

Úloha 9-22 Diagnostika inhibovaných enzymových reakcí

Inhibice působení arginasy na argirin, vyvolaná přítomností ornithinu byla sledována při teplotě 37°C a pH 8,4 měřením počátečních reakčních rychlostí při různých koncentracích argirinu a inhibitoru. Poměr počáteční rychlosti v nepřítomnosti inhibitoru (v) a v přítomnosti inhibitoru (v_i) je uveden ve třetím sloupci následující tabulky:

c_S (arginin) mol dm^{-3}	c_I (ornithin) mol dm^{-3}	v/v_i	c_S (arginin) mol dm^{-3}	c_I (ornithin) mol dm^{-3}	v/v_i
0,0223	0,0890	9,1	0,0667	0,0667	3,44
	0,0445	5		0,0334	2,17
	0,0223	2,9		0,0167	1,61
	0,0111	1,89		0,00834	1,30
0,0297	0,0297	3,06	0,089	0,0890	3,42
	0,0148	1,98		0,0445	2,20
	0,0074	1,47		0,0223	1,63
				0,0111	1,31
0,0445	0,0445	3,33		0,00556	1,16
	0,0223	2,18			
	0,0111	1,57			

Rozhodněte, zda se jedná o plně kompetitivní nebo plně nekompetitivní inhibici a stanovte hodnoty disociačních konstant pro systém arginasa-arginin (K_M) a arginasa-ornithin (K_I).

Řešení:

plně nekompetitivní

$$\frac{1}{v_i} = \underbrace{\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{1}{v_{\max} \cdot K_I}}_{\text{směrnice}} \cdot c_I \quad [1]$$

plně kompetitivní

Dixon:

$$\frac{1}{v_i} = \underbrace{\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{úsek}} + \underbrace{\left(\frac{K_M}{v_{\max} \cdot K_I \cdot c_S}\right)}_{\text{směrnice}} \cdot c_I \quad [2]$$

Hunter a Downs:

$$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} = K_I \quad [3]$$

$$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} = \underbrace{K_I}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_I}{K_M}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S \quad [4]$$

Graf podle Dixona (obr. 1) je přímkový pro oba případy. Plně kompetitivní a plně nekompetitivní je možno odlišit závislostí podle Huntera a Downse – pro plně nekompetitivní inhibici výraz $\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i}$ nezávisí na koncentraci inhibitoru ani na koncentraci substrátu (viz obr. 9.12b), pro plně kompetitivní inhibici $\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i}$ je lineárně závislý na c_S .

Je zadán poměr v/v_i , pomocí něhož vyjádříme levou stranu rovnice Huntera a Downse:

$$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} = \frac{c_I}{\frac{v}{v_i} - 1}$$

c_s (arginin)	c_i (ornithin)	v/v_i	$\frac{c_i \cdot v_i}{v - v_i}$
mol dm ⁻³	mol dm ⁻³		mol dm ⁻³
0,0223	0,089	9,1	0,01099
0,0223	0,0445	5	0,01113
0,0223	0,0223	2,9	0,01174
0,0223	0,0111	1,89	0,01247
0,0297	0,0297	3,06	0,01442
0,0297	0,0148	1,98	0,01510
0,0297	0,0074	1,47	0,01574
0,0445	0,0445	3,33	0,01910
0,0445	0,0223	2,18	0,01890
0,0445	0,0111	1,57	0,01947
0,0667	0,0667	3,44	0,02734
0,0667	0,0334	2,17	0,02855
0,0667	0,0167	1,61	0,02738
0,0667	0,00834	1,3	0,02780
0,089	0,089	3,42	0,03678
0,089	0,0445	2,2	0,03708
0,089	0,0223	1,63	0,03540
0,089	0,0111	1,31	0,03581
0,089	0,00556	1,16	0,03475

Z tabulky a obr. 1 je patrné, že závislost $\frac{c_i \cdot v_i}{v - v_i}$ na c_s je lineární \Rightarrow jedná se tedy o plně kompetitivní inhibici.

Z porovnání vztahu [4] s rovnicí získanou lineární regreseí zadaných dat (viz obr. 1) dostaneme

$$\text{úsek} = K_I = 0,0036512 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$\text{směrnice} = \frac{K_I}{K_M} = 0,3620134$$

$$K_M = \frac{K_I}{0,3620134} = \frac{0,0036512}{0,3620134}$$

$$K_M = 0,01008581 \text{ mol dm}^{-3}$$

