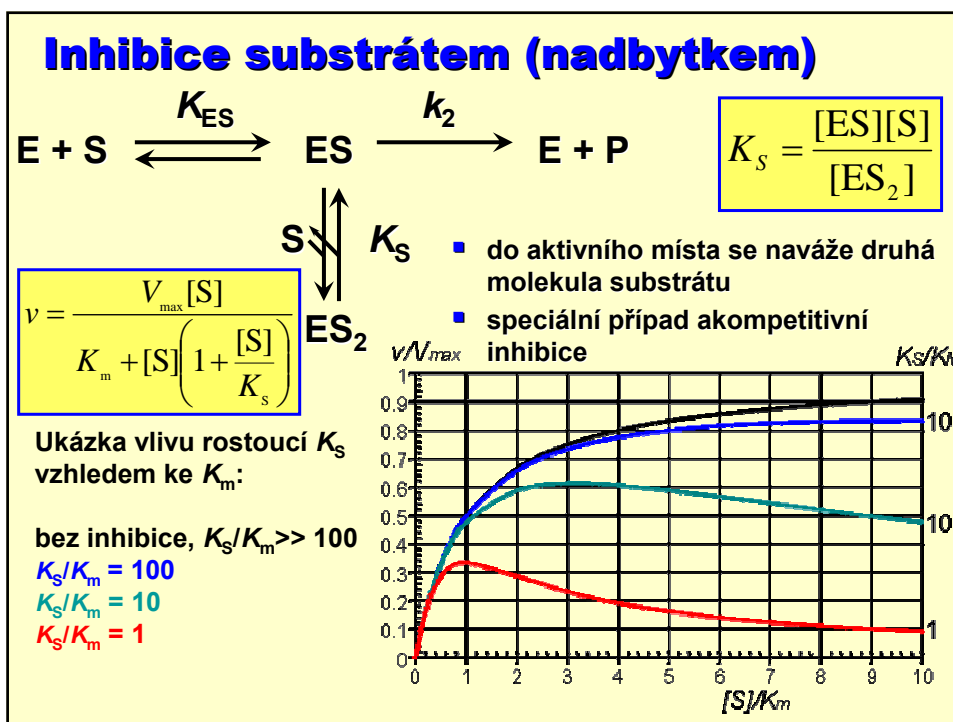
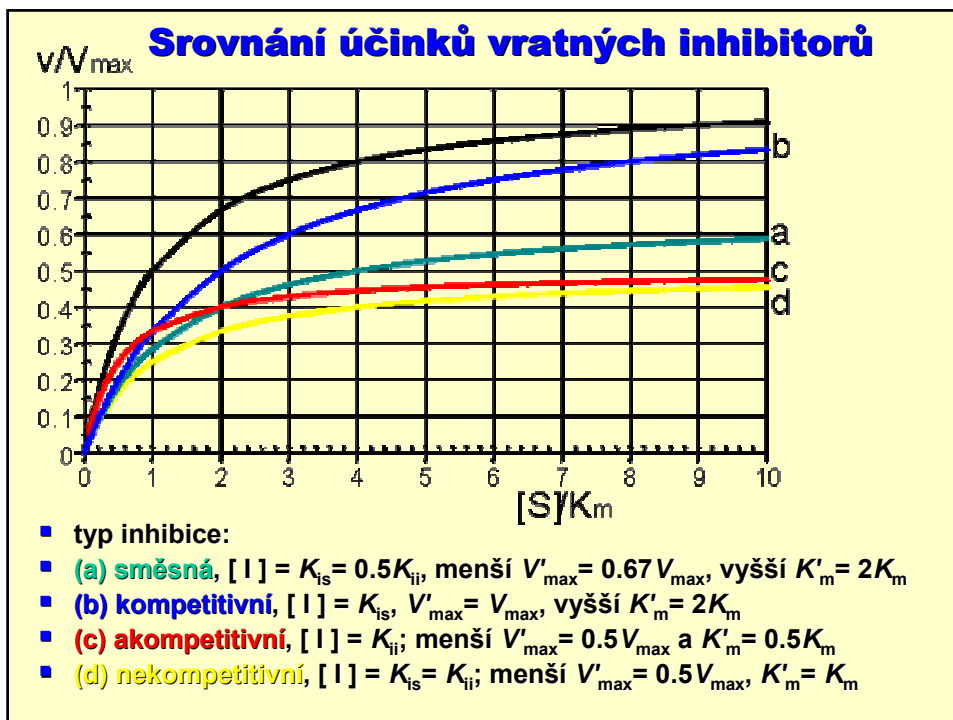


