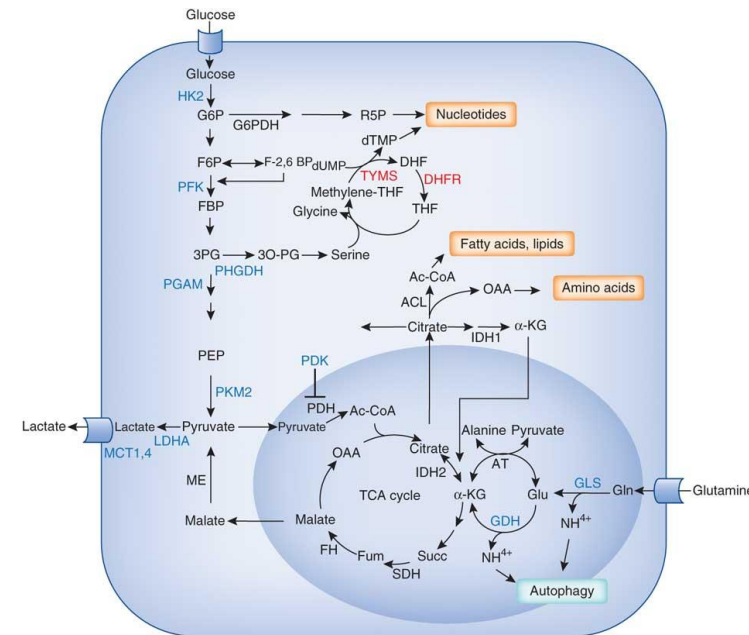




Μοντέλα κυτταρικών αντιδράσεων

Καθηγητής
Δημοσθένης Σαρηγιάννης

Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής





ΣΚΟΠΟΣ

- Η μεταβολική μηχανική αποσκοπεί στην κατασκευή μαθηματικών μοντέλων για να περιγράψει και να προσομοιώσει τις μεταβολικές οδούς τις οποίες χρησιμοποιούν οι έμβιοι οργανισμοί.
 - Η κατανόηση βοηθά στην ερμηνεία της συμπεριφοράς
 - Μπορεί να προβλέψει τη συμπεριφορά
 - Μπορεί να επιτρέψει τη χειραγώγησή της



Αρχικές έννοιες

- **Υπόστρωμα (substrate)** Η ένωση που μεταβολίζεται ή απευθείας ενσωματώνεται στο κύτταρο, είναι ενώσεις οι οποίες που χρησιμοποιούνται από το κύτταρο ως πηγές άνθρακα, αζώτου και ενέργειας (γλυκόζη, αμμωνία, O_2)
- **Μεταβολικό προϊόν (metabolic product)** ενώσεις που παράγονται στο κύτταρο και εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο. Σε αυτά εντάσσονται τα προϊόντα του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού, ετερόλογες πρωτεΐνες.
- **Συστατικά βιομάζας (biomass constituents)** είναι οι δεξαμενές μακρομορίων ή μεμονωμένα μακρολογία (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια) τα οποία εντοπίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου.
- **Ενδοκυτταρικοί μεταβολίτες (intracellular metabolites)** όλες οι λοιπές ενώσεις του κυττάρου όπου περιλαμβάνονται τα ενδιάμεσα προϊόντα των μεταβολικών οδών και οι δομικές μονάδες για την μακρομοριακή σύνθεση (αμινοξέα)



Κατασκευή στοιχειομετρικών μοντέλων

- Συμβολισμός στοιχειομετρικών συντελεστών
- Υποστρώματα (α), μεταβολικά προϊόντα (β), συστατικά βιομάζας (γ), ενδοκυτταρικά συστατικά (g)
- Ένα σύστημα όπου \underline{N} υποστρώματα μετατρέπονται σε \underline{M} μεταβολικά προϊόντα και \underline{Q} συστατικά βιομάζας μέσω \underline{J} αντιδράσεων και \underline{K} ενδοκυτταρικοί μεταβολίτες συμμετέχουν ως ενδιάμεσα του μεταβολικού μονοπατιού.
- Οι στοιχειομετρικοί συντελεστές φέρουν δείκτη αποτελούμενο από δυο νούμερα τα οποία αντιστοιχούν στον αριθμό της αντίδρασης και στο συστατικό.
- Ο στοιχειομετρικός συντελεστής $\underline{\alpha}_{ij}$ αντιστοιχεί στο στοιχειομετρικό συντελεστή του \underline{i} υποστρώματος στην \underline{j} αντίδραση. Τα υποστρώματα μιας αντίδρασης συμβολίζονται ως \underline{S}_i , τα μεταβολικά προϊόντα ως \underline{P}_i και τα συστατικά της βιομάζας ως $\underline{X}_{macro,i}$.
- Τα \underline{K} ενδιάμεσα του μεταβολικού δρόμου συμβολίζονται ως $\underline{X}_{met,i}$.



Κατασκευή στοιχειομετρικών μοντέλων

- Με βάση του παραπάνω συμβολισμούς η στοιχειομετρία της j κυτταρικής αντίδρασης δίνεται από τον τύπο

$$\sum_{i=1}^N \alpha_{ji} S_i + \sum_{i=1}^M \beta_{ji} P_i + \sum_{i=1}^Q \gamma_{ji} X_{macro,i} + \sum_{i=1}^K g_{ji} X_{met,i} = 0$$

- Σε κάθε μεταβολικό μοντέλο θα αναπτύσσεται μια εξίσωση όπως η παραπάνω για κάθε μια από τις J κυτταρικές αντιδράσεις. Για λόγους ευκολίας έκφρασης, γράφεται και ως

$$AS + BP + \Gamma X_{macro} + GX_{Met} = 0$$

- Όπου A, B, Γ και G αντιστοιχούν σε στοιχειομετρικούς πίνακες οι οποίοι περιέχουν τους στοιχειομετρικούς συντελεστές των J αντιδράσεων για τα υποστρώματα, τα μεταβολικά προϊόντα, τους ενδιάμεσους μεταβολίτες και τα συστατικά της βιομάζας



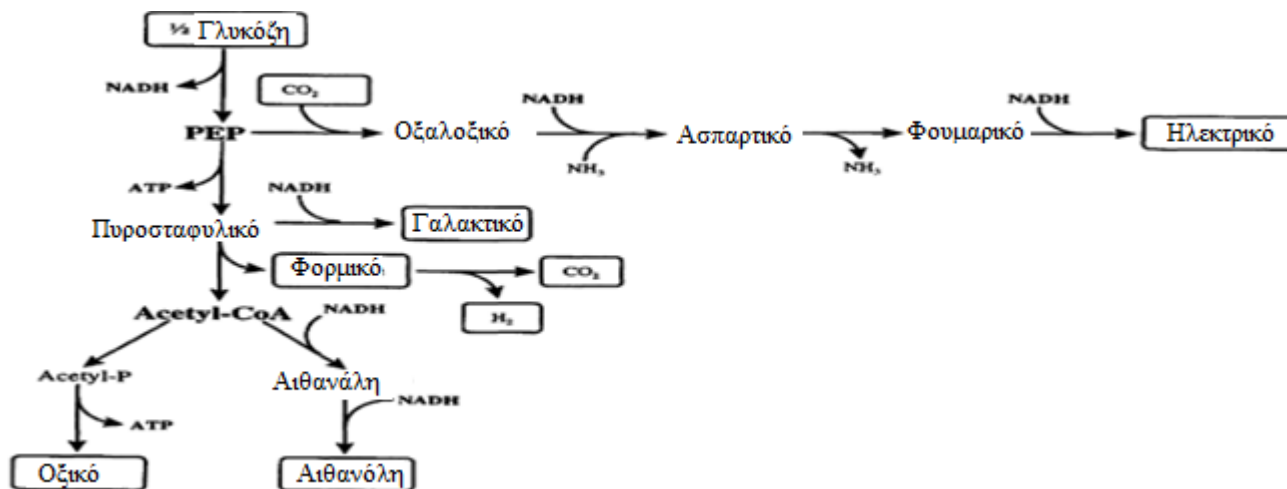
Στοιχειομετρικοί πίνακες

- Στους πίνακες οι
 - Γραμμές αντιστοιχούν στις αντιδράσεις
 - Στήλες στους μεταβολίτες
 - Κατ' επέκταση το στοιχείο στη γραμμή j και στήλη i του πίνακα A αντιστοιχεί στον στοιχειομετρικό συντελεστή του i υποστρώματος στην j αντίδραση. Οι τιμές που μπορεί να λάβουν οι συντελεστές αυτοί μπορεί να είναι θετικές, αρνητικές ή μηδέν



