

Wstęp

Zjawisko katalizy enzymatycznej znane jest od dawna, a jego znaczenie trudno przecenić. Katalizatorami są tu enzymy – białka „zaprojektowane” przez Naturę tak, aby reakcje biologiczne zachodziły w sposób maksymalnie efektywny. Pierwszy model matematyczny opisujący kinetykę enzymatyczną opracowany został ponad sto lat temu, najpierw przez Henri’ego (1903), a w ostatecznej formie przez Michaelisa i Menten (1913) [1]. Od tego czasu ten klasyczny model znacznie rozwinęto – w szczególności w zakresie badań zjawiska inhibicji enzymatycznej. Z jednej strony inhibitory to trucizny katalizatorów enzymatycznych, a z drugiej strony mogą mieć znaczenie przy regulacji ich aktywności [2]. Wynikają z tego ich potencjalne zastosowania – inhibitory wybranych, kluczowych enzymów mogą być środkami ochrony roślin w rolnictwie [3] a także lekami w terapii niektórych chorób związanych z zakłóceniem homeostazy na skutek niewłaściwej aktywności enzymów [2]. Rozwój badań strukturalnych pozwolił na coraz skuteczniejsze projektowanie inhibitorów enzymów – szczególnie analogów inhibitorów występujących w przyrodzie jak i analogów substratów, produktów i nietrwałych energetycznie intermedatów katalizowanych reakcji [3, 4]. Oczywiście zaprojektowane w ten sposób inhibitory wymagają zbadania w rzeczywistych układach reakcyjnych, by potwierdzić ich działanie, określić parametry kinetyczne oraz móc następnie zaplanować badania ich oddziaływania na organizmy żywe.

O ile literatura w języku polskim dotycząca inhibicji klasycznej jest bardzo bogata (włączając w to monografię), to brakuje monografii uwzględniających specyficzny, dość częsty i ważny rodzaj inhibicji – inhibicję wolnowiązącą (*slow-binding*), która opisana jest monografiach angielskojęzycznych [5–7].

Przy tym inhibitory wolnowiązące się z enzymem często znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym, rolnictwie i medycynie [8]. Na przykład, katalizowane przez tyrozynazę, brązowienie owoców, warzyw i napojów jest uważane za jedną z najważniejszych przyczyn utraty jakości żywności a inhibitory tego enzymu pozwalają na zapobieganie ciemnieniu żywności [9]. W artykule podjęto próbę przybliżenia czytelnikowi specyfiki tego typu inhibicji, oraz zaprezentowano algorytm pozwalający na analizę inhibicji wolnowiążącej.

Charakterystyka inhibicji enzymatycznej wolnowiążącej

Inhibicję wolnowiązącą cechuje wzrost siły hamowania aktywności enzymu w czasie. Równowaga wiązania enzymu z inhibitorem osiągnana jest z mniejszą szybkością niż w procesie dyfuzji. Krzywe progresji uzyskiwane w obecności inhibitorów wolnowiążących są inne niż w klasycznym przypadku i opisuje je równanie (1) [10] (Rys. 1).

$$P = V_s \cdot t + \frac{V_0 - V_s}{k_{app}} \cdot (1 - e^{-k_{app} \cdot t}) + \varepsilon \quad (1)$$

gdzie:

P – stężenie produktu reakcji w czasie trwania reakcji

V_s – prędkość reakcji w stanie stacjonarnym

V_0 – prędkość początkowa reakcji

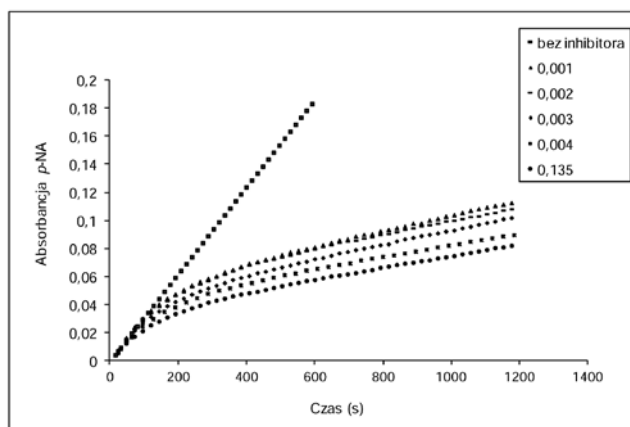
k_{app} – obserwowana stała szybkości reakcji

t – czas przebiegu reakcji

ε – stała (błąd) o wartości oczekiwanej równej zero.