- nekompetitivní inhibice** je speciální případ,
- $K_{ii} = K_{is} = K_i$
- $K_i = [I]_{50}$
- (vzácné)



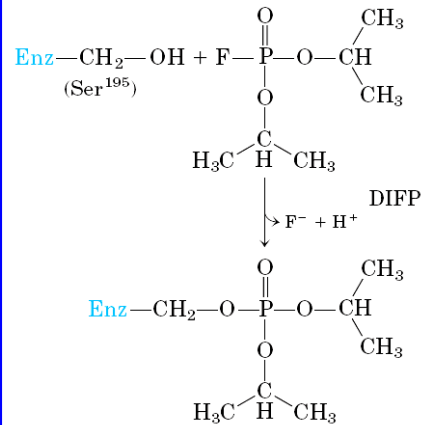
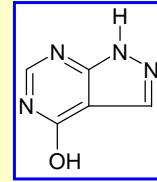
## Kde bude průsečík?





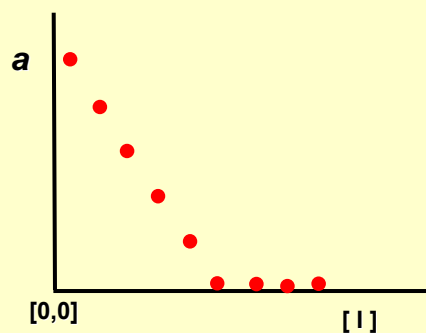
## Ireversibilní inhibice

- váží se kovalentně do aktivního místa
- zničí skupinu aminokyseliny enzymu, která se účastní biokatalytické reakce
- vznikne velmi pevná nekovalentní interakce (allopurinol a xanthinoxidasa)
- důležité pro studium průběhu enzymové reakce - lze tak určit, které aminokyseliny se na ní podílí
- ukázka reakce chymotrypsinu a diisopropylfluorofosfátu (DFP), vedoucí ke kovalentní modifikaci serinu v aktivním místě



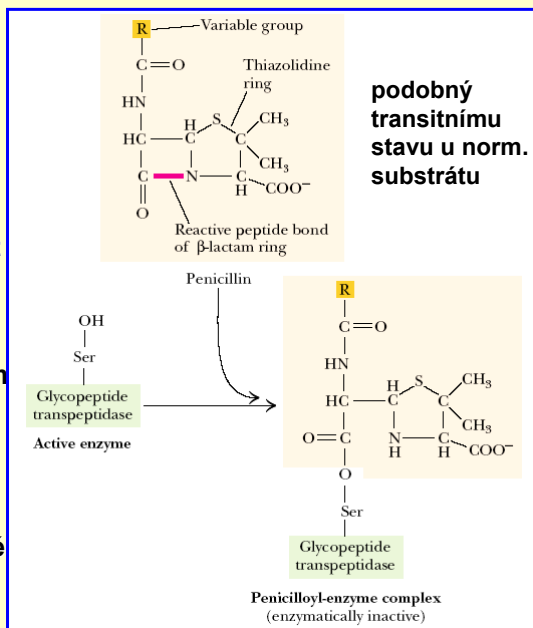
## Titrace enzymové aktivity irev. inhibitorem

- postupné přidávání inhibitoru, aktivita (resp. reakční rychlost) lineárně klesá s množstvím přidaného inhibitoru
- v "bodě ekvivalence" je látkové množství enzymu  $n_E$  (resp. jeho aktivních míst) rovné látkovému množství přidaného inhibitoru  $n_I$
- lze tak jednoduše určit množství enzymu  $n_E$
- např. DFP a cholinesterasa, těžké kovy a -SH skupina



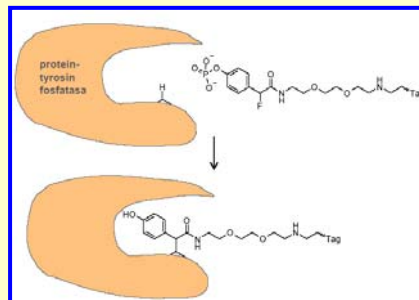
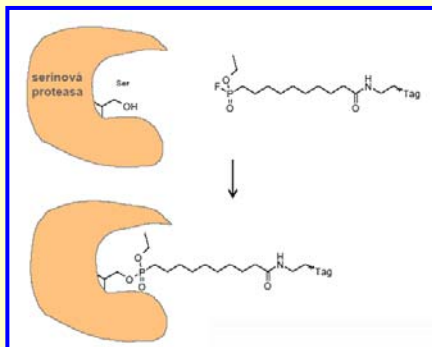
## "Sebevražedné" substráty

