

Úloha 9-20 Diagnostika inhibovaných enzymových reakcí

Při syntéze purinů byl sledován vliv azaserinu, který má inhibiční účinky:

c_S	$10^6 v$	$10^6 v_i$			
		$c_I = 0,004$	$c_I = 0,012$	$c_I = 0,03$	$c_I = 0,05$
0,005	1,000	0,937	0,831	0,662	0,540
0,008	1,429	1,344	1,200	0,968	0,797
0,012	1,875	1,772	1,594	1,300	1,080
0,018	2,368	2,250	2,040	1,690	1,418
0,022	2,620	2,493	2,271	1,894	1,600
0,035	3,182	3,045	2,802	2,377	2,034
0,048	3,530	3,390	3,138	2,690	2,324
0,060	3,750	3,609	3,355	2,900	2,516

v je počáteční rychlost neinhibované enzymové reakce ($\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$), v_i počáteční rychlost enzymové reakce za přítomnosti inhibitoru ($\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$), c_S koncentrace substrátu (mol dm^{-3}), c_I koncentrace inhibitoru (mol dm^{-3}). Posuďte charakter inhibičního účinku azaserinu, najděte rovnici popisující závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu a inhibitoru a stanovte hodnoty konstant.

Řešení:

Pro rychlost inhibované reakce platí

$$v_i = \frac{v'_{\max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \quad [1]$$

Pro výpočet konstant K'_M a v'_{\max} zvolíme např. linearizaci podle [Lineweavera a Burka](#):

$$\underbrace{\frac{1}{v_i}}_y = \underbrace{\frac{K'_M}{v'_{\max}}}_A \cdot \underbrace{\frac{1}{c_S}}_x + \underbrace{\frac{1}{v'_{\max}}}_B \quad [2]$$