Παράδειγμα, E. coli σε μικτή ζύμωση οξέων

Εξελίσσεται σύμφωνα με το σχήμα



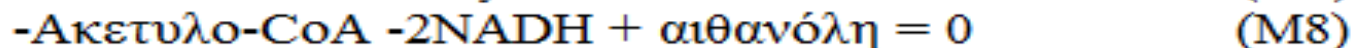
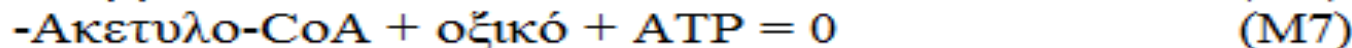
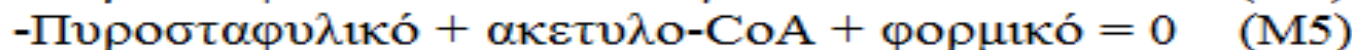
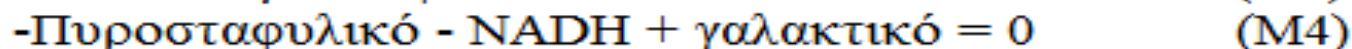
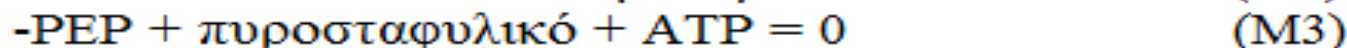
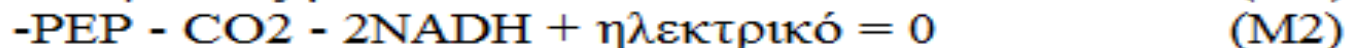
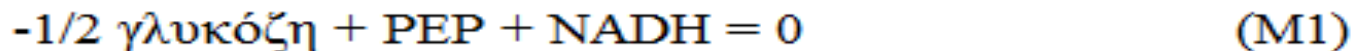
Κατά το μεταβολισμό του ο μικροοργανισμός παράγει 7 προϊόντα με το ηλεκτρικό να παράγεται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) και τα υπόλοιπα από το πυροσταφυλικό

Μεταβολικό προϊόντα	Μόλες προϊόντος ανα 100mol γλυκόζης
Φορμικό	2.4
Οξικό :	36.5
Γαλακτικό	79.5
Ηλεκτρικό	10.7
Αιθανόλη	49.8
CO ₂	88.0
H ₂	75.0



E. coli σε μικτή ζύμωση οξέων

- Στις κυτταρικές αντιδράσεις εμφανίζονται ζεύγη συμπαραγόντων ιδιαίτερης σημασίας όπως τα ζεύγη ATP/ADP, NAD/NADH, NADP/NADPH για στα δυο συστατικά των ζευγών αυτών οι στοιχειομετρικοί συντελεστές θα έχουν ποσοτικά την ίδια τιμή αλλά με αντίθετο πρόσημο (+1 . -1).
- Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των συμπαραγόντων κάθε ζεύγους βρίσκεται σε στενή σχέση μεταξύ τους και είναι σταθερή σε κάθε αντίδραση που λαμβάνουν μέρος.
- οι αντιδράσεις που σχηματίζονται είναι οι ακόλουθες:





E. coli σε μικτή ζύμωση οξέων

- Οι αντιδράσεις μπορούν να ομογενοποιηθούν σύμφωνα με τη γενική εξίσωση, με τη γλυκόζη ως υπόστρωμα, το ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο ως προϊόντα του μεταβολισμού και το PEP, πυροσταφυλικό, ακετυλο-CoA, ATP, και NADH ως ενδιάμεσα προϊόντα.

$$\begin{pmatrix} -1/2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} S_{\text{glc}} + \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_{\text{ηλεκ}} \\ P_{\text{CO}_2} \\ P_{\text{γαλακ}} \\ P_{\text{φορμ}} \\ P_{\text{H}_2} \\ P_{\text{οξικ}} \\ P_{\text{αιθαν}} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & -2 \\ -1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_{\text{PEP}} \\ X_{\text{πυροστ}} \\ X_{\text{AcCoA}} \\ X_{\text{ATP}} \\ X_{\text{NADH}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{G} \quad \text{(M9)}$$



E. coli σε μικτή ζύμωση οξέων

- Η εξίσωση παρέχει εύχρηστη σύνοψη των αντιδράσεων του μοντέλου
- Από την τέταρτη στήλη της αντίδρασης G φαίνεται ότι το ATP παράγεται μόνο σε δυο αντιδράσεις (μετατροπή του PEP σε πυροσταφυλικό και μετατροπή του ακετυλο-CoA σε οξικό). Αυτές οι δυο ροές μπορούν να προσδιοριστούν, και δύναται η εξαγωγή πληροφοριών για την συνολική ταχύτητα σύνθεσης του ATP
- Καθότι το αναγωγικό ισοζύγιο πρέπει να κλείσει με τη μετατροπή της γλυκόζης στους μεταβολίτες της, φαίνεται από τον πίνακα ότι η κατανάλωση της γλυκόζης μπορεί να συσχετισθεί με το σχηματισμό του ηλεκτρικού, γαλακτικού και της αιθανόλης, έτσι μπορεί να υπολογιστεί ότι η κατανάλωση του NADH για 100 mol γλυκόζης είναι :
 - 2×10.7 (ηλεκτρικό)+ 79.5 (γαλακτικό)+ 2×49.8 (αιθανόλη) =200.5



Ταχύτητα αντιδράσεων

- Η ταχύτητα μιας αντίδρασης ορίζεται ως την ταχύτητα προς τη δεξιά πλευρά της αντίδρασης V η οποία καθορίζει ότι ένα συστατικό με στοιχειοθετικό συντελεστή β σχηματίζεται με ταχύτητα βV . Ως μονάδα μέτρησης της ταχύτητας ορίζεται το mol h^{-1} , ή $\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
- Στις κυτταρικές αντιδράσεις συχνά χρησιμοποιείται η βιομάζα ως σημείο αναφοράς για να οριστεί η ειδική ταχύτητα, με μονάδες μέτρησης το mol (gDW h)^{-1} .
- Στη γενικότερη μορφή η ειδική ταχύτητα κατανάλωσης του \underline{i} υποστρώματος είναι το άθροισμα της κατανάλωσης του σε όλες της \underline{j} αντιδράσεις:

$$r_{s,i} = - \sum_{j=1}^J \alpha_{ji} v_j$$

- Με την ταχύτητα παραγωγής του \underline{i} μεταβολικού προϊόντος να δίνεται από τη σχέση:

$$r_{p,i} = \sum_{j=1}^J \beta_{ji} v_j$$



Ταχύτητα αντιδράσεων

- Στην περίπτωση που ένα μεταβολικό προϊόν σχηματίζεται μόνο σε μια αντίδραση, τότε η ταχύτητα σχηματισμού ή κατανάλωσης του είναι μια έμμεση μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης.
- Οι ταχύτητες σχηματισμού των συστατικών της βιομάζας και των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών μπορούν να υπολογιστούν με τις σχέσεις.

