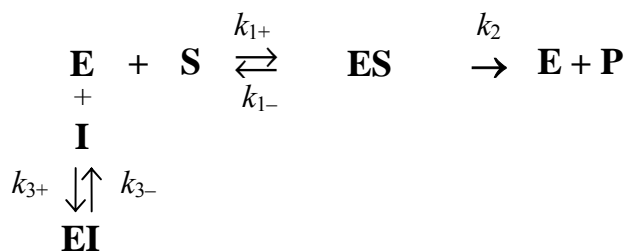


## Úloha 9-16 Inhibice enzymových reakcí – plně kompetitivní inhibice

Odvod'te (a) výraz pro rychlost plně kompetitivní reakce, probíhající podle schematu



- (b) linearizované tvary rychlostní rovnice podle (i) Hanese, (ii) Lineweavera a Burka, (iii) Eadiea,  
 (c) Pro data uvedená v následující tabulce vypočítejte kinetické parametry  $v'_{\max}$ ,  $K'_M$  a  $K_I$  uvažované inhibované reakce

$c_S$ mol dm <sup>-3</sup>	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$				
	$\frac{c_I = 0}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{c_I = 0,005}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{c_I = 0,012}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{c_I = 0,032}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{c_I = 0,084}{\text{mol dm}^{-3}}$
0,014	$1,718 \cdot 10^{-6}$	$1,654 \cdot 10^{-6}$	$1,571 \cdot 10^{-6}$	$1,375 \cdot 10^{-6}$	$1,038 \cdot 10^{-6}$
0,038	$3,828 \cdot 10^{-6}$	$3,710 \cdot 10^{-6}$	$3,555 \cdot 10^{-6}$	$3,178 \cdot 10^{-6}$	$2,490 \cdot 10^{-6}$
0,124	$7,609 \cdot 10^{-6}$	$7,464 \cdot 10^{-6}$	$7,269 \cdot 10^{-6}$	$6,766 \cdot 10^{-6}$	$5,733 \cdot 10^{-6}$
0,340	$1,053 \cdot 10^{-5}$	$1,043 \cdot 10^{-5}$	$1,028 \cdot 10^{-5}$	$9,904 \cdot 10^{-6}$	$9,035 \cdot 10^{-6}$

- (d) Zkonstruuje Dixonův graf a graf podle Huntera a Downse.

### Řešení:

(a) Rychlost inhibované reakce je dána vztahem

$$v_i = k_2 \cdot c_{\text{ES}} \quad [1]$$

Koncentraci komplexu ES vyjádříme z disociační konstanty  $K_S (= K_M)$  :

$$K_S = \frac{c_E \cdot c_S}{c_{\text{ES}}} \Rightarrow c_{\text{ES}} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_S} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \quad [2]$$

Bilance enzymu:

$$c_{\text{E0}} = c_E + c_{\text{ES}} + c_{\text{EI}} \quad [3]$$

Za koncentraci komplexu EI dosadíme z disociační konstanty  $K_I$ :

$$K_I = \frac{c_E \cdot c_I}{c_{\text{EI}}} \Rightarrow c_{\text{EI}} = \frac{c_E \cdot c_I}{K_I} \quad [4]$$

Pro koncentraci volného enzymu pak platí.:

$$c_E = \frac{c_{\text{E0}}}{\left(1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I}\right)}, \quad [5]$$

Pro rychlost inhibované reakce pak platí

$$v_i = k_2 \cdot \frac{c_S}{K_M} \cdot \frac{c_{\text{E0}}}{\left(1 + \frac{c_S}{K_M} + \frac{c_I}{K_I}\right)} = \frac{k_2 \cdot c_{\text{E0}} \cdot c_S}{K_M \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S} \quad [6]$$

Pro parametry inhibované enzymové reakce platí

$$v'_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} = v_{\max} \quad [7]$$

$$K'_M = K_M \cdot \left( \frac{K_I + c_I}{K_I} \right) \quad [8]$$

(b) Linearizace:

(i) podle Lineweavera a Burka

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v'_{\max}} + \frac{K'_M}{v'_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \underbrace{\frac{1}{v'_{\max}}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K'_M}{v'_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad [9]$$

(ii) podle Hanese

$$\frac{c_S}{v_i} = \frac{K'_M}{v'_{\max}} + \frac{1}{v'_{\max}} \cdot c_S = \underbrace{\frac{K'_M}{v'_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{1}{v'_{\max}}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S \quad [10]$$

(iii) podle Eadiea

$$v_i = v'_{\max} - K'_M \cdot \frac{v_i}{c_S} = \underbrace{\frac{v'_{\max}}{\text{úsek}} - K'_M \cdot \left( \frac{K_I + c_I}{K_I} \right)}_{\text{směrnice}} \cdot \frac{v_i}{c_S} \quad [11]$$