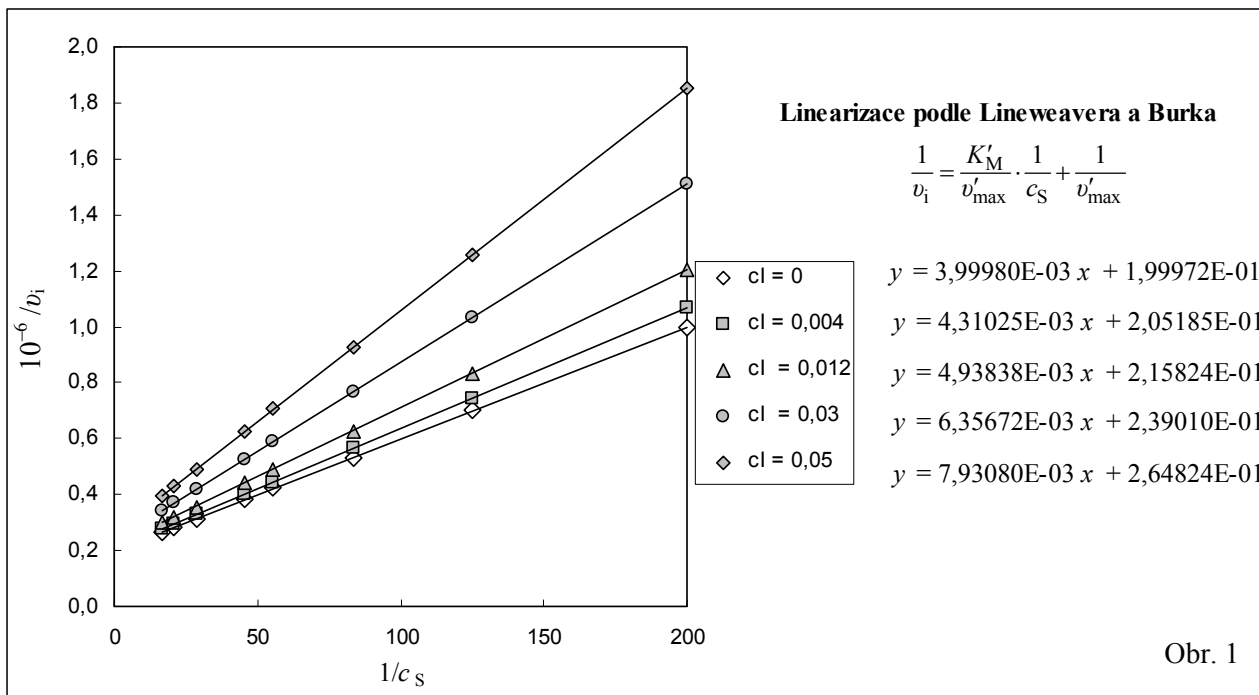
Tabulka 1

$1/c_S = x$	$10^{-6}/v_i = y$				
	$c_I = 0$	$c_I = 0,004$	$c_I = 0,012$	$c_I = 0,03$	$c_I = 0,05$
200	1,0000	1,0672	1,2034	1,5106	1,8519
125	0,6998	0,7440	0,8333	1,0331	1,2547
83,3333	0,5333	0,5643	0,6274	0,7692	0,9259
55,5556	0,4223	0,4444	0,4902	0,5917	0,7052
45,4545	0,3817	0,4011	0,4403	0,5280	0,6250
28,5714	0,3143	0,3284	0,3569	0,4207	0,4916
20,8333	0,2833	0,2950	0,3187	0,3717	0,4303
16,6667	0,2667	0,2771	0,2981	0,3448	0,3975

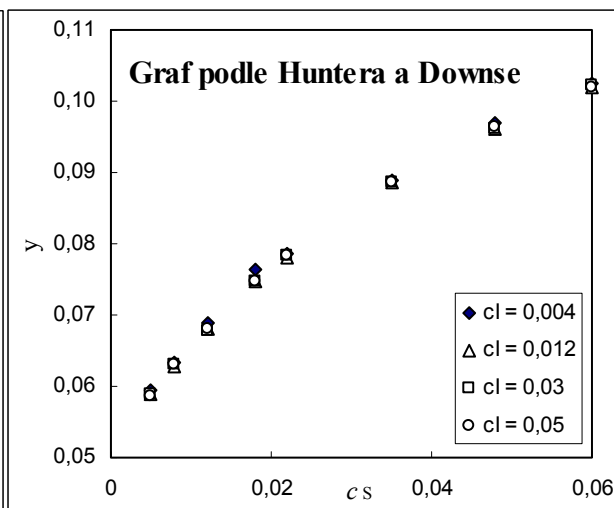
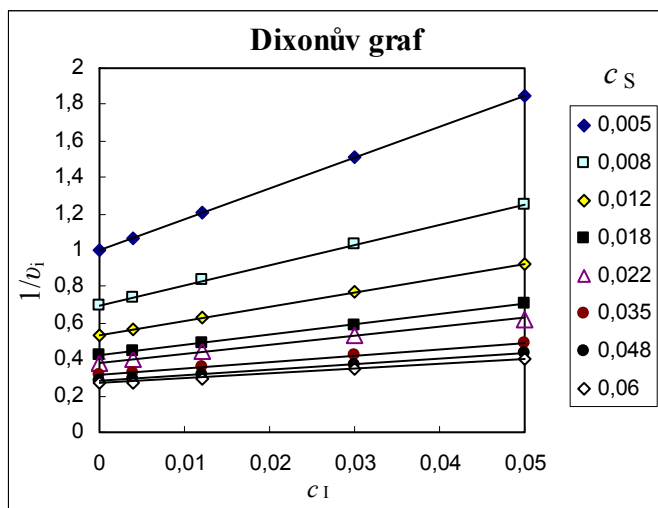
Pro jednotlivé koncentrace inhibitoru byly vypočteny konstanty A a B lineárních závislostí [1] a z jejich hodnot parametry rovnice Michaelise a Mentenové pro inhibovanou reakci, v'_{\max} a K'_M , které jsou uvedeny v tab. 2.