$$r_{macro,i} = \sum_{j=1}^J \gamma_{ji} \nu_j$$

$$r_{met,i} = \sum_{j=1}^J g_{ji} \nu_j$$



Ταχύτητα αντιδράσεων

- Ο προσδιορισμός των ταχυτήτων δεν είναι εξίσου εύκολος όπως στην περίπτωση της κατανάλωσης των υποστρωμάτων ή της παραγωγής των προϊόντων. Ο προσδιορισμός τους βασίζεται στη μέτρηση των ενδοκυτταρικών συστατικών

$$\mathbf{r}_s = -\mathbf{A}^T \mathbf{v}$$

$$\mathbf{r}_p = \mathbf{B}^T \mathbf{v}$$

$$\mathbf{r}_{macro} = \mathbf{\Gamma}^T \mathbf{v}$$

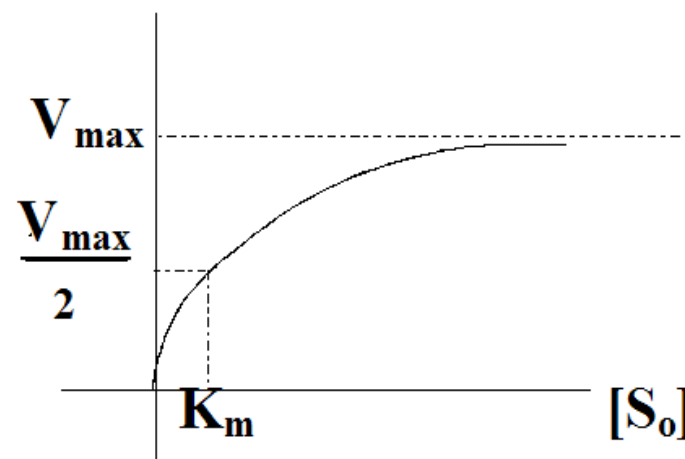
$$\mathbf{r}_{met} = \mathbf{G}^T \mathbf{v}$$

- Όπου \mathbf{A}^T , \mathbf{B}^T , $\mathbf{\Gamma}^T$, \mathbf{G}^T είναι οι πίνακες που προέκυψαν, \mathbf{r}_s το άνυσμα της ειδικής ταχύτητας που περιέχει τις N ειδικές ταχύτητες πρόσληψης του υποστρώματος, \mathbf{r}_p το άνυσμα της ειδικής ταχύτητας που περιέχει τις M ειδικές ταχύτητες σχηματισμού προϊόντος. Οι πίνακες έχουν ως στήλες στοιχειομετρικούς συντελεστές του συνόλου των ρών, και ως γραμμές τις εξισώσεις των ισοζυγίων μάζας για του μεταβολίτες.



Κινητική Michaelis - Menten

- η σταθερά K_m είναι ίση με την συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί σε ρυθμό ίσο με το μισό του **μέγιστου ρυθμού** v_{max}
- Η σταθερά αυτή ονομάζεται **σταθερά κορεσμού ή Michaelis-Menten**
- η κινητική ονομάζεται έκφραση **Michaelis-Menten** από τα ονόματα των δύο που πρώτοι έδωσαν κάποιο μηχανισμό συμβατό με την έκφραση



$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



Υπέθεσαν αποτελείται από τις αντιδράσεις:



- Αν οι σταθερές της πρώτης (αντιστρεπτής) αντίδρασης είναι k_1 και k_{-1} αντίστοιχα, ενώ της δεύτερης k_2 , οι ρυθμοί των απλών αυτών αντιδράσεων μπορούν να γραφούν ως:

$$r_1 = k_1 [S][E]$$

$$r_2 = k_2 [ES]$$

$$r_{-1} = k_{-1} [ES]$$



Προσδιορισμός των ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ v_{\max} και K_m

- Η συνηθισμένη ολοκληρωτική μέθοδος είναι η μέθοδος **Walker**, η οποία βασίζεται σε χειρισμό της εξίσωσης που προέκυψε από την ολοκλήρωση:

$$v_{\max} t = S_o - [S] + K_m \ln \frac{S_o}{[S]}$$

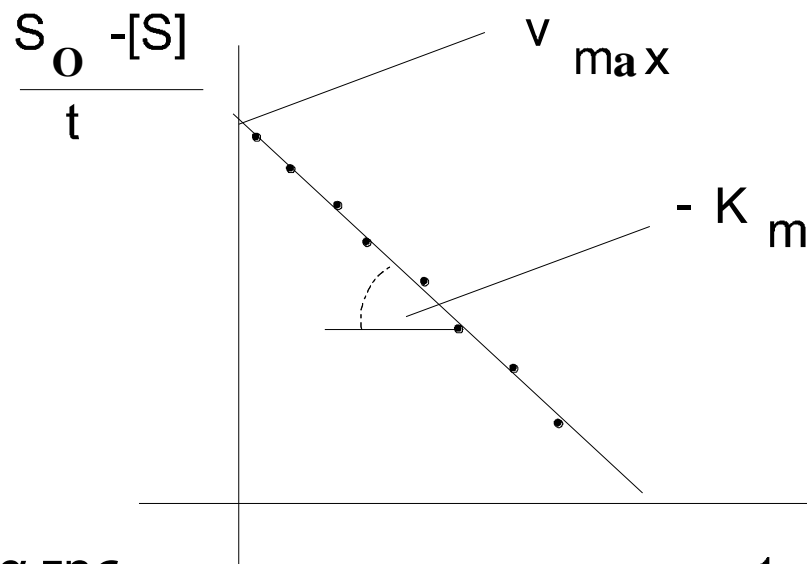
$$\frac{S_o - [S]}{t} = -K_m \frac{1}{t} \ln \frac{S_o}{[S]} + v_{\max}$$



Μέθοδος Walker



$$\frac{S_o - [S]}{t} = -K_m \frac{1}{t} \ln \frac{S_o}{[S]} + v_{\max}$$



Αν κατασκευάσουμε διάγραμμα της παράστασης $(S_o - [S])/t$ ως προς $(1/t)\ln(S_o/[S])$, τότε θα πάρουμε ευθεία γραμμή με κλίση $-K_m$ και διατομή v_{\max} .

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S_o}{[S]}$$

Η ολοκληρωτική αυτή μέθοδος είναι προτιμητέα όταν υπάρχει σημαντική σκέδαση στα δεδομένα, διότι σ' αυτή την περίπτωση το σφάλμα στην γραφική παραγωγή που απαιτούν οι διαφορικές μέθοδοι είναι αισθητό.

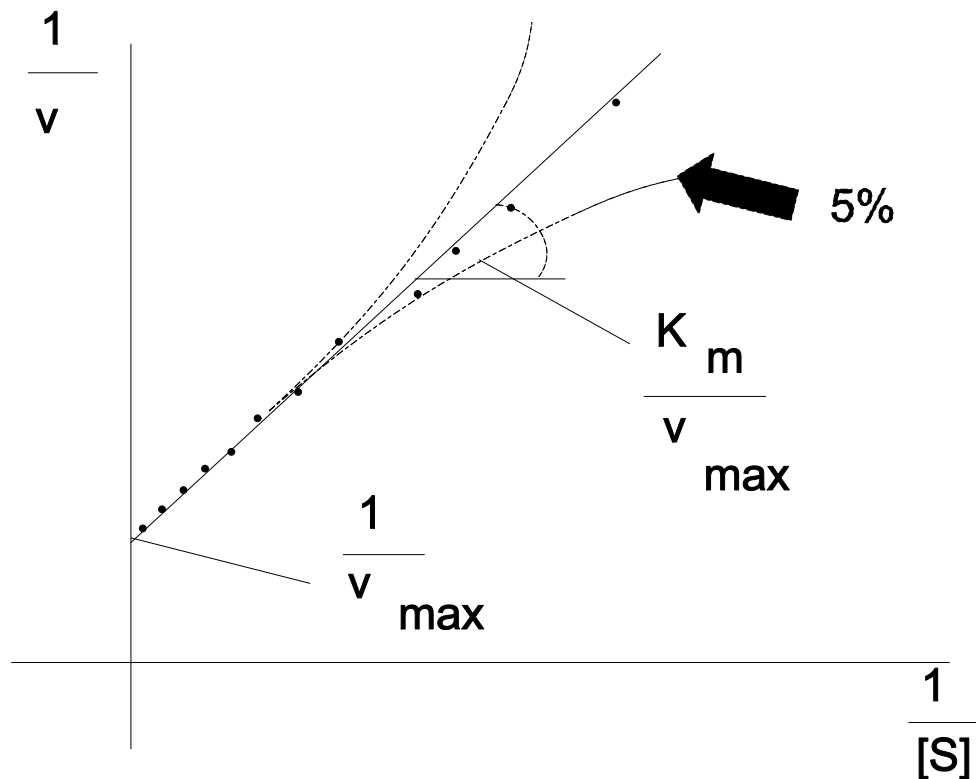


Lineweaver-Burk



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Αν κατασκευάσουμε διάγραμμα του $1/v$ ως προς $1/[S]$ θα πάρουμε ευθεία γραμμή με κλίση K_m/v_{\max} και διατομή στο $1/v_{\max}$.

