

Úloha 9-25 Diagnostika inhibovaných enzymových reakcí

Působení lysozymu (molární hmotnost 14300 g/mol, molekulární aktivita $k_2 = 0,5 \text{ s}^{-1}$) v koncentraci $0,858 \text{ mg cm}^{-3}$ na substrát S bez přítomnosti inhibitoru je charakterizováno Michaelisovou konstantou $K_M = 0,085 \text{ mol dm}^{-3}$. Pro tutéž enzymovou reakci byly v přítomnosti inhibitoru naměřeny hodnoty počátečních reakčních rychlostí v_i ($\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$) při různých koncentracích substrátu c_S (v mol dm^{-3}) a inhibitoru c_I v (mol dm^{-3}):

c_S	c_I	$10^6 v_i$	c_S	c_I	$10^6 v_i$
0,007	0,005	2,102	0,075	0,005	13,400
	0,01	1,954		0,01	12,824
	0,05	1,334		0,05	9,983
	0,09	1,082		0,09	8,588
	0,15	0,898		0,15	7,458
0,03	0,005	7,323	0,12	0,005	16,909
	0,01	6,900		0,01	16,330
	0,05	4,990		0,05	13,314
	0,09	4,147		0,09	11,726
	0,15	3,506		0,15	10,385

Zjistěte, jaký typ inhibice tento inhibitor vyvolává, navrhněte rychlostní rovnici a stanovte hodnoty inhibičních konstant.

Řešení:

Saturační křivky pro průběh enzymové reakce za přítomnosti enhibitoru získáme vynesení zadaných hodnot v_i proti c_S .

Saturační křivka pro *neinhibovanou reakci* byla vypočtena pomocí rovnice Michaelise a Mentenové a zadaných hodnot k_2 , c_{E0} a K_M :

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad [1]$$

$$k_2 = 0,5 \text{ s}^{-1}$$

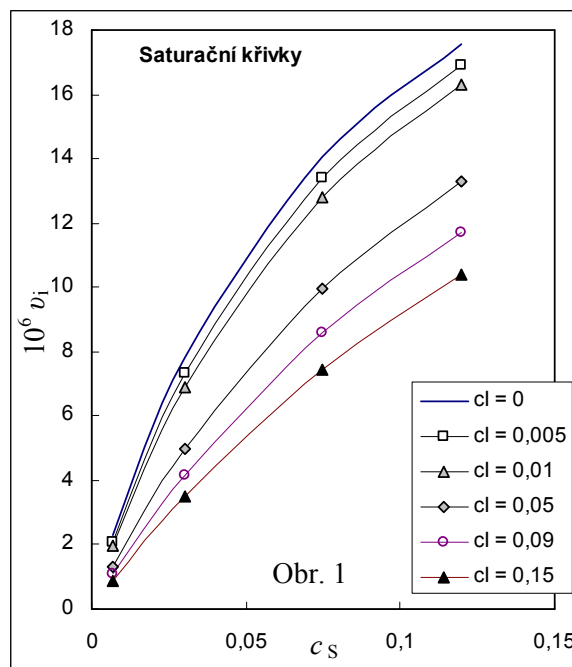
$$w_{E0} = 0,858 \text{ mg cm}^{-3} = 0,858 (10^{-3} \text{ g}) (10^3 \text{ dm}^{-3}) = 0,858 \text{ g dm}^{-3}$$

$$M_E = 14300 \text{ g mol}^{-1}$$

$$c_{E0} = \frac{w_{E0}}{M_E} = \frac{0,858}{14300} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