Autor do korespondencji:

Dr Małgorzata PAWEŁCZAK, e-mail: Małgorzata.Pawelczak@uni.opole.pl



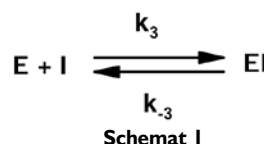
Rys. 1. Przebieg reakcji hydrolyzy p-nitroanilidu L-leucyny (L-Leu-pNA) katalizowanej przez cytozolową aminopeptydazę leucynową (LAP C) z nerek wieprzowych w obecności wzrastających stężeń inhibitora (stężenia podane są w μM) i bez inhibitora

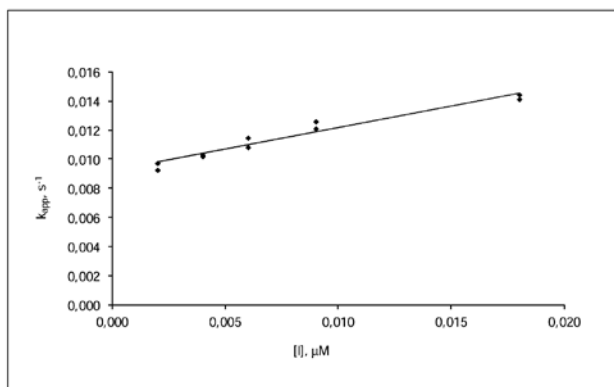
W celu znalezienia wartości k_{app} , V_0 i V_s przeprowadza się dopasowanie równania (1) do wartości eksperymentalnych, np. numerycznie z wykorzystaniem algorytmu Levenberga-Marquardta co pozwala na iteracyjne znalezienie optymalnych parametrów k_{app} , V_0 i V_s z równania (1).

W literaturze [4, 11] rozróżnia się trzy podstawowe mechanizmy (A, B i C), według których może przebiegać proces hamowania aktywności enzymu przez wolnowiążący inhibitor. Według R. G. Dugleby’ego [11] mechanizm inhibicji wolnowiążącej można rozróżnić na podstawie zależności k_{app} od stężenia inhibitora. Wartość k_{app} może być liniowo lub hiperbolicznie zależna od stężenia inhibitora [4, 11, 12]. Jednak przebieg zależności $k_{app} = f([I])$ nie jest jedynym kryterium umożliwiającym rozróżnienie poszczególnych mechanizmów inhibicji wolnowiążącej. Według P. Kuzmicha [12] klasyfikacja R. G. Dugleby’ego może być niewystarczająca do rozróżnienia mechanizmu A od mechanizmu B. Ryzyko błędnej identyfikacji mechanizmu nakazuje przeanalizowanie dodatkowo zależności $V_0 = f([I])$ i $V_s = f([I])$. W przypadku mechanizmu A i C wartości szybkości początkowej reakcji (V_0) są niezależne od stężenia inhibitora, a dla mechanizmu B zmieniają się hiperbolicznie [10].

Mechanizm inhibicji wolnowiążącej typu A

W przypadku, gdy wraz ze wzrostem stężenia inhibitora, wartość k_{app} wzrasta liniowo, inhibitory działają zgodnie z mechanizmem A (Rys. 2). Ponadto wartości szybkości początkowych (V_0) są niezależne od stężenia inhibitora, a wartości szybkości w stanie stacjonarnym zależą hiperbolicznie od stężenia inhibitora. Mechanizm typu A zakłada, że formowanie się kompleksu enzym-inhibitor to pojedynczy powolny krok charakteryzowany przez stałe szybkości k_3 i k_{-3} (Schemat 1). Równowaga między enzymem i substratem jest uzyskiwana szybko (ograniczana jedynie dyfuzją) natomiast wolno ustala się równowaga między enzymem i inhibitorem (tworzenie kompleksu enzym-inhibitor).





Rys. 2. Zależność wartości k_{app} od stężenia inhibitora (reakcja hydrolizy Gly-L-Phe-pNA katalizowana przez katepsynę C w obecności L-Phe-Gly-CHOH-PO₃Et₂) [13]

Wartość stałej K_i dla mechanizmu inhibicji wolnowiążącej typu A można obliczyć dwiema metodami.