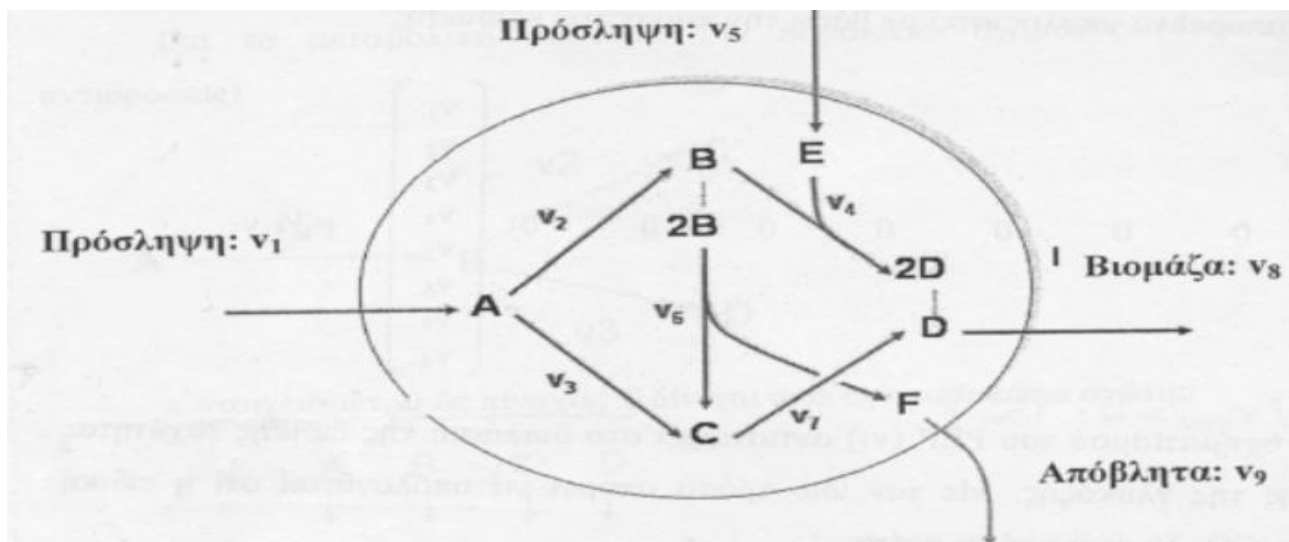


Όπως φαίνεται από το διάγραμμα η περιοχή των ορίων εμπιστοσύνης 5% μεγαλώνει για μικρές συγκεντρώσεις του υποστρώματος με αποτέλεσμα συνήθως να μπορούμε να εξάγουμε "καλές" τιμές για την παράμετρο v_{\max} (από την διατομή) αλλά όχι και για την παράμετρο K_m



Παράδειγμα

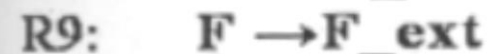
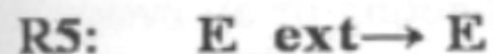
- Στο μεταβολικό δίκτυο του παρακάτω σχήματος εμφανίζονται τρεις διαφορετικές ροές.
 - Οι ροές εισόδου μεταβολικών στο εσωτερικό του κυττάρου
 - Οι ενδοκυτταρικές ροές που σχετίζονται με την εξέλιξη του μεταβολικού δικτύου στο εσωτερικό του κυττάρου
 - Οι ροές εξόδου προϊόντων εκτός του κυττάρου





Παράδειγμα

- Η παραπάνω γραφική παράσταση μπορεί να αναπαρασταθεί στη μορφή πίνακα $M_{\eta \times n}$ όπου M ο αριθμός των ενδοκυτταρικών μεταβολιτών και η ο αριθμός των αντιδράσεων



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
A	+1	-1	-1						
B		+1		-1		-2			
C			+1			+1	-1		
D				2			+1	-1	
E				-1	+1				
F						+1			-1



Παράδειγμα

- R1-R9: οι αντιδράσεις του μεταβολικού δικτύου, με την ειδική ταχύτητα r σχηματισμού των μεταβολιτών στη σταθερή κατάσταση να δίνεται από τους τύπους

$$r_A = dA/dt = v_1 - v_2 - v_3 = 0$$

$$r_B = dB/dt = v_2 - 2v_6 - v_4 = 0$$

$$r_C = dC/dt = v_3 + v_6 - v_7 = 0$$

$$r_D = dD/dt = v_7 + 2v_4 - v_8 = 0$$

$$r_E = dE/dt = v_5 - v_4 = 0$$

$$r_F = dF/dt = v_6 - v_9 = 0$$



Παράδειγμα

- Σύμφωνα με την εξίσωση $r = \Gamma^T v$ μπορεί να γραφεί ότι:

$r =$

1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
0	1	0	-1	0	-2	0	0	0
0	0	1	0	0	1	-1	0	0
0	0	0	2	0	0	1	-1	0
0	0	0	-1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	-1

 v

Άνυσμα της ταχύτητας σχηματισμού των μεταβολιτών

Άνυσμα των ροών των ταχυτήτων στη σταθερά κατάσταση

Και

όπου $r = dX/dt$ και $X =$

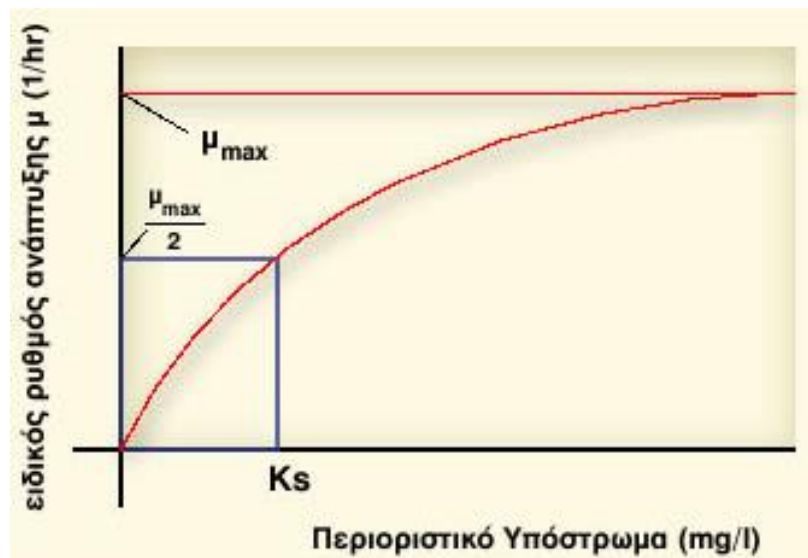
A
B
C
D
E
F



Μοντέλα ανάπτυξης

- Ανάπτυξη που περιορίζεται από το υπόστρωμα
- Μοντέλο – Monod

Η αύξηση της βιομάζας εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο μέσο ανάπτυξης, όταν ένα θρεπτικό συστατικό καταστεί περιοριστικό τότε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ μεταβάλλεται όπως στο σχήμα.



Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται παραδοχή ότι το υπόστρωμα S επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης ενώ οποιαδήποτε άλλη αλλαγή στη συγκέντρωση των θρεπτικών δεν έχει επίδραση.