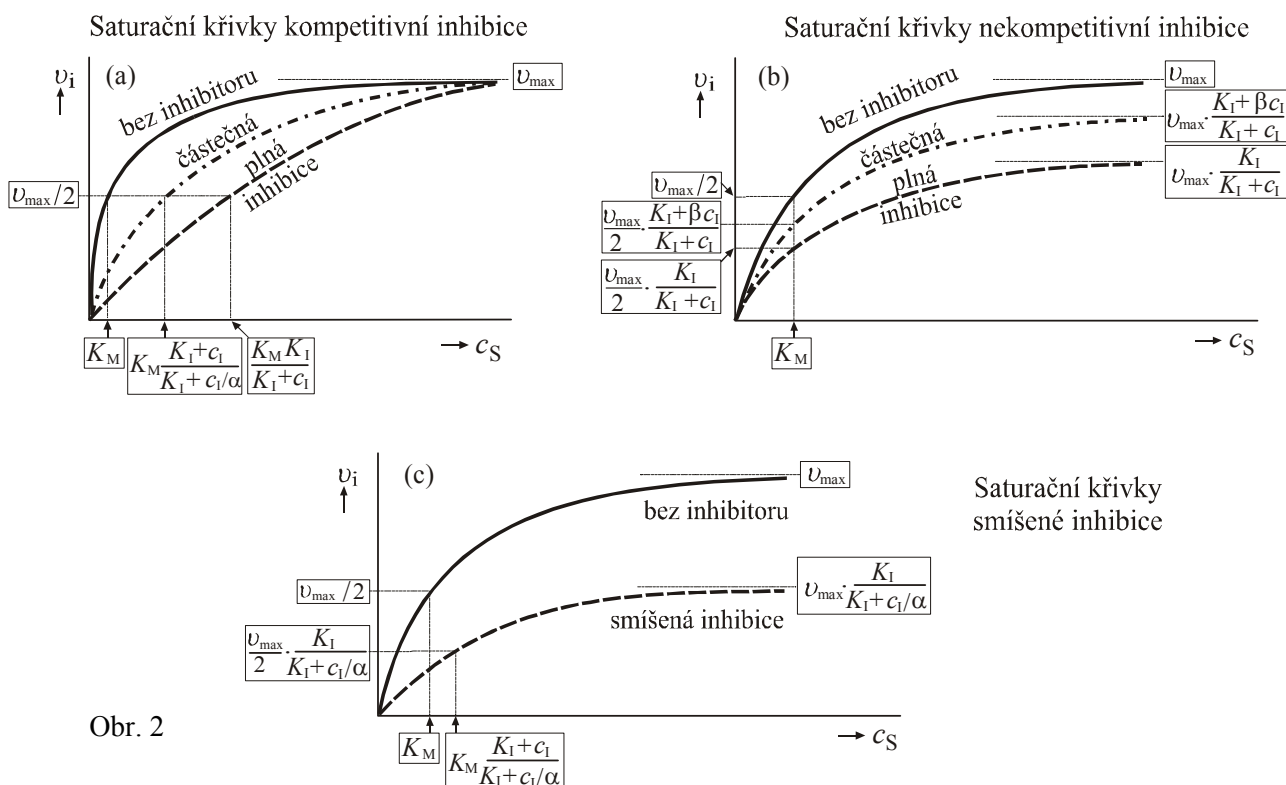
$$v_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} = 0,5 \cdot 6 \cdot 10^{-5} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 0,085 \text{ mol dm}^{-3}$$



Obr. 1

Tvar saturačních křivek na obr. 1 porovnáme s teoretickým průběhem, který ukazuje obr. 2. Experimentální křivky odpovídají buď *kompetitivní* (obr. 2a), *nekompetitivní* (obr. 2b) nebo *smíšené* (obr. 2c) inhibici.



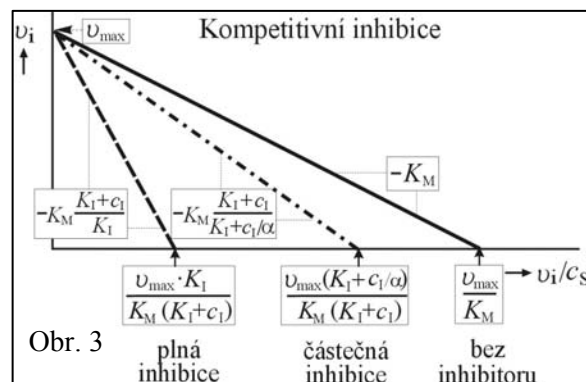
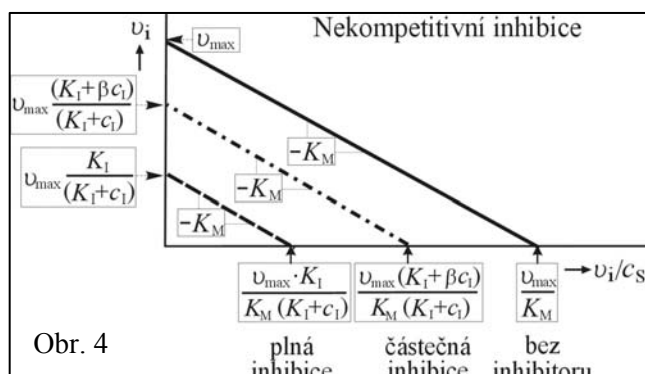
Pro rozlišení mezi těmito třemi typy inhibice zvolíme *metodu Eadiea*:

