**Inhibicja i inhibitory**

Inhibicja jest to zjawisko hamowania aktywności enzymów. Substancje hamujące aktywność enzymu to inhibitory. Dzielą się one na dwie grupy: inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne.

Inhibicja kompetycyjna

Inhibitor kompetycyjny wykazuje podobieństwo strukturalne do substratu i konkuruje z nim o miejsce aktywne enzymu. Enzym “nie potrafi” odróżnić substratu od inhibitora i “omyłkowo” (zamiast substratu) wiąże inhibitor kompetycyjny w swoim miejscu aktywnym. Powstały kompleks Enzym–Inhibitor nie może ulec dalszej przemianie. W obecności enzymu, substratu i inhibitora istnieje możliwość zajścia dwóch reakcji:

**A**. Enzym + Substrat Enzym-Substrat Enzym + Produkt

**B**. Enzym + Inhibitor Enzym-Inhibitor

Liczba cząsteczek enzymu (przy jego stałym stężeniu) zaangażowanych w reakcji **A** lub **B** zależy od stosunku stężeń substratu i inhibitora. Im wyższe będzie stężenie substratu w stosunku do inhibitora, tym mniej cząsteczek enzymu będzie wiązać się z inhibitorem. Przy stałym stężeniu inhibitora i wzrastającym stężeniu substratu następuje odłączenie coraz większej liczby cząsteczek inhibitora od enzymu i zastępowanie go przez substrat. Kompleks Enzym-Inhibitor przekształca się w kompleks Enzym-Substrat, a inhibitor zostaje wyparty z miejsca aktywnego enzymu. Hamowanie reakcji wywołane inhibitorem kompetycyjnym może być zatem odwrócone poprzez zwiększenie stężenia substratu.

Przy odpowiednio dużym stężeniu substratu prędkość maksymalna reakcji (Vmax), pomimo obecności inhibitora, osiąga wartość obserwowaną w układzie niezawierającym inhibitora. Mówiąc inaczej, do osiągnięcia Vmax w obecności inhibitora kompetycyjnego potrzeba większego stężenia substratu, niż w układzie wolnym od tego inhibitora. Oczywiście większe stężenie substratu będzie potrzebne również do osiągnięcia Vmax/2, co oznacza, że stała Michaelisa (KM) w obecności inhibitora kompetycyjnego osiąga większą wartość.

**Inhibicja niekompetycyjna**

Inhibitor niekompetycyjny nie wykazuje zwykle podobieństwa do substratu. Wiąże się on z enzymem poza miejscem aktywnym (w innym miejscu niż substrat). Miejsce aktywne enzymu wiąże substrat, lecz “nie potrafi” go przekształcić w produkt. Nawet znaczne zwiększenie stężenia substratu nie jest wówczas w stanie odwrócić inhibicji. Inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem lub z kompleksem Enzym-Substrat. Reakcje mogą przebiegać według poniższych schematów:

**A**. Enzym + Inhibitor Enzym-Inhibitor

**B**. Enzym-Inhibitor + Substrat Enzym-Substrat-Inhibitor

**C**. Enzym-Substrat + Inhibitor Enzym-Substrat-Inhibitor

Zarówno kompleks: **Enzym-Inhibitor**, jak i **Enzym-Substrat-Inhibitor** są nieaktywne i “nie potrafią” przekształcić związanego substratu w produkt. W obecności inhibitora niekompetycyjnego Vmax ma mniejszą wartość, niezależnie od stężenia substratu, natomiast wartość KM nie ulega zmianie.