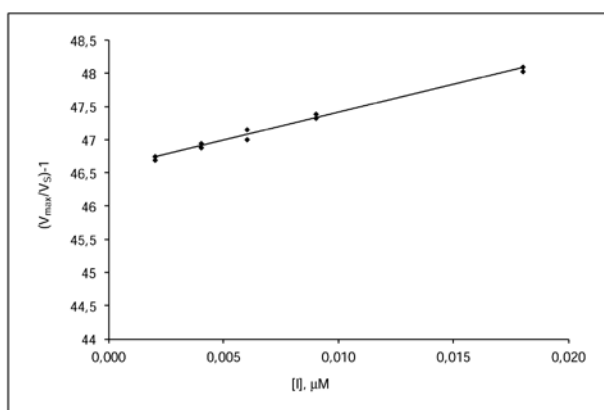
W pierwszej metodzie wykorzystuje się zależność $k_{app} = f([I])$. Z nachylenia prostej $k_{app} = f([I])$ można wyznaczyć wartość k_3 , natomiast jej punkt przecięcia z osią rzędnych pozwala obliczyć wartość k_{-3} (równanie (2) i Rys. 2). Wartość stałej K_i oblicza się z zależności podanej w równaniu (3).

$$k_{app} = k_{-3} + \frac{k_3}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \cdot [I] \quad (2)$$

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (3)$$

W drugiej metodzie, do obliczenia wykorzystuje się równanie liniowe (4) otrzymane po transformacji hiperbolicznej zależności $V_s = f([I])$. Wartość K_i wylicza się z nachylenia prostej (Rys. 3).

$$\frac{V_{max}}{V_s} - 1 = \frac{K_M}{[S] \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{K_M}{[S]} \quad (4)$$



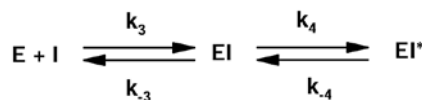
Rys. 3. Zlinearyzowana postać zależności $V_s = f([I])$ (reakcja hydrolizy Gly-L-Phe-pNA katalizowana przez katepsynę C w obecności L-Phe-Gly-CHOH-PO₃Et₂)

Wartości K_i wyliczone dwiema metodami powinny być takie same.

Mechanizm inhibicji wolnowiążącej typu B

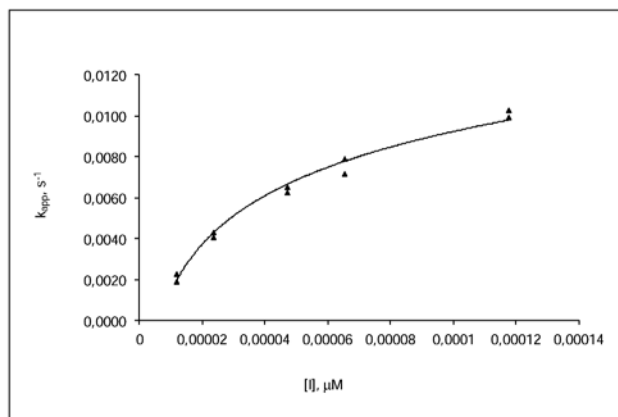
W przypadku, gdy zależności $k_{app} = f([I])$, $V_s = f([I])$ i $V_0 = f([I])$ mają przebieg hiperboliczny, a krzywa $k_{app} = f([I])$ rośnie wraz ze wzrostem stężenia inhibitora, to hamowanie wolnowiążące przebiega zgodnie z mechanizmem B. Mechanizm ten charakteryzuje postępujący w czasie proces hamowania aktywności enzymu, wynikający z wolnych zmian konformacyjnych szybko powstającego kompleksu enzymu

z inhibitorem. Zmiany te prowadzą do powstania zizomeryzowanej postaci kompleksu enzym-inhibitor EI* charakteryzującego się o wiele silniejszym wiązaniem (Schemat 2).



Schemat 2

Wartość stałej hamowania (K_i) można w przypadku mechanizmu B obliczyć trzema metodami.