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

- Pro *kompetitivní* inhibici (obr. 3) představuje Eadieův graf svazek přímek, které se protínají v jednom bodě o souřadnicích

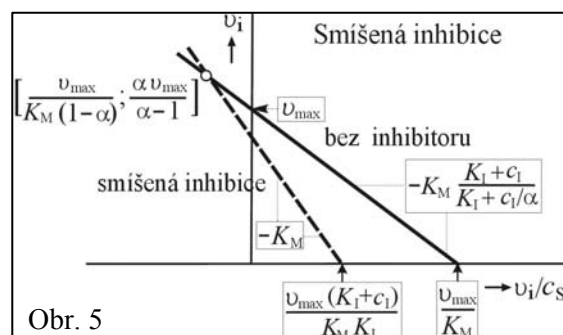
$$x (= v_i / c_S) = 0, \quad y (= v_i) = v_{max} = v'_{max},$$

- pro *nekompetitivní* inhibici soustavu rovnoběžných přímek (obr. 4)



- a pro *smíšenou* inhibici (obr. 5) svazek přímek, protínajících se v bodě o souřadnicích

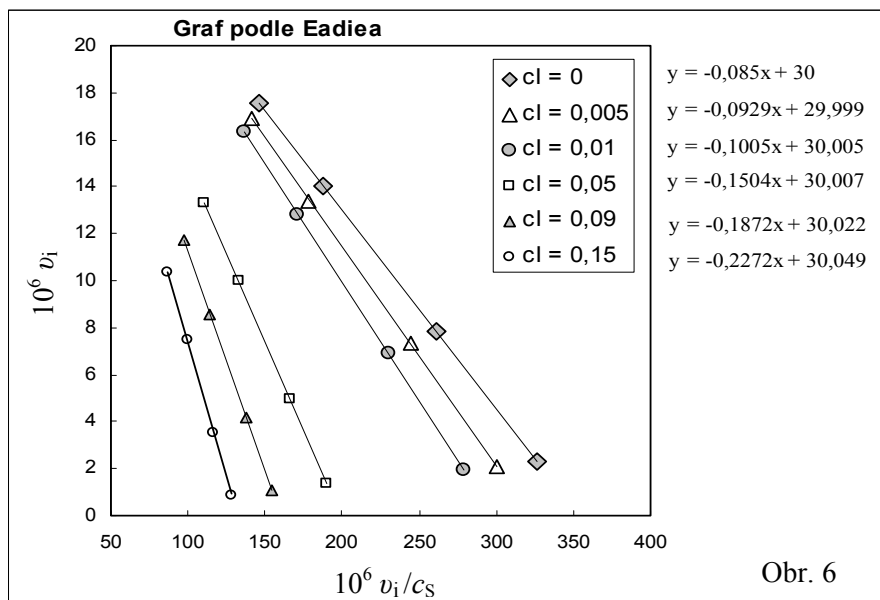
$$x (= \frac{v_i}{c_S}) = \frac{v_{max}}{K_M \cdot (1 - \alpha)}, \quad y (= v_i) = \frac{\alpha \cdot v_{max}}{\alpha - 1}$$



Ze zadaných hodnot vypočteme pro jednotlivé v_i hodnoty poměru v_i/c_S za konstantní koncentrace inhibitoru (tab. 1) a vyneseme proti sobě (obr. 6).

Tabulka 1

$c_I = 0 \text{ mol dm}^{-3}$		$c_I = 0,005 \text{ mol dm}^{-3}$		$c_I = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$	
$10^6 v = y$	$10^6 v/c_S = x$	$10^6 v_i = y$	$10^6 v_i/c_S = x$	$10^6 v_i = y$	$10^6 v_i/c_S = x$
2,283	326,087	2,102	300,286	1,954	279,143
7,826	260,870	7,323	244,100	6,900	230,000
14,063	187,500	13,400	178,667	12,824	170,987
17,561	146,341	16,909	140,908	16,330	136,083
$c_I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$		$c_I = 0,09 \text{ mol dm}^{-3}$		$c_I = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$	
$10^6 v = y$	$10^6 v/c_S = x$	$10^6 v = y$	$10^6 v/c_S = x$	$10^6 v = y$	$10^6 v/c_S = x$
1,334	190,571	1,082	154,571	0,898	128,286
4,990	166,333	4,147	138,233	3,506	116,867
9,983	133,107	8,588	114,507	7,458	99,440
13,314	110,950	11,726	97,717	10,385	86,542



