

Úloha 9-23 Diagnostika inhibovaných enzymových reakcí

Analýzou kinetických dat získaných sledováním enzymatického působení hexakinasy ($M = 380 \text{ kg mol}^{-1}$) na substrát S při koncentraci enzymu $4,75 \text{ mg dm}^{-3}$ byla zjištěna pro Michaelisovu konstantu hodnota $K_M = 0,0035 \text{ mol dm}^{-3}$, pro molekulární aktivitu enzymu hodnota $k_2 = 250 \text{ s}^{-1}$. Za přítomnosti glukosa-6-fosfátu byly naměřeny tyto hodnoty počátečních reakčních rychlostí:

c_S	$10^6 v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$			
mol dm^{-3}	$c_I = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$	$c_I = 6,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$	$c_I = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	$c_I = 7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
0,0003	0,227	0,210	0,192	0,179
0,0015	0,863	0,800	0,729	0,682
0,0027	1,253	1,160	1,058	0,990
0,0039	1,517	1,404	1,280	1,198
0,0043	1,587	1,468	1,340	1,253
0,0058	1,795	1,660	1,516	1,417
0,0090	2,072	1,917	1,750	1,636
0,0120	2,228	2,062	1,882	1,760

Porovnejte průběh saturační křivky neinhibované a inhibované reakce. Určete povahu inhibičních účinků glukosa-6-fosfátu, sestavte rovnici pro závislost rychlosti inhibované reakce na koncentraci substrátu a inhibitoru a stanovte hodnoty konstant této rovnice.

Řešení:

Saturační křivka: závislost v_0 na c_S

Neinhibovaná reakce - výpočet: $v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S}$ [1]

$$K_M = 0,0035 \text{ mol dm}^{-3},$$

$$k_2 = 250 \text{ s}^{-1}.$$

$$w_{E0} = 4,75 \text{ mg dm}^{-3} = 4,75 \cdot 10^{-6} \text{ mg dm}^{-3}$$

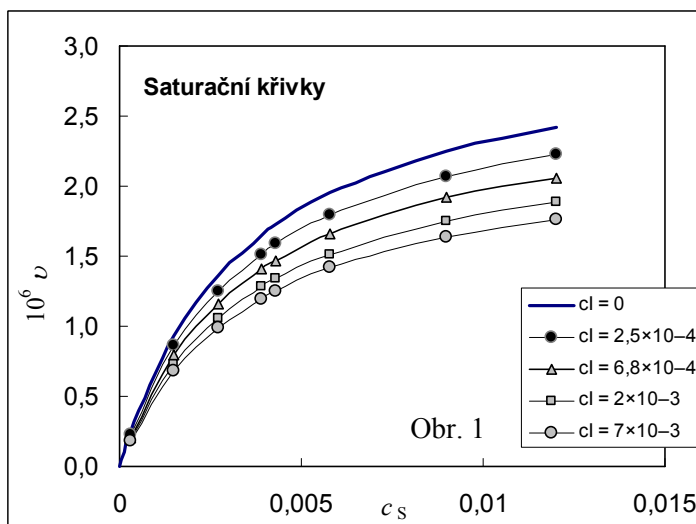
$$c_{E0} = \frac{w_{E0}}{M_E} = \frac{4,75 \cdot 10^{-6}}{380} = 1,25 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$M_E = 380 \text{ kg mol}^{-1}$$

$$v_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} = 250 \cdot 1,25 \cdot 10^{-8} = 3,125 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Tabulka 1 Saturační křivka neinhibované reakce

c_S mol dm^{-3}	$10^6 v$ $\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$
0	0
0,0003	0,247
0,0015	0,938
0,0027	1,361
0,0039	1,647
0,0043	1,723
0,0058	1,949
0,009	2,250
0,012	2,419



Průběh saturačních křivek odpovídá buď nekompetitivní inhibici (obr. 9.8a) nebo inhibici smíšené (obr. 9.10a).