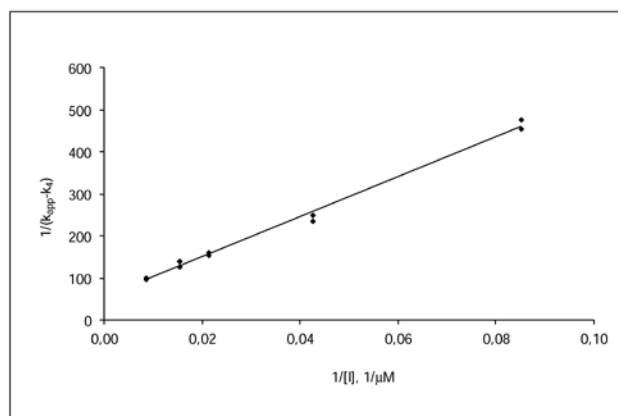
Rys. 4. Zależność k_{app} od stężenia inhibitora (reakcja hydrolizy L-Leu-pNA katalizowana przez LAP C w obecności C₂₀H₂₅N₂O₆P·H₂O; niepublikowane wyniki własne)

W pierwszej metodzie wykorzystuje się hiperboliczną zależność $k_{app} = f([I])$ (równanie (5) i Rys. 4). Po transformacji równania (5) do postaci liniowej (równanie (6)) można wyznaczyć wartość k_4 z zależności (punkt przecięcia z osią rzędnych wynosi $1/k_4$) (Rys. 5). Natomiast wartość stałej k_{-4} musi być wcześniej wyliczona na podstawie zależności (7) lub też przy zastosowaniu metody iteracyjnego dopasowania bezpośrednio równania (6). Wartość stałej hamowania (K_i) wylicza się z nachylenia zależności (6).

$$k_{app} = k_{-4} + \frac{k_4}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) + [I]} \cdot [I] \quad (5)$$

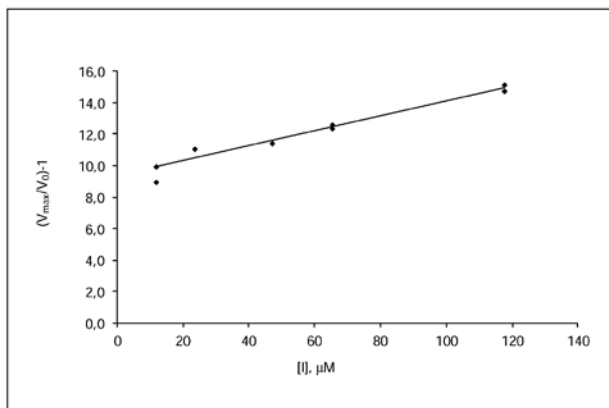
$$\frac{1}{k_{app} - k_{-4}} = \frac{K_i}{k_4} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_4} \quad (6)$$

$$k_{-4} = \frac{V_s}{V_0} \cdot k_{app} \quad (7)$$



Rys. 5. Zlinearyzowana postać zależności $k_{app} = f([I])$ – mechanizm B (reakcja hydrolizy L-Leu-pNA katalizowana przez LAP C w obecności związku C₂₀H₂₅N₂O₆P·H₂O; niepublikowane wyniki własne)

Druga metoda wykorzystuje hiperboliczną zależność $V_0 = f([I])$. Po jej transformacji do równania liniowego (8) (Rys. 6), z nachylenia prostej można obliczyć wartość K_i .



Rys. 6. Zlinearyzowana postać zależności $V_0 = f([I])$ – mechanizm B (reakcja hydrolizy L-Leu-pNA katalizowana przez LAP C w obecności związku $C_{20}H_{25}N_2O_6P \cdot H_2O$; niepublikowane wyniki własne)