Lineární regresí byly získány konstanty lineárních závislostí $y = A \cdot x + B$ (viz obr. 6, $10^6 v_i = y$, $10^6 v/c_S = x$), z nichž porovnáním se vztahem [2] dostaneme

$$A = -K'_M \quad \text{a} \quad B = 10^6 v'_{\max}$$

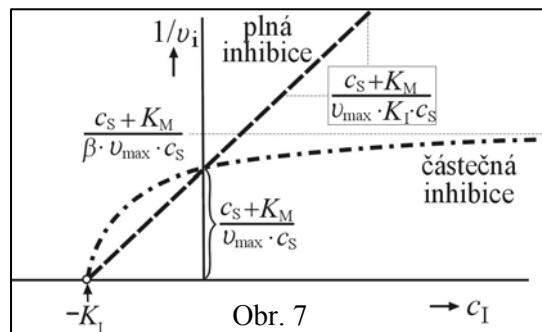
Tabulka 2 Vypočtené hodnoty parametrů enzymové reakce

$c_I / (\text{mol dm}^{-3})$	$K'_M / (\text{mol dm}^{-3})$	$v'_{\max} / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$
0	0,08500	$3,0000 \cdot 10^{-5}$
0,005	0,09290	$2,9999 \cdot 10^{-5}$
0,01	0,10048	$3,0005 \cdot 10^{-5}$
0,05	0,15044	$3,0007 \cdot 10^{-5}$
0,09	0,18721	$3,0022 \cdot 10^{-5}$
0,15	0,22719	$3,0049 \cdot 10^{-5}$

Porovnání obr. 3 a obr. 6 a fakt, že hodnoty v'_{\max} jsou pro všechny koncentrace inhibitoru stejné,

$$v'_{\max} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

vedou k závěru, že se jedná o inhibici *kompetitivní*. Částečnou a plnou inhibici rozlišíme pomocí Dixonova grafu, který je, jak schematicky ukazuje obr. 7, pro plnou inhibici přímkový, v případě částečné inhibice nelineární.

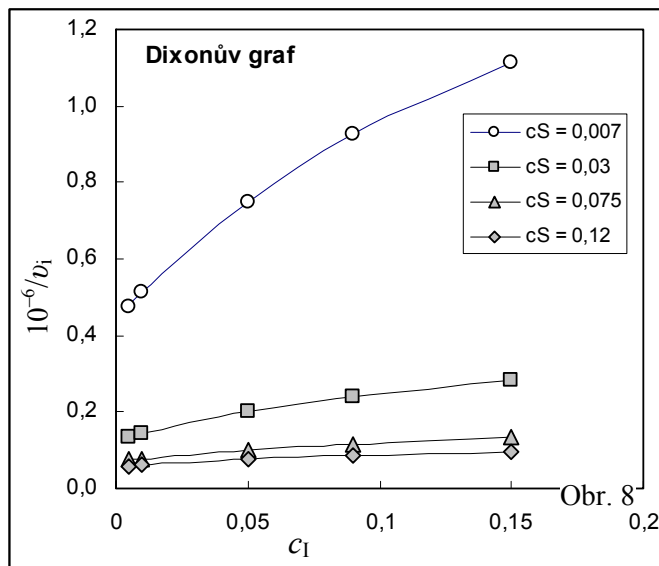


Obr. 8 ukazuje, že Dixonův graf, sestrojený pomocí experimentálních dat, je nelineární. Jde tedy o *částečnou inhibici*, pro níž platí

$$v'_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} = v_{\max} \quad [3]$$

(viz hodnoty uvedené v tab. 2)

$$K'_M = K_M \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha} \quad [4]$$



Abychom určili hodnoty konstant K_I a α , převedeme vztah [4] na lineární tvar

$$\underbrace{\frac{K_M}{K'_M}}_y = K_I \cdot \underbrace{\frac{1 - K_M / K'_M}{c_I}}_x + \frac{1}{\alpha} \quad [5]$$

Porovnáním rovnice získané lineární regresi hodnot K'_M (tabulka 2, obr. 9) dostaneme hodnoty konstant

$$K_I = 0,04207 \text{ mol dm}^{-3} \\ 1/0,19875 \Rightarrow \alpha = 5,03145$$