Linearizace podle Eadiea

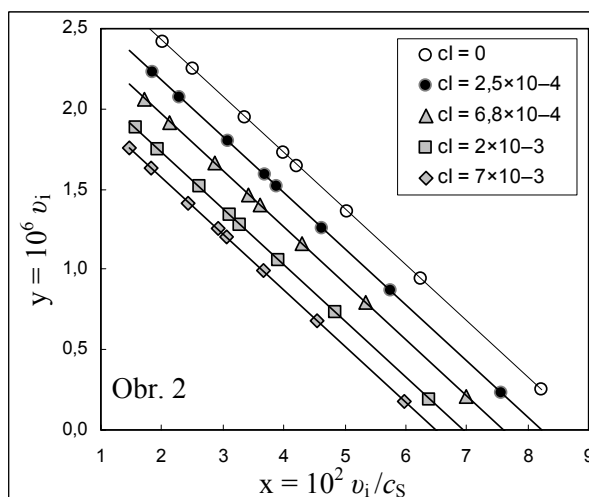
pro nekompetitivní inhibici soustava rovnoběžných přímek o stejné směrnici (viz obr. 9.8d), pro smíšenou inhibici svazek přímek protínajících se v jednom bodě (obr. 9.10d)

$$v_i = v'_{\max} - K'_M \cdot \frac{v_i}{c_S} \quad [2]$$

Tabulka 2

c_S	$c_I = 0$		$c_I = 2,5 \cdot 10^{-4}$		$c_I = 6,8 \cdot 10^{-4}$	
	v	v_i / c_S	v_i	v_i / c_S	v_i	v_i / c_S
0,0003	$2,467 \cdot 10^{-7}$	$8,224 \cdot 10^{-4}$	$2,270 \cdot 10^{-7}$	$7,567 \cdot 10^{-4}$	$2,100 \cdot 10^{-7}$	$7,000 \cdot 10^{-4}$
0,0015	$9,375 \cdot 10^{-7}$	$6,250 \cdot 10^{-4}$	$8,630 \cdot 10^{-7}$	$5,753 \cdot 10^{-4}$	$8,000 \cdot 10^{-7}$	$5,333 \cdot 10^{-4}$
0,0027	$1,361 \cdot 10^{-6}$	$5,040 \cdot 10^{-4}$	$1,253 \cdot 10^{-6}$	$4,641 \cdot 10^{-4}$	$1,160 \cdot 10^{-6}$	$4,296 \cdot 10^{-4}$
0,0039	$1,647 \cdot 10^{-6}$	$4,223 \cdot 10^{-4}$	$1,517 \cdot 10^{-6}$	$3,890 \cdot 10^{-4}$	$1,404 \cdot 10^{-6}$	$3,600 \cdot 10^{-4}$
0,0043	$1,723 \cdot 10^{-6}$	$4,006 \cdot 10^{-4}$	$1,587 \cdot 10^{-6}$	$3,691 \cdot 10^{-4}$	$1,468 \cdot 10^{-6}$	$3,414 \cdot 10^{-4}$
0,0058	$1,949 \cdot 10^{-6}$	$3,360 \cdot 10^{-4}$	$1,795 \cdot 10^{-6}$	$3,095 \cdot 10^{-4}$	$1,660 \cdot 10^{-6}$	$2,862 \cdot 10^{-4}$
0,009	$2,250 \cdot 10^{-6}$	$2,500 \cdot 10^{-4}$	$2,072 \cdot 10^{-6}$	$2,302 \cdot 10^{-4}$	$1,917 \cdot 10^{-6}$	$2,130 \cdot 10^{-4}$
0,012	$2,419 \cdot 10^{-6}$	$2,016 \cdot 10^{-4}$	$2,228 \cdot 10^{-6}$	$1,857 \cdot 10^{-4}$	$2,062 \cdot 10^{-6}$	$1,718 \cdot 10^{-4}$