(c) Výpočet kinetických parametrů z linearizovaného tvaru rychlostní rovnice podle Hanese

Tabulka 1	$c_S / (\text{mol dm}^{-3})$	0,014	0,038	0,124	0,340
$c_I = 0$ $\text{mol dm}^{-3}$	$c_S/v \text{ /s}$	8149,010	9926,855	16296,491	32288,699
	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,718 \cdot 10^{-6}$	$3,828 \cdot 10^{-6}$	$7,609 \cdot 10^{-6}$	$1,053 \cdot 10^{-5}$
$c_I = 0,005$ $\text{mol dm}^{-3}$	$c_S/v \text{ /s}$	8464,329	10242,588	16613,076	32598,274
	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,654 \cdot 10^{-6}$	$3,710 \cdot 10^{-6}$	$7,464 \cdot 10^{-6}$	$1,043 \cdot 10^{-5}$
$c_I = 0,012$ $\text{mol dm}^{-3}$	$c_S/v \text{ /s}$	8911,521	10689,170	17058,743	33073,930
	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,571 \cdot 10^{-6}$	$3,555 \cdot 10^{-6}$	$7,269 \cdot 10^{-6}$	$1,028 \cdot 10^{-5}$
$c_I = 0,032$ $\text{mol dm}^{-3}$	$c_S/v \text{ /s}$	10181,818	11957,206	18326,929	34329,564
	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,375 \cdot 10^{-6}$	$3,178 \cdot 10^{-6}$	$6,766 \cdot 10^{-6}$	$9,904 \cdot 10^{-6}$
$c_I = 0,084$ $\text{mol dm}^{-3}$	$c_S/v \text{ /s}$	13487,476	15261,044	21629,164	37631,433
	$v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,038 \cdot 10^{-6}$	$2,490 \cdot 10^{-6}$	$5,733 \cdot 10^{-6}$	$9,035 \cdot 10^{-6}$

Lineární regresí (viz obr. 1) byly pro jednotlivé koncentrace inhibitoru získány rovnice tvaru

$$y = A x + B \quad [12]$$

s konstantami A a B, jejichž hodnoty uvádí tab. 2. Porovnáním s linearizovanou rychlostní rovnicí [10] pro konstanty rovnice [12] dostaneme

$$A = \frac{1}{v'_{\max}} = \frac{1}{v_{\max}} \quad [13]$$

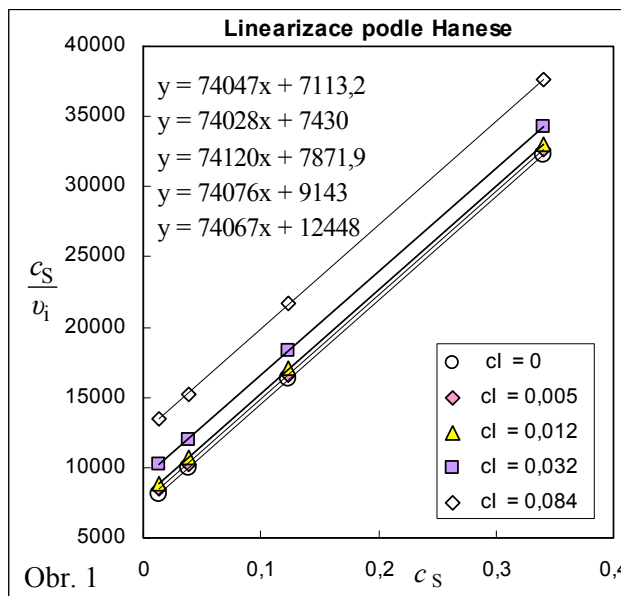
$$B = \frac{K'_M}{v'_{\max}} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I} \quad [14]$$

Tabulka 2

$c_I$	A	B
$\text{mol dm}^{-3}$	$(\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})^{-1}$	s
0	74047	7113,2
0,005	74028	7430
0,012	74120	7871,9
0,032	74076	9143
0,084	74067	12448

Tabulka 3

$c_I$	$v'_{\max}$	$K'_M$
$\text{mol dm}^{-3}$	$\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$	$\text{mol dm}^{-3}$
0	$1,350 \cdot 10^{-5}$	0,0960633
0,005	$1,351 \cdot 10^{-5}$	0,1003674
0,012	$1,349 \cdot 10^{-5}$	0,1062048
0,032	$1,350 \cdot 10^{-5}$	0,1234273
0,084	$1,350 \cdot 10^{-5}$	0,1680641



Obr. 1

Hodnoty kinetických parametrů  $v'_{\max}$  a  $K'_M$ , vypočtené ze vztahů [13] a [14], jsou uvedeny v tab. 3; první řádek tabulky platí pro průběh reakce bez inhibitoru, tj.