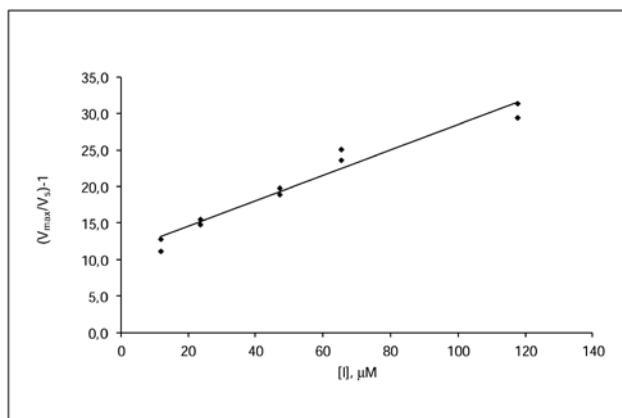
$$\frac{V_{\max}}{V_0} - 1 = \frac{K_M}{[S] \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{K_M}{[S]} \quad (8)$$

$$\frac{V_{\max}}{V_s} - 1 = \frac{K_M}{[S] \cdot K_i^*} \cdot [I] + \frac{K_M}{[S]} \quad (9)$$

$$K_i = K_i^* \cdot \frac{k_4 + k_{-4}}{k_{-4}} \quad (10)$$

Natomiast w trzeciej metodzie wykorzystuje się hiperboliczną zależność $V_s = f([I])$. Wartość K_i obliczyć można po transformacji krzywej do równania liniowego (9) (Rys. 7). Z nachylenia tej prostej obliczyć można K_i^* , a następnie K_i , stosując równanie (10). Oznacza to, że w tym przypadku konieczne są wartości stałych k_4 i k_{-4} wyznaczone z równania (6) lub (7).

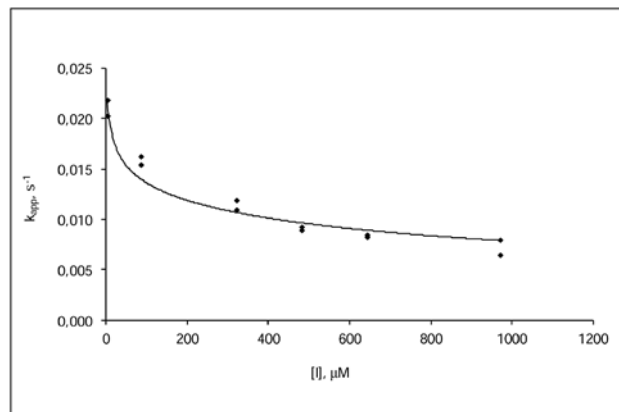
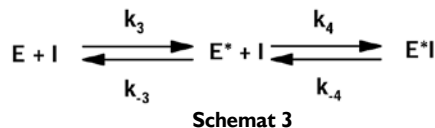
Wartości K_i wyliczone trzema metodami powinny być porównywalne.



Rys. 7. Zlinearyzowana postać zależności $V_s = f([I])$ – mechanizm B (reakcja hydrolizy L-Leu-pNA katalizowana przez LAP C w obecności związku $C_{20}H_{25}N_2O_6P \cdot H_2O$; niepublikowane wyniki własne)

Mechanizm inhibicji wolnowiążącej typu C

Jeżeli szybkość początkowa reakcji jest niezależna od stężenia inhibitora, zależność $k_{app} = f([I])$ ma przebieg hiperboliczny a krzywa $k_{app} = f([I])$ maleje wraz ze wzrostem stężenia inhibitora, to hamowanie wolnowiążące przebiega zgodnie z mechanizmem C (Rys. 8). Mechanizm ten charakteryzuje wzrost siły hamowania aktywności enzymu w czasie spowodowany wolnymi zmianami konformacji enzymu, który dopiero w zizomeryzowanej formie tworzy silny kompleks z inhibitorem (Schemat 3).

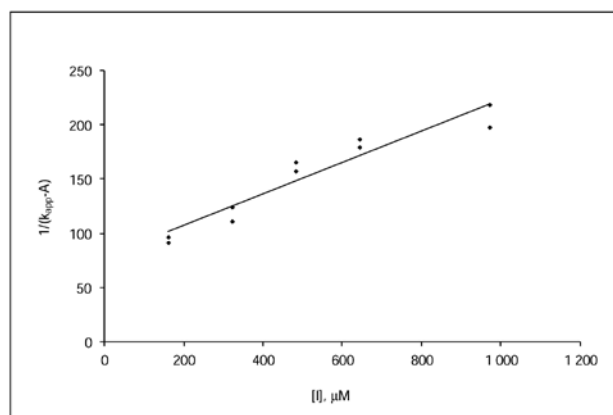


Rys. 8. Zależność k_{app} od stężenia inhibitora (reakcja hydrolizy Gly-L-Phe-pNA katalizowana przez katepsynę C w obecności L-Phe-β-Ala-CHOH-PO₃Et₂) [I]