c_S	$c_I = 2 \cdot 10^{-3}$		$c_I = 7 \cdot 10^{-3}$	
	v_i	v_i / c_S	v_i	v_i / c_S
0,0003	$1,920 \cdot 10^{-7}$	$6,400 \cdot 10^{-4}$	$1,790 \cdot 10^{-7}$	$5,967 \cdot 10^{-4}$
0,0015	$7,290 \cdot 10^{-7}$	$4,860 \cdot 10^{-4}$	$6,820 \cdot 10^{-7}$	$4,547 \cdot 10^{-4}$
0,0027	$1,058 \cdot 10^{-6}$	$3,919 \cdot 10^{-4}$	$9,900 \cdot 10^{-7}$	$3,667 \cdot 10^{-4}$
0,0039	$1,280 \cdot 10^{-6}$	$3,282 \cdot 10^{-4}$	$1,198 \cdot 10^{-6}$	$3,072 \cdot 10^{-4}$
0,0043	$1,340 \cdot 10^{-6}$	$3,116 \cdot 10^{-4}$	$1,253 \cdot 10^{-6}$	$2,914 \cdot 10^{-4}$
0,0058	$1,516 \cdot 10^{-6}$	$2,614 \cdot 10^{-4}$	$1,417 \cdot 10^{-6}$	$2,443 \cdot 10^{-4}$
0,009	$1,750 \cdot 10^{-6}$	$1,944 \cdot 10^{-4}$	$1,636 \cdot 10^{-6}$	$1,818 \cdot 10^{-4}$
0,012	$1,882 \cdot 10^{-6}$	$1,568 \cdot 10^{-4}$	$1,760 \cdot 10^{-6}$	$1,467 \cdot 10^{-4}$



Z obr. 2 je patrné, že jde o nekompetitivní inhibici. Lineární regresí byly získány konstanty rovnice [2] pro jednotlivé koncentrace inhibitoru:

Tabulka 3 Konstanty linearizované závislosti podle Eadiea

c_I	směrnice = K'_M	úsek = v'_{\max}
mol dm^{-3}	mol dm^{-3}	$\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$
0	$-3,5000 \cdot 10^{-3}$	$3,1250 \cdot 10^{-6}$
$2,50 \cdot 10^{-4}$	$-3,5048 \cdot 10^{-3}$	$2,8795 \cdot 10^{-6}$
$6,80 \cdot 10^{-4}$	$-3,5012 \cdot 10^{-3}$	$2,6636 \cdot 10^{-6}$
$2,00 \cdot 10^{-4}$	$-3,4987 \cdot 10^{-3}$	$2,4299 \cdot 10^{-6}$
$7,00 \cdot 10^{-4}$	$-3,5089 \cdot 10^{-3}$	$2,2751 \cdot 10^{-6}$

Michaelisova konstanta je dána průměrnou hodnotou směrnice:

$$K'_M = K_M = 3,5027 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

Na základě Dixonova grafu (obr. 3) rozhodneme, jde-li o plně nekompetitivní (lineární závislost) nebo částečně nekompetitivní (hyperbolický průběh) inhibici.

Inhibice je částečně nekompetitivní

Pro konstanty rychlostní rovnice platí

$$K'_M = K_M \quad [3]$$

a

$$v'_{\max} = \left(\frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I} \right) \cdot v_{\max} \quad [4]$$

Rovnici [4] převedeme na tvar

$$\frac{v'_{\max}}{v_{\max}} = \beta + K_I \left(\frac{1 - v'_{\max} / v_{\max}}{c_I} \right) \quad [4]$$

který, jak ukazuje obr. 4, představuje v souřadnicích $\frac{v'_{\max}}{v_{\max}}$ a $z \equiv \frac{1}{c_I} \cdot \left(1 - \frac{v'_{\max}}{v_{\max}} \right)$ přímku

se směrnicí $K_I = 7 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
a úsekem $\beta = 0,7$

$\frac{v'_{\max}}{v_{\max}}$	$z \equiv \frac{1}{c_I} \cdot \left(1 - \frac{v'_{\max}}{v_{\max}} \right)$
0,92144	314,240
0,85235	217,129
0,77757	111,216
0,72803	38,853