$$v_{\max} = 1,350 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \quad \text{a} \quad K_M = 0,0960633 \text{ mol dm}^{-3}$$

Hodnota maximální rychlosti je nezávislá na koncentraci inhibitoru. Pro konstantu  $K'_M$  platí rovnice [8], který pro výpočet  $K_I$  upravíme do lineárního tvaru

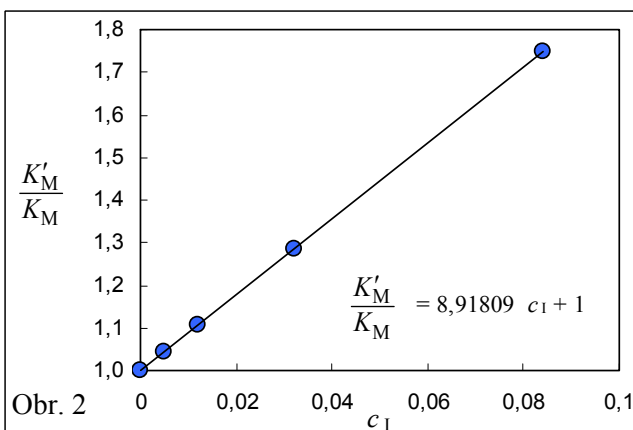
$$\frac{K'_M}{K_M} = 1 + \frac{1}{K_I} \cdot c_I \quad [15]$$

Konstantu  $K_I$  získáme ze směrnice přímky [15]:

$$K_I = \frac{1}{8,91809} = 0,1121 \text{ mol dm}^{-3}$$

Pak

$$\begin{aligned} K'_M &= 0,0960633 \cdot \left(1 + \frac{c_I}{0,1121}\right) = \\ &= 0,0960633 + 0,85694 \cdot c_I \end{aligned}$$



Obr. 2

(c) Dixonův graf:

$$\frac{1}{v_i} = \underbrace{\frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{c_S}\right)}_{\text{úsek}} + \underbrace{\left(\frac{K_M}{v_{\max} \cdot K_I \cdot c_S}\right)}_{\text{směrnice}} \cdot c_I \quad [12]$$

Tabulka 4

	$1/v_i$				
	$c_I = 0$	$c_I = 0,005$	$c_I = 0,012$	$c_I = 0,032$	$c_I = 0,084$
$c_S = 0,014$	$5,821 \cdot 10^5$	$6,046 \cdot 10^5$	$6,365 \cdot 10^5$	$7,273 \cdot 10^5$	$9,634 \cdot 10^5$
$c_S = 0,038$	$2,612 \cdot 10^5$	$2,695 \cdot 10^5$	$2,813 \cdot 10^5$	$3,147 \cdot 10^5$	$4,016 \cdot 10^5$
$c_S = 0,124$	$1,314 \cdot 10^5$	$1,340 \cdot 10^5$	$1,376 \cdot 10^5$	$1,478 \cdot 10^5$	$1,744 \cdot 10^5$
$c_S = 0,340$	$9,497 \cdot 10^4$	$9,588 \cdot 10^4$	$9,728 \cdot 10^4$	$1,010 \cdot 10^5$	$1,107 \cdot 10^5$

Graf podle Huntera a Downse:

$$\begin{aligned}
 \frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} &= \frac{c_I \cdot \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S}}{\frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} - \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S}} = \frac{c_I \cdot \frac{K_I}{K_M \cdot K_I + K_M \cdot c_I + K_M \cdot c_S}}{\frac{1}{K_M + c_S} - \frac{K_I}{K_M \cdot K_I + K_M \cdot c_I + K_M \cdot c_S}} \\
 &= \frac{c_I \cdot \frac{K_I}{K_M \cdot K_I + K_M \cdot c_I + K_M \cdot c_S}}{\frac{1}{K_M + c_S} - \frac{K_I}{K_M \cdot K_I + K_M \cdot c_I + K_M \cdot c_S}} \\
 \frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i} &= \underbrace{K_I}_{\text{úsek}} + \underbrace{\frac{K_I}{K_M}}_{\text{směrnice}} \cdot c_S
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

Tabulka 5

$c_S$	$\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i}$			
	$c_I = 0,005$	$c_I = 0,012$	$c_I = 0,032$	$c_I = 0,084$
0,014	0,1292	0,1282	0,1283	0,1282
0,038	0,1572	0,1563	0,1565	0,1563
0,124	0,2574	0,2566	0,2568	0,2567
0,340	0,5215	0,4934	0,5063	0,5077

Oba grafy jsou lineární. Pomocí Dixonova grafu lze rozlišit plnou a částečnou inhibici (pro částečnou inhibici má Dixonův graf hyperbolický průběh)