Wartość K_i dla mechanizmu inhibicji wolnowiążącej typu C można obliczyć dwiema metodami. W pierwszej metodzie wykorzystuje się hiperboliczną zależność $k_{app} = f(I)$ (równanie (11) i Rys. 8). Do obliczeń transformuje się równanie (11) do postaci liniowej (równanie (12), Rys. 9). Za pomocą iteracyjnego dopasowania wyznacza się wartość stałej A (równanie (12)). Stałą k_3 oblicza się z wartości A natomiast stałą k_{-3} z odciętej równania (12). Z nachylenia z kolei obliczyć można K_i .

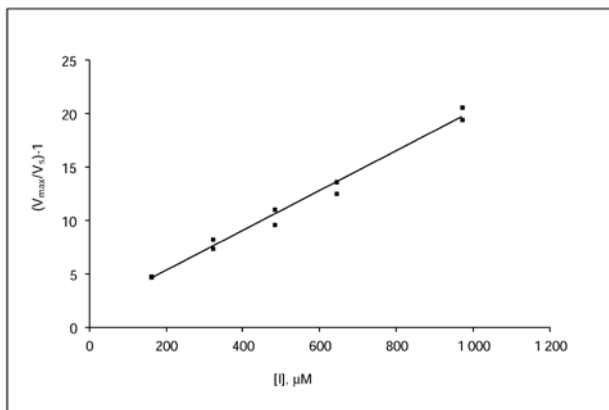
$$k_{app} = \frac{k_3}{1 + \frac{[S]}{K_M}} + \frac{k_{-3}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (11)$$

$$\frac{1}{k_{app} - A} = \frac{1}{k_{-3} \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{1}{k_{-3}} \quad \text{gdzie:} \quad A = \frac{k_3}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (12)$$



Rys. 9. Zlinearyzowana postać zależności $k_{app} = f([I])$ dla mechanizmu C (reakcja hydrolizy Gly-L-Phe-pNA katalizowana przez katepsynę C w obecności L-Phe-β-Ala-CHOH-PO₃Et₂)

W metodzie drugiej, po transformacji zależności $V_s = f([I])$ do postaci liniowej, wyznacza się stałe kinetyczne (K_i^* oraz K_i) (równanie (13) i Rys. 10). Stałe k_3 i k_{-3} wyznaczyć można praktycznie tylko z równania (12), ponieważ chcąc skorzystać z równania (13), jedna z nich musi być wcześniej znana.



Rys. 10. Zlinearyzowana postać zależności $V_s = f([I])$ dla mechanizmu C (reakcja hydrolizy Gly-L-Phe-pNA katalizowana przez katepsynę C w obecności L-Phe-β-Ala-CHOH-PO₃Et₂)

$$\frac{V_{\max}}{V_s} - 1 = \frac{K_M}{[S] \cdot K_i} \cdot \left(\frac{k_3}{k_{-3}} \right) \cdot [I] + \frac{K_M}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{k_3}{k_{-3}} \right) \quad (13)$$

gdzie: $\frac{k_3}{k_{-3}} = K_i^*$

Jednak po wyznaczeniu ilorazu obu tych stałych z wartości odciętej równania (13), możliwe jest obliczenie K_i z nachylenia tego samego równania bez potrzeby korzystania z równania (12).

Wartości K_i wyliczone obiema metodami powinny być porównywalne. Jeżeli dobrze korelują ze sobą, to można przyjąć, że reakcja przebiega zgodnie z założonym mechanizmem.

Autorzy tej pracy opracowali zestaw arkuszy kalkulacyjnych pozwalających na łatwe ustalenie z jakim typem inhibicji wolnowiążącej ma do czynienia eksperymentator i wyliczenie stałych kinetycznych. Arkusze te mogą zostać udostępnione zainteresowanym po skontaktowaniu się z autorami.

Literatura

1. Michaelis L., Menten M. L.: *The kinetics of invertin action*. FEBS Letters 2013, **587**, 2712–2720.
2. Guay D., Beaulieu C., Percival D. A.: *Therapeutic Utility and Medicinal Chemistry of Cathepsin C Inhibitors*. Curr. Top. Med. Chem. 2010, **10**, 708–716.
3. Kafarski P., Grembecka J., Mucha A., Pawelczak M., Drag M., Berlicki Ł., Olechnowicz D.: *Projektowanie potencjalnych leków i pestycydów z wykorzystaniem wiedzy o strukturze przestrzennej enzymów*. Przem. Chem. 2003, **82**, 1087–1089.