**Główne różnice między inhibitorem kompetycyjnym i niekompetycyjnym przedstawia poniższe zestawienie:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Inhibitor kompetycyjny** | **Inhibitor niekompetycyjny** |
| **Budowa** | podobny do substratu | niepodobny do substratu |
| **Miejsce wiązania** | miejsce aktywne | poza miejscem aktywnym |
| **Odwracalność inhibicji przez wzrost stężenia substratu** | odwracalna | nieodwracalna |
| **Vmax** | nie zmienia się, lecz jest osiągana przy wyższym stężeniu substratu | maleje |
| **KM** | wzrasta | nie zmienia się |

*Dehydrogenaza bursztynianowa* utlenia bursztynian do fumaranu, poprzez odłączenie 2 atomów wodoru. Ich bezpośrednim akceptorem jest dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), a następnie koenzym Q, przechodzący w formę zredukowaną QH2. Począwszy od tego ostatniego dalszy transport elektronów zachodzi niezależnie od transportu protonów. Elektrony przechodzą poprzez ***cytochrom b***, ***cytochrom c1*** ,***cytochrom c*** oraz ***cytochrom a+a****3* na tlen. Powstaje anion tlenkowy O2-, który wiąże się z dwoma protonami tworząc cząsteczkę wody.

W naszym doświadczeniu zostanie zastosowany sztuczny akceptor elektronów, żółto-zielony heksacyjanożelazian (III) potasu K3[Fe(CN)6], który w wyniku redukcji przejdzie w bezbarwny heksacyjanożelazian (II) potasu K4[Fe(CN)6]. Tak więc miarą aktywności dehydrogenazy bursztynianowej będzie stopień odbarwienia roztworu heksacyjanożelazianu potasu.

Inhibitorem **kompetycyjnym** dehydrogenazy bursztynianowej jest malonian, związek bardzo podobny do kwasu bursztynowego, od którego różni się brakiem jednej grupy –CH2. Konkuruje z nim o miejsce aktywne enzymu. Malonian wiąże się z dehydrogenazą, a powstały kompleks Enzym-Inhibitor nie może ulec dalszej przemianie. W wyniku tego procesu dochodzi do zahamowania reakcji katalizowanej przez *dehydrogenazę bursztynianową*. Zwiększenie stężenia substratu (bursztynianu) jest w stanie odwrócić tą inhibicję.

Inhibitorami **niekompetycyjnymi** *dehydrogenazy bursztynianowej* są sole metali ciężkich. Wspomniany enzym do swej funkcji katalitycznej wymaga obecności wolnych grup -SH. Jony metali ciężkich (np. Hg2+) wiążą się z siarką grup -SH hamując aktywność tego enzymu. Zwiększenie stężenia substratu (bursztynianu) nie jest w stanie odwrócić tej inhibicji.

Doświadczenie polega na inkubacji homogenatu wątroby szczura, zawierającego dehydrogenazę bursztynianową, z bursztynianem o różnym stężeniu, w obecności lub nieobecności inhibitorów – malonianu i HgCl2, w środowisku zawierającym sztuczny akceptor elektronów – K3[Fe(CN)6]. Po przerwaniu reakcji przy pomocy kwasu trichlorooctowego, w klarownym przesączu oceniamy zależność stopnia odbarwienia roztworu od obecności i relacji stężeń substratu i inhibitorów, przy stałym stężeniu enzymu.

Zagadnienia do przygotowania*:*

1. Regulacja aktywności enzymatycznej
2. Inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne
3. Praktyczne znaczenie inhibitorów

Materiał i roztwory*:*

20% homogenat wątroby szczura

0,1M bufor fosforanowy

0,1M bursztynian sodu

0,05M malonian sodu

0,01M HgCl2

0,5% K3Fe(CN)6

10% kwas trichlorooctowy

*Cel ćwiczenia:* analiza różnic pomiędzy inhibicją kompetycyjną i niekompetycyjną