Το μοντέλο Monod



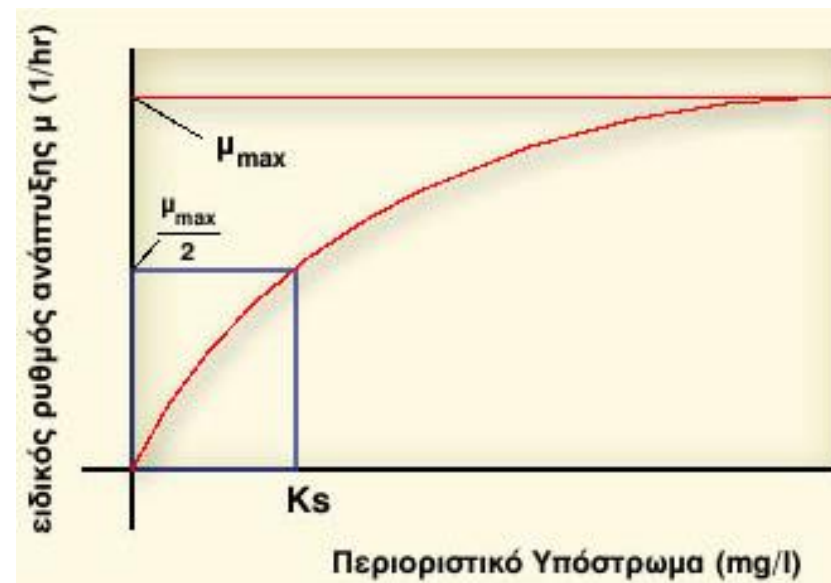
$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$$

όπου:

S : περιοριστικό υπόστρωμα (mg/L)

K_S : σταθερά κορεσμού (ίση με την συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ίσος με το ήμισυ του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης)

μ_{\max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης





Εναλλακτικές εξισώσεις



- Η εξίσωση Monod είναι ημιεμπειρική και η υπόθεση στην οποία είναι δομημένη δεν ισχύει σε πραγματικά συστήματα.
- Η Monod μπορεί να περιγράψει την ανάπτυξη που καθορίζεται από το υπόστρωμα μόνο όταν είναι αργή και η πυκνότητα του κυτταρικού πληθυσμού χαμηλή.
- Η ανάγκη περιγραφής των συστημάτων ώθησε στην ανάπτυξη εξισώσεων
- Όλες μπορούν να περιγραφούν από μια διαφορικές εξισώσεις όπου $V = \mu g / \mu_{max}$, S είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος, και K , α και β διαφορετικές σταθερές



Εναλλακτικές εκφράσεις



(α) **Teissier:**

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - e^{-\frac{[S]}{K_S}} \right)$$

(β) **Moser:**

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]^n}{K_S + [S]^n}$$

(γ) **Contois:**

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{Bx + [S]}$$



Εναλλακτικές Εκφράσεις



(δ) **Powell:**

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{(K_S + K_D) + [S]}$$

(ε) **Blackman** (ή μοντέλο δύο φάσεων):

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{[S]}{2K}, [S] < 2K$$

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = 1, [S] > 2K$$

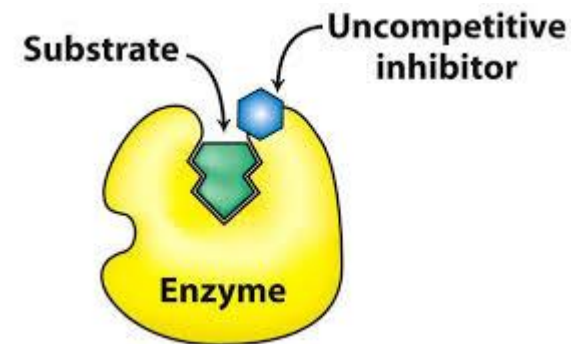
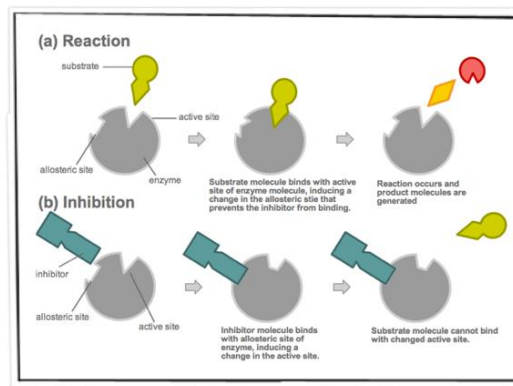
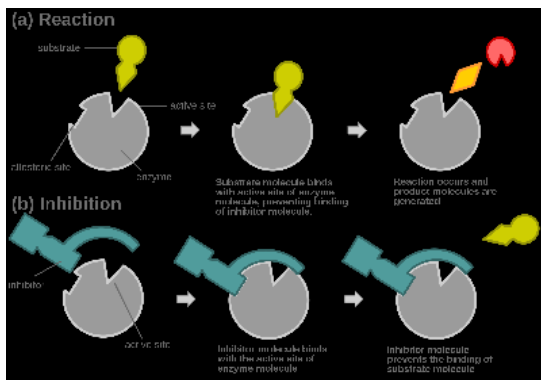
(στ) **Dabes:**

$$[S] = \mu K + \frac{\mu - K_S}{\mu_{\max} - \mu}$$



Αναστολείς

- Ανταγωνιστική αναστολή. Όταν αυξάνει η τιμή του K_M και μένει αμετάβλητη η τιμή του V_{max} .
- Μη ανταγωνιστική. Όταν μειώνεται η τιμή V_{max} , αλλά μένει αμετάβλητη η τιμή του K_M .
- Ασυναγώνιστη αναστολή. Όταν μειώνεται η τιμή K_m και η τιμή V_{max} .





Μοντέλα με αναστολές ανάπτυξης

- Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ή προϊόντων και παρουσία ανασταλτικών ουσιών στο θρεπτικό υλικό, παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης και ο ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναστολέα I .
- Το μοντέλο μικροβιακής και ενζυμικής αναστολής είναι ανάλογο, με τις κινητικές σταθερές να έχουν μικρή σημασία.
- Τα κινητικά δεδομένα στις περιπτώσεις αυτές προκύπτουν από προσαρμογή πειραματικών δεδομένων.
- **Αναστολή από το υπόστρωμα**. Υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος είναι δυνατό να οδηγήσουν σε αναστολή του ρυθμού μικροβιακής ανάπτυξης.
 - Μπορεί να πάρει τη μορφή της πλήρους μη συναγωνιστικής

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_S}{S}\right)\left(1 + \frac{S}{K_I}\right)}$$

- Και της πλήρους συναγωνιστικής
- K_I η σταθερά αναστολής από το υπόστρωμα

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{K_S \left(1 + \frac{S}{K_I}\right) + S}$$



Μοντέλα αναστολής από το προϊόν

- Αναστολή από το προϊόν: υψηλές συγκεντρώσεις προϊόντων P είναι δυνατό να οδηγήσει σε αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης. Μπορεί και αυτή να πάρει τη μορφή της:

πλήρως συναγωνιστικής

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

πλήρως μη συναγωνιστική

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_S}{S}\right) \left(1 + \frac{S}{K_P}\right)}$$

Η EtOH από τη ζύμωση γλυκόζης αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μη συναγωνιστική αναστολή από το προϊόν με την EtOH να είναι ο αναστολέας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 5%



Αναστολή από τοξικές ουσίες

- Μπορεί να πάρει τρεις μορφές
 - Πλήρως συναγωνιστική

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{K_S \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S}$$

- Πλήρως μη συναγωνιστική

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_S}{S}\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$

- Ασυναγώνιστη αναστολή

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{\left(\frac{K_S}{1 + \frac{I}{K_I}} + S\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$



ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΟΤΗΤΑ



$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\frac{v_{mf}}{K_S}[S] - \frac{v_{mp}}{K_P}[P]}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}}$$

από τα ισοζύγια μάζας και χρησιμοποιώντας την υπόθεση ψευδομόνιμης κατάστασης για το ενδιάμεσο σύμπλοκο



$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\frac{v_{mf}}{K_S} [S] - \frac{v_{mp}}{K_P} [P]}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}}$$

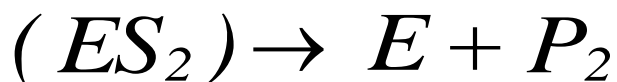
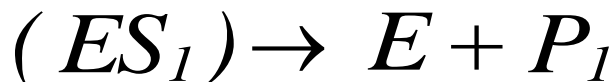
- Η εξίσωση ανάγεται στην έκφραση Michaelis-Menten για $[S]=0$ ή για $[P]=0$.
- Οι κινητικές σταθερές v_{mf}, K_S και v_{mp}, K_P δεν είναι παρά ο **μέγιστος ρυθμός αντίδρασης και η σταθερά κορεσμού των δύο μεταξύ τους αντίστροφων ενζυματικών αντιδράσεων $S \rightarrow P$ και $P \rightarrow S$** αντίστοιχα.
- Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων διεξάγουμε δύο σειρές από πειράματα προσδιορισμού του αρχικού ρυθμού, αρχίζοντας με $[P]=0$ για το ένα σεί και με $[S]=0$ για το άλλο.



ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΔΡΩΝΤΑ ΣΕ ΕΝΑ ΕΝΖΥΜΟ

Όταν στο διάλυμα περιέχονται περισσότερα από ένα υποστρώματα συνήθως παρατηρείται **ανταγωνισμός** για τα μόρια του ενζύμου.

Στην πιο απλή περίπτωση ας θεωρήσουμε την ύπαρξη δύο υποστρωμάτων τα οποία αντιδρούν σύμφωνα με τις αντιδράσεις:





Σ' αυτή την περίπτωση διακρίνουμε δύο συνολικές αντιδράσεις, μία για το κάθε υπόστρωμα με ρυθμό v_i όπου:

$$-\frac{d[S_i]}{dt} = v_i = \frac{k_i E_o \frac{[S_i]}{K_i}}{1 + \frac{[S_1]}{K_1} + \frac{[S_2]}{K_2}}$$

- K_i η σταθερά ισορροπίας της αντίστοιχης αντίδρασης συμπλοκοποίησης
- k_i οι κινητικές σταθερές των αντιδράσεων παραγωγής προϊόντων

Αν ορίσουμε

$$S_T = [S_1] + [S_2]$$



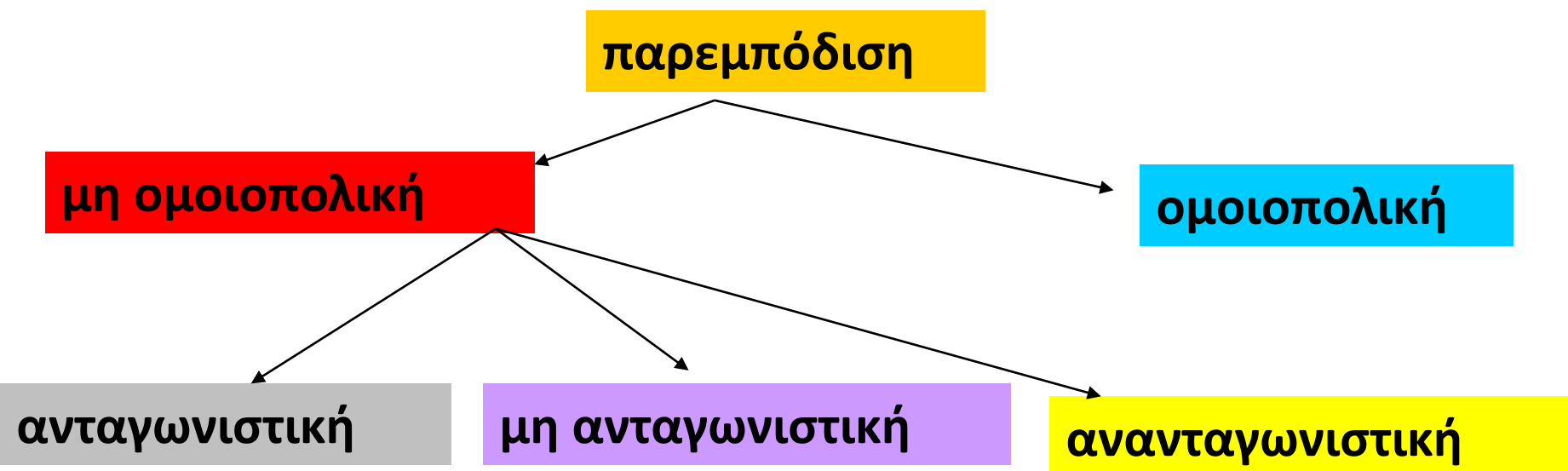
$$v_T = \frac{dS_T}{dt} = \frac{(k_1 \frac{[S_1]}{K_1} + k_2 \frac{[S_2]}{K_2}) E_o}{1 + \frac{[S_1]}{K_1} + \frac{[S_2]}{K_2}} \neq \frac{v_{\max} S_T}{K_m + S_T}$$

- **Δεν** μπορούμε να θεωρήσουμε το άθροισμα των δύο υποστρωμάτων ως ένα μοναδικό υπόστρωμα.
- Κλασσικό παράδειγμα οι αντιδράσεις αποπολυμερισμού (αποδόμησης πολυμερών)



ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

- **Παρεμποδιστής**: ένωση που επηρεάζει είτε παροδικά είτε μόνιμα την ενεργότητα των ενζύμων
- Η αντιστρεπτή παρεμπόδιση αποτελεί και τον βασικό μηχανισμό **ρύθμισης** της ενζυμικής ενεργότητας των μεταβολικών αντιδράσεων





ΜΗ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ

- Το είδος μπορούμε να το προσδιορίσουμε από διάγραμμα **Lineweaver-Burk**.
- Ανάλογα με την συγκέντρωση του παρεμποδιστή:
 - **ανταγωνιστική παρεμπόδιση:** ευθείας επηρεάζεται μόνο η κλίση της
 - **μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση:** επηρεάζεται μόνο η διατομή
 - **ανανταγωνιστική παρεμπόδιση:** επηρεάζονται και η κλίση και η διατομή



Ανταγωνιστική παρεμπόδιση



Ο παρεμποδιστής αντιδρά μόνο με το ελεύθερο ένζυμο



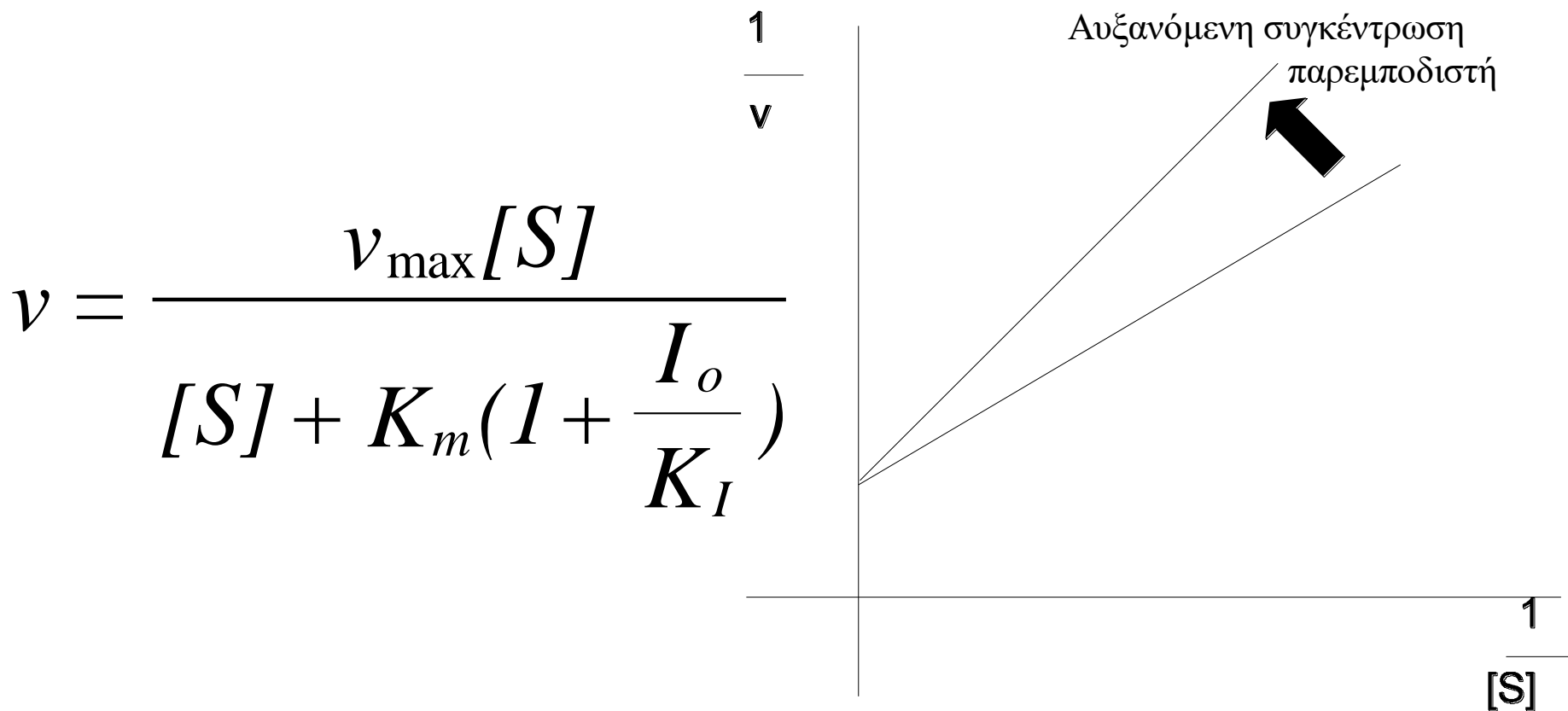
Θεωρώντας $[EI] \ll$ ολική συγκέντρωση παρεμποδιστή I_o , και γρήγορη ισορροπία για την αντίδραση συμπλοκοποίησης του παρεμποδιστή:

$$K_I = \frac{[E]I_o}{[EI]}$$

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{I_o}{K_I}\right)}$$



Ανταγωνιστική παρεμπόδιση





Μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση



Ο παρεμποδιστής αντιδρά μόνο με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και μόνο, καθιστώντας το ανενεργό σύμφωνα με τον μηχανισμό:

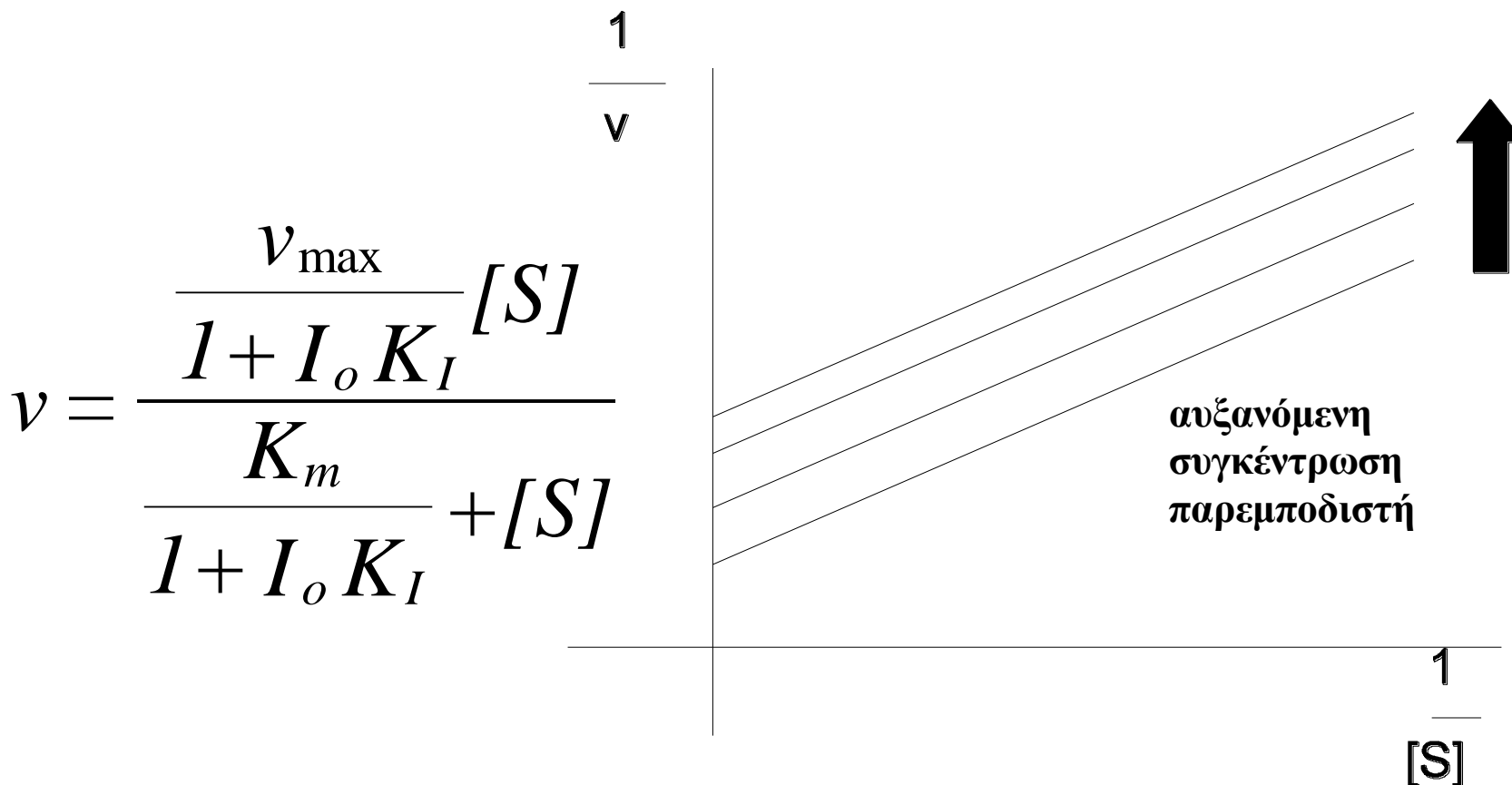


Αν οι σταθερές ισορροπίας για τις αντιδράσεις είναι K_m και K_I αντίστοιχα:

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{1 + I_o K_I} [S]}{\frac{K_m}{1 + I_o K_I} + [S]}$$



Μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση

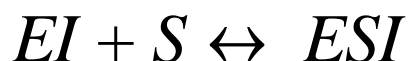




Ανανταγωνιστική παρεμπόδιση



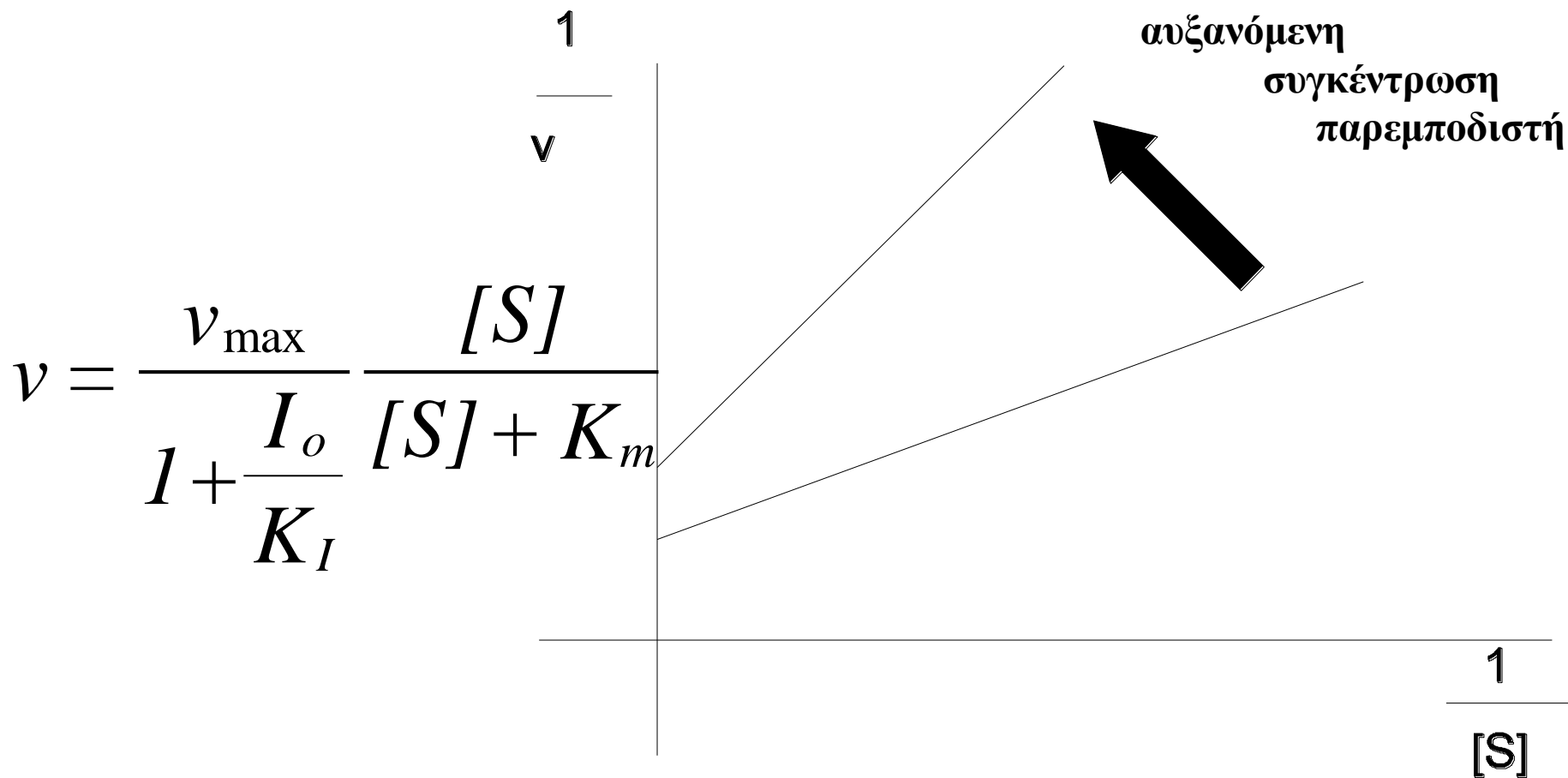
- τόσο το E όσο και το ES αντιδρούν με τον παρεμποδιστή I με την ίδια ευχέρεια.
- το E και το EI αντιδρούν με το υπόστρωμα S με την ίδια ευχέρεια
- Το EIS είναι ανενεργό.