4. Lejczak B., Kafarski P., Zygmunt J.: *Inhibition of Aminopeptidases by Amino-phosphonates*. Biochemistry. 1989, **28**, 3549–3555.
5. Cook P. F., Cleland W. W.: *Enzyme kinetics and mechanism*. Garland Science 2007, 195–204.
6. Copeland R. A.: *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. VILEY-VCH, 2000, 318–349.
7. Copeland R. A.: *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*. John Wiley & Sons, 2013, 203–245.
8. Allegra C., J., Chabner B. A., Drake J. C., Lutz R., Rodbard D., Joliva J.: *Enhanced Inhibition of Thymidylate Synthase by Methotrexate Polyglutamates*. J. Biol. Chem. 1985, **260**, 9720–9726.
9. Jimenez M., Garcia-Carmona F.: *4-Substituted Resolcinols (Sulfite Alternatives) as Slow-Binding Inhibitors of Tyrosinase Catecholase Activity*. J. Agric. Food Chem. 1997, **45**, 2061–2065.
10. Goličnik M., Stojan J.: *Slow-binding inhibition: A theoretical and practical course for students*. Biochem. Mol. Biol. Educ. 2004, **32**, 228–235.
11. Duggleby, R.G., Attwood, P.V., Wallace, J.C., Keech B.: *Avidin is a slow-binding inhibitor of pyruvate carboxylase*. Biochemistry 1982, **21**, 3364–3370.
12. Kuzmič P.: *A steady state mathematical model for stepwise „slow-binding” reversible enzyme inhibition*. Anal. Biochem. 2008, **380**, 5–12.
13. Drag M., Wiczerzak E., Pawelczak M., Berlicki Ł., Grzonka Z., Kafarski P.: *Toward very potent, non-covalent organophosphonate inhibitors of cathepsin C and related enzymes by 2-amino-1-hydroxy-alkanephosphonates dipeptides*. Biochimie 2013, **95**, 1640–1649.

* Dr Małgorzata PAWEŁCZAK – absolwentka Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu. Doktorat obroniła na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Obecnie jest adiunktem w Zakładzie Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego UO. Zainteresowania naukowe dotyczą badania kinetyki reakcji katalizowanych enzymatycznie.

e-mail: Malgorzata.Pawelczak@uni.opole.pl

Dr inż. Józef HUREK – absolwent Politechniki Śląskiej. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał na Uniwersytecie Śląskim. Obecnie jest starszym wykładowcą w Zakładzie Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego UO. Jego zainteresowania wiążą się z chemią fizyczną, w szczególności z kinetyką enzymatyczną, analizą danych a także z zastosowaniami technologii informacyjnej w dydaktyce.

XI MIĘDZYNARODOWA KONFERENCJA NAUKOWA

IPOEX 2014

2–4 czerwca 2014 r.

Materiały wybuchowe: Badania – Zastosowanie – Bezpieczeństwo

Podstawowym celem konferencji jest prezentacja, analiza oraz dyskusja na temat: chemii i technologii wytwarzania materiałów wybuchowych, zastosowania ich dla celów militarnych i cywilnych, bezpieczeństwa stosowania materiałów wybuchowych w górnictwie podziemnym i odkrywkowym, jak również ich utylizacji. Celem Konferencji jest również integracja środowisk przedstawicieli nauki oraz firm związanych z branżą materiałów wybuchowych i górnictwem.

Termin zgłoszeń: 2014-04-18

Termin konferencji: 2014-06-02 do 2014-06-04

Miejscowość: Ustroń

Punktacja publikacji: I

Oplata konferencyjna od: 1476 zł brutto

Dane kontaktowe: SEKRETARIAT KONFERENCJI IPOEX 2014

tel. (+48 22) 811 12 31

e-mail: ipoex_office@ipo.waw.pl

mgr Agnieszka Lewandowska wew. 241

mgr inż. Tomasz Ślaciński wew. 306

www.konferencja.ipo.waw.pl