

Úloha 9-24 Diagnostika inhibovaných enzymových reakcí

Byl zkoumán vliv různých inhibitorů na enzymové působení dehydrogenasy na pyrohroznan. Pro neinhibovanou reakci byly zjištěny konstanty $K_M = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a $v_{\max} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$. Všechny tři testované inhibitory mají akompetitivní účinky. Při koncentraci pyrohroznanu $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ byly získány tyto hodnoty počátečních rychlostí enzymové reakce (v $\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$):

c_I mol dm^{-3}	$10^5 v_i$		
	inhibitor A	inhibitor B	inhibitor C
0,003	1,515	1,375	1,626
0,010	1,250	1,053	1,538
0,022	0,961	0,839	1,400
0,035	0,769	0,739	1,290
0,060	0,556	0,652	1,111

Na základě těchto dat rozhodněte, jde-li o inhibici plnou nebo částečnou a v případě plné inhibice stanovte hodnoty inhibičních konstant K'_I .

Řešení:

$$v_{\max} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}.$$

$$K_M = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$c_S = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$$

Dixonův graf (obr. 9.11c) pro plnou akompetitivní inhibici je lineární

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K'_I}{v_{\max} \cdot K'_I} + \frac{c_I}{v_{\max} \cdot K'_I} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right) + \frac{c_I}{v_{\max} \cdot K'_I} \quad [1]$$

$$v'_{\max} = v_{\max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I} \quad [2] \quad , \quad K'_M = K_M \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I} \quad [3]$$

Z grafu je patrné, že v případech A a C jde o plnou akompetitivní inhibici.

Pro inhibitor A byla lineární regrese experimentálních dat získána rovnice

$$(1/v_i)_A = 6,0055 \cdot 10^4 + 1,997583 \cdot 10^6 \cdot c_I \quad [4]$$

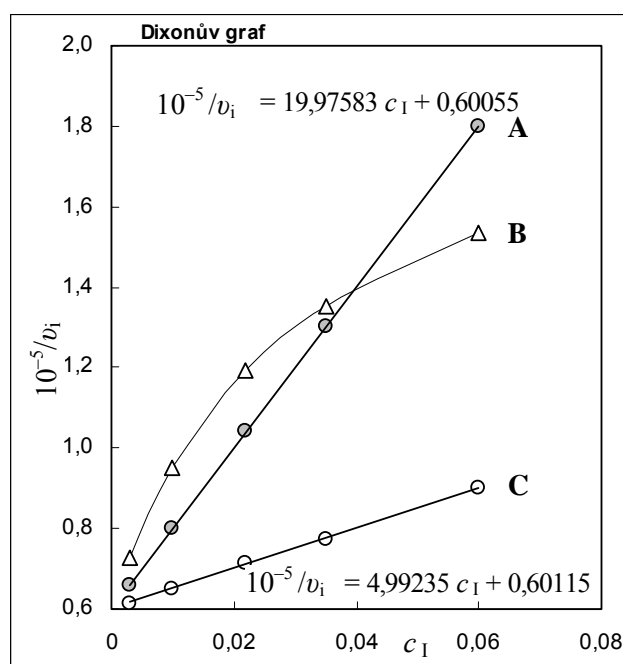
a pro inhibitor C

$$(1/v_i)_C = 6,0115 \cdot 10^4 + 4,99235 \cdot 10^5 \cdot c_I \quad [5]$$

Z rovnice [1] plyne, hodnota absolutního členu,

$$\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)$$

nezávisí na koncentraci inhibitoru. Musí mít tedy stejnou hodnotu pro všechny případy. Závislosti $1/v_i$ na c_I pro inhibitory A i C protínají svislou osu v jednom bodě o souřadnicích



$$c_I = 0$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S} \right) = \frac{1}{2,5 \cdot 10^{-5}} \cdot \left(1 + \frac{0,01}{0,02} \right) = 6 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}$$

Tato hodnota souhlasí s hodnotami absolutních členů v rovnicích [4] a [5].

Výpočet konstant K'_I

Porovnáním hodnot směrníc přímk [4], popř. [5] s rovnicí [1] pro konstanty K'_I dostaneme

$$\frac{1}{v_{\max} \cdot (K'_I)_A} = 1,997583 \cdot 10^6 \text{ s mol}^{-2} \text{ dm}^6 \quad (v_{\max} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$$

$$\Rightarrow (K'_I)_A = \frac{1}{2,5 \cdot 10^{-5} \cdot 1,997583 \cdot 10^6} = 0,020024 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$\frac{1}{v_{\max} \cdot (K'_I)_C} = 4,99235 \cdot 10^5 \text{ s mol}^{-2} \text{ dm}^6$$

$$\Rightarrow (K'_I)_C = \frac{1}{2,5 \cdot 10^{-5} \cdot 4,99235 \cdot 10^5} = 0,080123 \text{ mol dm}^{-3}$$

Pro částečnou akompetitivní inhibici má Dixonův graf hyperbolický průběh:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K'_I \cdot (K_M + c_S) + c_I \cdot c_S}{v_{\max} \cdot c_S \cdot (K'_I + \beta \cdot c_I)} \quad [6]$$

Tento tvar závislosti $1/v_i$ na c_I byl zjištěn u inhibitoru B.