- normálně prakticky nereaktivní
- po navázání do aktivního místa enzymu proběhne část enzymové reakce, přičemž vznikne velmi reaktivní meziproduct, co se kovalentně naváže v aktivním místě
- angl. "suicidal inactivators", nebo také "mechanism-based inactivators"
- cílený návrh léčiv - neškodné v buněčném prostředí, inaktivují pouze "svůj" specifický enzym



## Specifické značení enzymů

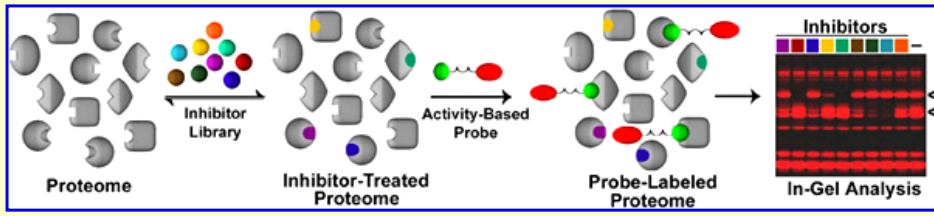
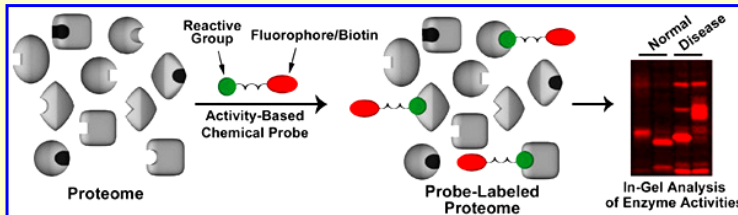
- reaktivní skupina na analogu substrátu nebo inhibitoru



- Tag = značka (fluorescein, biotin, ...)

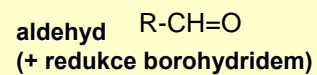
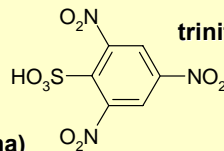
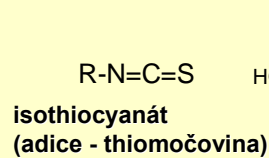
## Activity-based enzyme profiling

- srovnávací studie
- mapování enzymového profilu

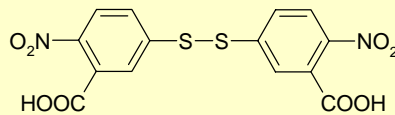
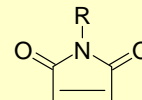
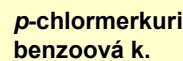
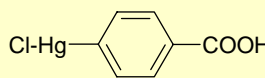



## Cílená modifikace postranních skupin

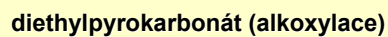
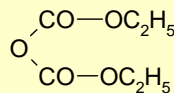
- E-NH<sub>2</sub> (Lys)



- E-SH (Cys)



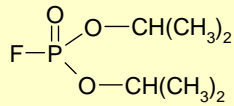
- E- (His)



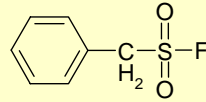


## Cílená modifikace postranních skupin

### ■ E-OH (Ser)

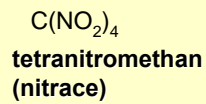


diisopropylfluorofosfát  
DFP (fosforylace)

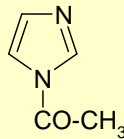


fenylmethylsulfonylfluorid  
PMSF (sulfonylace)

### ■ E---OH (Tyr)

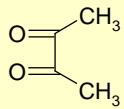


tetranitromethan  
(nitrace)

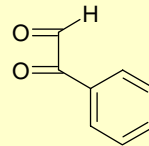


N-acetylimidazol  
NAI (acetylace)

### ■ E--NH-- (Arg)



2,3-butandion  
(kondenzace)



fenylglyoxal (kondenzace)