

ПРИЛОЖЕНИЕ

I. Модель взаимодействия фермента и ингибитора в условиях «взаимного истощения»

Рассмотрим взаимодействие фермента E и ингибитора I в равновесной реакции, протекающей по схеме:



где E – свободный фермент, I – свободный (несвязавшийся) ингибитор, EI – комплекс фермента и ингибитора.

Равновесная константа ингибирования (K_i , константа диссоциации EI) равна:

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$$

В условиях, когда концентрации фермента и ингибитора – величины одного порядка, это взаимодействие представляет собой систему со взаимным истощением, в которой при образовании комплекса EI происходит снижение концентраций и свободного фермента E, и свободного ингибитора I:

$$K_i = ([E]_0 - [EI]) \cdot ([I]_0 - [EI]) / [EI] \quad (2),$$

где $[E]_0$ и $[I]_0$ – общие концентрации фермента и ингибитора соответственно.

После того, как система приходит в равновесие и часть фермента связывается с ингибитором, только свободный фермент E будет обладать каталитической активностью, которую можно определить, решив квадратное уравнение (2) относительно свободной формы фермента E. Нормированная остаточная активность будет равна:

$$v_i/v_0 = 1 - \left(([E]_0 + [I]_0 + K_i) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4 \cdot [E]_0 \cdot [I]_0} \right) / (2 \cdot [E]_0) \quad (3),$$

где v_i и v_0 – скорости реакции после равновесного связывания ингибитора и в его отсутствии соответственно. Остаточная активность (v_i/v_0) будет плавно снижаться при повышении концентрации ингибитора так, как показано на рис. 3, б.

Если ингибитор вызывает 50%-ное торможение фермента (такую концентрацию ингибитора выражают как $[I]_{50}$), из уравнения (2) следует, что величина $[I]_{50}$ будет зависеть от общей концентрации фермента в среде инкубации с ингибитором:

$$[I]_{50} = K_i + 0,5 \cdot [E]_0 \quad (4)$$

Уравнение (3) значительно упрощается для случаев, когда величина K_i существенно меньше общих концентраций фермента и ингибитора ($[E]_0 \gg K_i$ и $[I]_0 \gg K_i$):

$$v_i/v_0 = 1 - [I]_0/[E]_0 \quad (5)$$

При таких соотношениях величины константы ингибирования и общих концентраций фермента и ингибитора зависимость остаточной активности от общей

концентрации ингибитора будет линейной. Следовательно, при увеличении концентрации фермента $[E]_0$ кривые титрования должны приближаться к линейной функции.

II. Модель взаимодействия двух независимых форм $F_0 \cdot F_1$ и вентурицидина.

Если с одним и тем же ингибитором I в системе со взаимным истощением равновесно связываются две независимые формы фермента: E_1 , катализирующая синтез АТР, и E_2 , гидролизующая АТР, – система сильно усложнится. Такое взаимодействие может быть описано следующими схемами:



Константы ингибирования будут определяться в соответствии с уравнениями:

$$K_1 = [E_1] \cdot [I] / [E_1 I] \quad (6) \quad \text{и} \quad K_2 = [E_2] \cdot [I] / [E_2 I] \quad (7),$$

где E_1 и E_2 – свободные формы фермента, I – несвязавшийся ингибитор, $E_1 I$ и $E_2 I$ – комплексы двух форм с ингибитором.

Общие концентрации двух форм фермента $[E_1]_0$ и $[E_2]_0$ будут равны:

$$[E_1]_0 = [E_1] + [E_1 I] \quad (8) \quad \text{и} \quad [E_2]_0 = [E_2] + [E_2 I] \quad (9),$$

а общая концентрация ингибитора $[I]_0$ будет равна $[I]_0 = [I] + [E_1 I] + [E_2 I]$ (10).

Только свободный (не связанный с ингибитором) фермент обладает каталитической активностью. Чтобы выяснить, каким образом остаточная активность каждой из форм фермента зависит от концентрации ингибитора, система уравнений (6)–(10) после преобразований в программе Maple была сведена к двум кубическим уравнениям (11) и (12).

Уравнение (11) описывает зависимость концентрации свободной формы фермента E_1 , катализирующей синтез АТР, от концентрации ингибитора:

$$a_3 \cdot [E_1]^3 + a_2 \cdot [E_1]^2 + a_1 \cdot [E_1] + a_0 = 0 \quad (11), \text{ где}$$

$$a_3 = K_1 - K_2;$$

$$a_2 = K_1^2 - 2 \cdot K_1 \cdot [E_1]_0 - K_1 \cdot K_2 - K_2 \cdot [I]_0 + K_2 \cdot [E_1]_0 + K_1 \cdot [I]_0 - K_1 \cdot [E_2]_0;$$

$$a_1 = K_1 \cdot [E_1]_0 \cdot ([E_2]_0 - [I]_0 + [E_1]_0 + K_2 - 2 \cdot K_1);$$

$$a_0 = K_1^2 \cdot [E_1]_0^2.$$

Уравнение (12) описывает зависимость концентрации свободной формы фермента E_2 , катализирующей гидролиз АТР, от концентрации ингибитора:

$$b_3 \cdot [E_2]^3 + b_2 \cdot [E_2]^2 + b_1 \cdot [E_2] + b_0 = 0 \quad (12), \text{ где}$$

$$b_3 = K_2 - K_1;$$

$$b_2 = K_2^2 - 2 \cdot K_2 \cdot [E_2]_0 - K_1 \cdot K_2 - K_1 \cdot [I]_0 + K_1 \cdot [E_2]_0 + K_2 \cdot [I]_0 - K_2 \cdot [E_1]_0;$$

$$b_1 = K_2 \cdot [E_2]_0 \cdot (K_1 - [I]_0 + [E_1]_0 + [E_2]_0 - 2 \cdot K_2);$$

$$b_0 = K_2^2 \cdot [E_2]_0^2.$$

Решая уравнения (11) и (12) относительно свободных форм E_1 и E_2 можно рассчитать кривые титрования двух форм фермента вентурицидином.