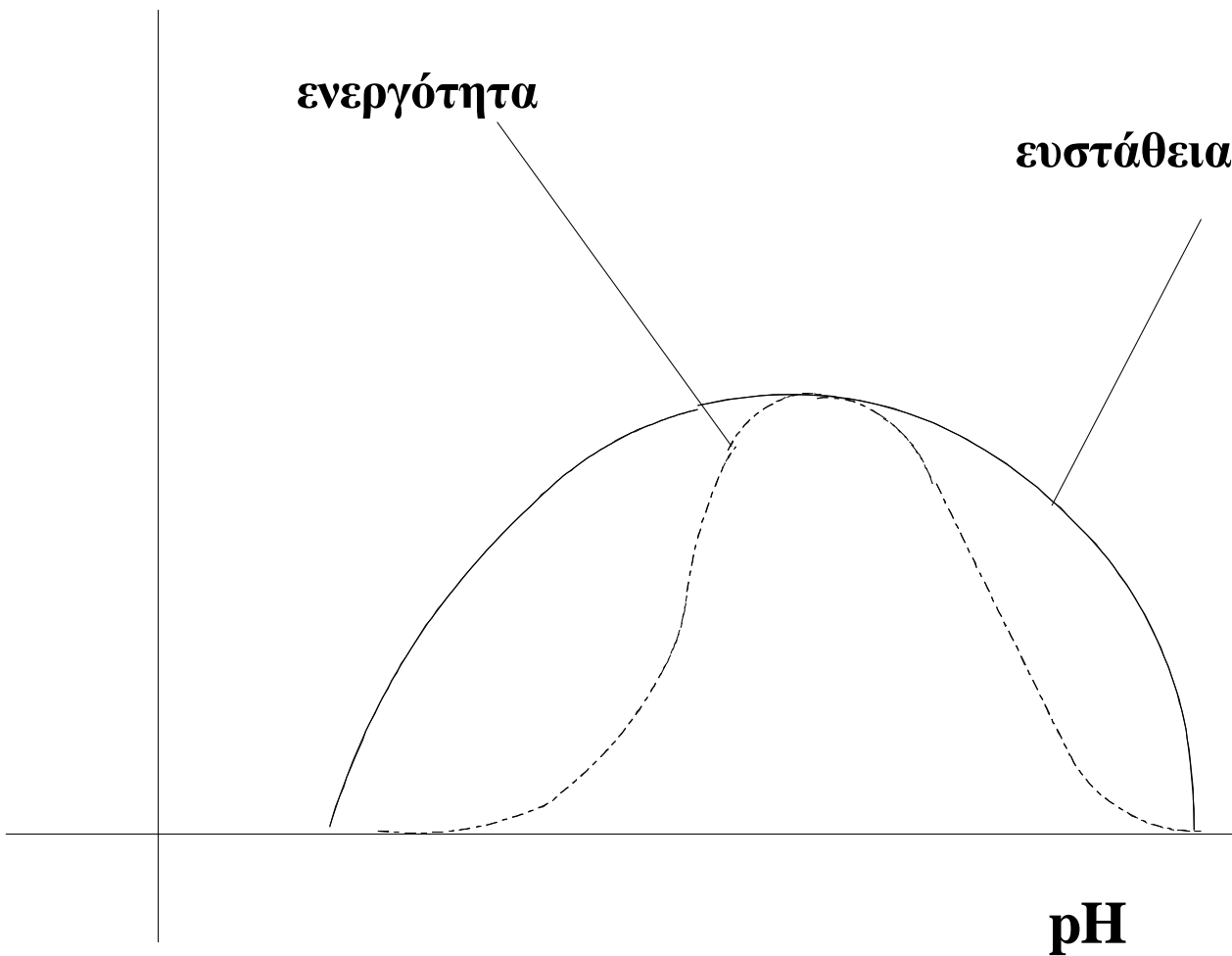
$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{I_0}{K_I}} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$



Ανανταγωνιστική παρεμπόδιση

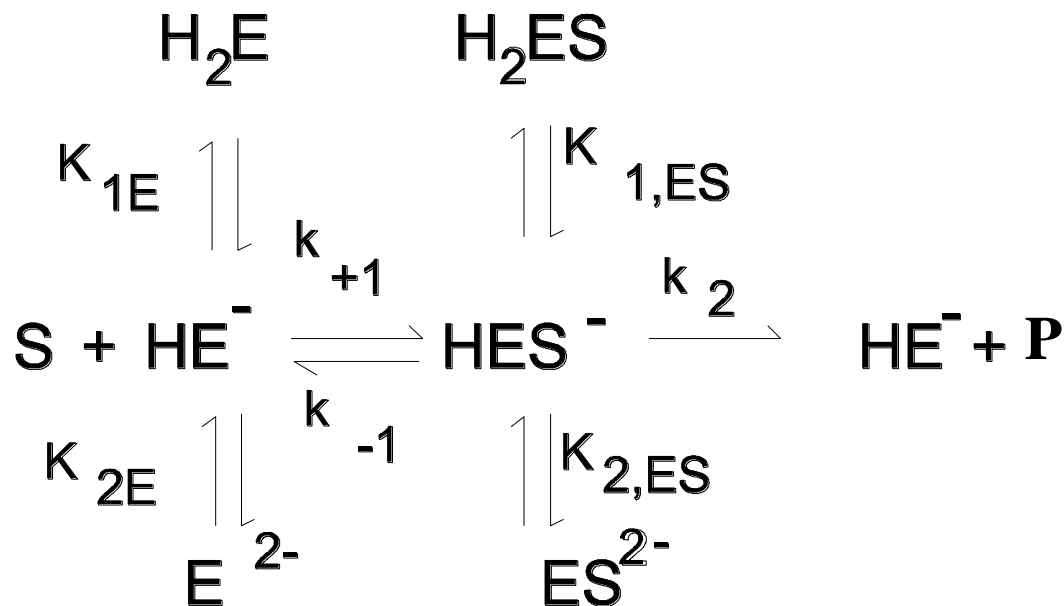


ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH





ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH



- το ένζυμο (ανάλογα με το pH) μπορεί να βρίσκεται σε τρεις καταστάσεις ιοντισμού (H_2E , HE^- και E_2^-) από τις οποίες μόνο η ενδιάμεση HE^- θεωρείται **ενεργή**



ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

$$(pH)_{\beta\epsilon\lambda\tau.} = -\log_{10} \sqrt{K_{1,ES} K_{2,ES}}$$

$$V_{\max}^{\phi\alpha\iota\nu.} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_{2,ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{1,ES}}}$$

$$K_m^{\phi\alpha\iota\nu.} = K_m \frac{1 + \frac{K_{2,E}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{1,E}}}{1 + \frac{K_{2,ES}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{1,ES}}}$$

$$K_m^{\phi\alpha\iota\nu.} \approx K_m$$



***Thank you for your kind
attention***



www.enve-lab.eu

A connectivity perspective to environmental health