na przykładzie inhibitorów dehydrogenazy bursztynianowej

***Wykonanie***

1. **Przygotowanie probówek z płynami inkubacyjnymi**
2. Do ponumerowanych probówek (od **1** do **12**) odmierzyć, w dowolnej kolejności odczynniki wg załączonej Tabeli 1. Sumaryczna objętość roztworu reagującego we wszystkich probówkach będzie jednakowa i wyniesie 4 ml.
3. Do probówki numer **2** wlać dodatkowo 2 ml 10% kwasu trichlorooctowego. Probówka nr **1** jest próbą kontrolną bez substratu (zawiera równoważną objętość wody). Probówka **2** jest próbą kontrolną, zawierającą **nieaktywny enzym** (zdenaturowany przez kwas trichlorooctowy).
4. Następnie wszystkie probówki (**1-12**) wstawić do łaźni wodnej o temp. 37oC na 5 min. w celu doprowadzenia reagujących płynów do tej temperatury.

**Tabela 1.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr**  **próby** | 0,1M bufor fosforanowy  **[ml]** | **0,1M**  **bursztynian sodu**  **[ml]** | **0,05M malonian sodu [ml]** | **0,01M HgCl2**  **[ml]** | **0,5%**  **K3Fe(CN)6**  **[ml]** | **H2O**  **[ml]** |
| **1** | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 2,5 |
| **2** | 1 | 0,1 | 0 | 0 | 0,5 | 2,4 |
| **3**  **4** | 1  1 | 0,1  0,1 | 0  0 | 0  0 | 0,5  0,5 | 2,4  2,4 |
| **5**  **6** | 1  1 | 0,1  0,1 | 0,1  0,1 | 0  0 | 0,5  0,5 | 2,3  2,3 |
| **7**  **8** | 1  1 | 0,1  0,1 | 0  0 | 0,1  0,1 | 0,5  0,5 | 2,3  2,3 |
| **9**  **10** | 1  1 | 2,0  2,0 | 0,1  0,1 | 0  0 | 0,5  0,5 | 0,4  0,4 |
| **11**  **12** | 1  1 | 2,0  2,0 | 0  0 | 0,1  0,1 | 0,5  0,5 | 0,4  0,4 |

**2. Inkubacja układów reagujących**

1. Po wstępnej inkubacji do każdej probówki dodać 1 ml homogenatu wątroby szczura.
2. Wymieszać i inkubować przez 30 minut.
3. Do każdej probówki (za wyjątkiem probówki nr 2) dodać 2 ml 10% kwasu trichlorooctowego.
4. Próby przesączyć przez małe sączki do następnego szeregu probówek oznakowanych tymi samymi numerami (1-12).

**3. Interpretacja wyników**

1. Podczas 30-minutowej inkubacji przygotować w zeszycie Tabelę 2 wg załączonego schematu.

**Tabela 2.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr próby** | **Stężenie**  **bursztynianu**  **[mM]** | **Stężenie**  **malonianu**  **[mM]** | **Stężenie**  **HgCl2**  **[mM]** | **Odbarwienie**  heksacyjano-  żelazianu  **(+ lub -)** |
|  |  |  |  |  |

1. Wyliczyć stężenia substratu oraz inhibitorów w poszczególnych probówkach.
2. Stwierdzić, w których probówkach nastąpiło odbarwienie heksacyjanożelazianu (III) potasu (zaznaczyć w Tabeli).
3. Na podstawie wyników zestawionych w Tabeli określić, w których probówkach zaszła inhibicja.
4. Przeanalizować stosunki stężeń użytego substratu i inhibitora.
5. Wskazać, w których probówkach doszło do odwrócenia inhibicji.
6. Przeanalizować, w którym przypadku nastąpiła zmiana stałej Michaelisa.

**4. Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu**

1. ***Pismiennictwo***
2. Bańkowski E.: Biochemia, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2004, rozdz. 4.
3. Cechowska-Pasko M, Galewska Z, Gogiel T, Pawlicka E, Romanowicz L, Sobolewski K, Wolańska M: Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Lekarskiego i Oddziałów: Stomatologii, Pielęgniarstwa i Fizjoterapii Akademii Medycznej w Białymstoku. Pod redakcją prof. dr hab. Edwarda Bańkowskiego. Białystok, 2001.