Tabulka 2

c_I	$A = 10^{-6} K'_M / v'_{\max}$	$B = 10^{-6} / v'_{\max}$	$10^6 v'_{\max} = 1/B$	$K'_M = A \cdot v'_{\max}$
0	$3,9998 \cdot 10^{-3}$	0,2000	5,001	$2,0002 \cdot 10^{-2}$
0,004	$4,3103 \cdot 10^{-3}$	0,2052	4,874	$2,1007 \cdot 10^{-2}$
0,012	$4,9384 \cdot 10^{-3}$	0,2158	4,633	$2,2882 \cdot 10^{-2}$
0,03	$6,3567 \cdot 10^{-3}$	0,2390	4,184	$2,659 \cdot 10^{-2}$
0,05	$7,9308 \cdot 10^{-3}$	0,2648	3,776	$2,9947 \cdot 10^{-2}$



Typ inhibice určíme pomocí Dixonova grafu a grafu Huntera a Downse.



Dixonův graf (obr. 2) je lineární. Z obr. 9-11 plyne, že jde buď o částečnou (kompetitivní, nekompetitivní, nebo akompetitivní) inhibici nebo o inhibici smíšenou. Hodnoty obou parametrů, v'_{\max} i K'_M , jsou závislé na koncentraci inhibitoru. U kompetitivní inhibice je $v'_{\max} = v_{\max}$ pro všechny c_I , u nekompetitivní inhibice je $K'_M = K_M$, takže zbývá částečně akompetitivní nebo

smíšená inhibice. Rozlišení mezi těmito typy provedeme podle grafu Huntera a Downse. Jeho tvar (obr. 3) odpovídá *smíšené inhibici*. Podle tabulky 9-1 pro parametry rychlostní rovnice platí

$$v'_{\max} = v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I / \alpha} \quad \text{a} \quad K'_M = K_M \cdot \left(\frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha} \right) \quad [3] \text{ a } [4]$$

Konstanta A v závislosti [2] podle Lineweavera a Burka je lineární funkcí c_I (obr. 4)

$$A = \frac{K'_M}{v'_{\max}} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max} \cdot K_I} \cdot c_I \quad [5]$$

Hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové pro neinhibovanou reakci udává první řádek tabulky 2:

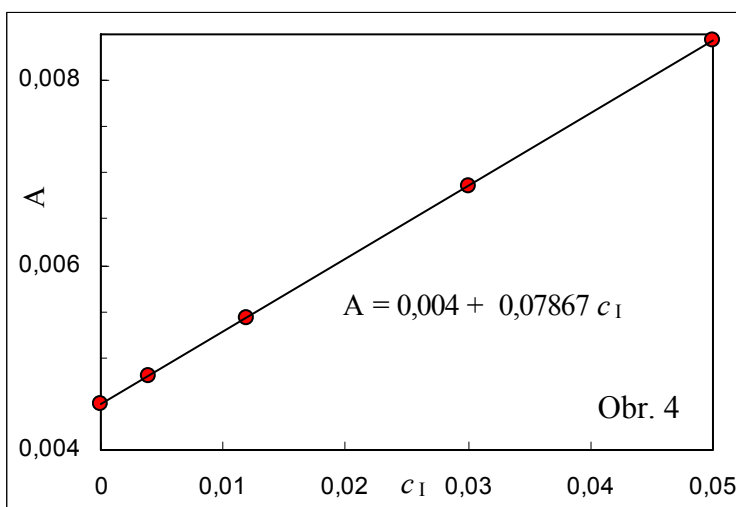
$$v_{\max} = 5,001 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \quad \text{a} \quad K_M = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$$

Z porovnání vztahu [5] s rovnicí (viz obr. 4) získanou lineární regresí hodnot A (tab. 2) vypočteme konstantu K_I :

$$\frac{K_M}{v_{\max}} = 0,004$$

$$\frac{K_M}{v_{\max} \cdot K_I} = 0,07867$$

$$K_I = \frac{0,004}{0,07867} = 0,050845$$



Z rovnice [3] plyne, že poměr maximální rychlosti neinhibované a inhibované reakce je lineární funkcí koncentrace inhibitoru,

$$\frac{v_{\max}}{v'_{\max}} = 1 + \frac{1}{K_I \cdot \alpha} \cdot c_I$$

a tedy

$$\frac{1}{K_I \cdot \alpha} = 6,4964$$

Pomocí konstanty K_I , vypočtené v předchozím kroku, získáme

$$\alpha = \frac{1}{0,050845 \cdot 6,4964} = 3,0275$$

