

Enzymová kinetika – část 3 (inhibice)

Úloha 1

Vypočtěte % inhibice enzymové reakce při $[S] = K_M$ a $[I] = K_i$, je-li užito inhibitoru a) kompetitivního, b) akompetitivního, c) nekompetitivního.

Úloha 2

Enzymovou přeměnu určitého substrátu charakterizuje hodnota $K_M = 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$. Jaká zdánlivá Michaelisova konstanta by byla experimentálně zjištěna, kdyby se substrát v zásobním roztoku ze 3 % rozložil na účinný kompetitivní inhibitor reakce ($K_i = 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$) tak, že z každé molekuly rozloženého substrátu by vznikla molekula inhibitoru?

Úloha 3

Ethylenglykol (1,2-ethandiol) vyvolává po požití otravu tím, že se oxiduje v játrech až na toxickou kyselinu šťávelovou. První stupeň uskutečňuje enzym jaterní alkoholdehydrogenasa (ADH). Jako antidotum proto lze aplikovat látky inhibující oxidaci ethylenglykolu tímto enzymem.

a) Přípravek proinebrium působí jako nekompetitivní inhibitor ADH ($K_i = 2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Určete jeho koncentraci potřebnou k 95% inhibici ADH.

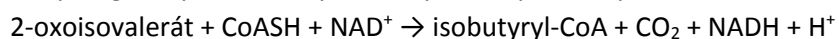
b) Rychlost oxidace ethylenglykolu ($K_M = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) lze snížit podáním ethanolu jako alternativního substrátu enzymu ($K_M = 0,01 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Jaká koncentrace ethanolu je potřebná k 95% inhibici oxidace ethylenglykolu přítomného v koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$?

Úloha 4

Kompetitivní inhibitor přidaný v koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ vedl k 3,5 násobnému zmenšení úseku na vodorovné ose Lineweaver-Burkova grafu. Vypočtěte K_i .

Úloha 5

Oxidační dekarboxylace 2-oxoisovalerátu (S) je uskutečňována multi-enzymovým komplexem dehydrogenasy rozvětvených oxokyselin a probíhá podle rovnice:



Bylo zjištěno, že reakci reverzibilně inhibují p-chlorfenoxymethylpropionát (I) resp. fenylpyruvát (J).

Výsledky kinetického studia inhibice uvedenými látkami shrnují následující tabulky - hodnoty rychlostí v ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) pro dané kombinace koncentrací substrátu a inhibitorů:

	[S] ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)			
[I] ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	5	10	20	40
0	8,8	13,9	19,8	25,0
50	5,7	8,5	11,3	13,4
100	4,3	6,1	7,9	9,2
200	2,8	3,9	4,9	5,6

	[S] ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)			
[J] ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	5	10	20	40
0	5,6	9,6	14,9	20,7
50	2,8	5,0	8,2	12,0
100	1,9	3,4	5,7	8,5
200	1,2	2,1	3,5	5,3

Pro oba případy určete typ inhibice a vyhodnoťte rovnovážné konstanty disociace inhibitoru z komplexů enzym-inhibitor a enzym-substrát-inhibitor. Objasněte, čím se liší působení inhibitorů I a J.

Úloha 6

Michaelisova konstanta hydrolýzy acetylcholinu acetylcholinesterasou se rovná $0,26 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při nadbytku substrátu je reakce inhibována vznikem neaktivního ternárního komplexu ES_2 ($K_i = 32 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Vypočtěte koncentraci acetylcholinu, při níž enzymová reakce probíhá nejrychleji.

Úloha 7

Po inkubaci roztoku enzymu E se vzrůstajícími koncentracemi inhibitoru I byl přidán nadbytek substrátu a změřena počáteční rychlost enzymové reakce v . Výsledky ukazuje tabulka:

$[I]_0 \times 10^8 \text{ (mol}\cdot\text{dm}^{-3})$	0	1	2	3	4
$v \times 10^7 \text{ (mol}\cdot\text{s}^{-1})$	7,5	6,0	4,5	3,0	1,5

Ukažte, že pozorovanou inhibici lze považovat za ireversibilní a vypočtěte koncentraci aktivních center v roztoku (předpokládáme vazbu 1 molekuly I do aktivního centra).

Úloha 8

Aktivitu katalytického centra enzymu lze stanovit titrací ireversibilním inhibitorem. U surového preparátu cholinesterasy z hovězích erythrocytů bylo pozorováno, že jeho počáteční aktivita rovná 3,2 nkat poklesla při inkubaci s $1,6 \cdot 10^{-12}$ mol dicyklohexylfluorofosfonátu (DCFP) o 31 %, kdežto u vzorku částečně purifikovaného enzymu o aktivitě 2,1 nkat činil zjištěný úbytek 82 %. Určete z těchto údajů zdánlivé aktivity katalytických center obou enzymových preparátů a pokuste se objasnit příčinu rozdílu vypočtených hodnot.

Úloha 9

K úplné inaktivaci 1 mg čistého enzymu je zapotřebí 25 nmol AgNO_3 . Vypočtěte minimální relativní molekulovou hmotnost enzymu.

Úloha 10

Enzym deoxyriboza-5-fosfát-aldolasa z bakterie *Salmonella typhimurium* katalyzuje reverzibilní štěpení deoxyribosa-5-fosfátu na glycerinaldehyd-3-fosfát a acetaldehyd. Jako meziproduct se reakcí aminoskupiny aktivního centra s aldehydovou skupinou substrátu vytváří Schiffova báze. Bylo zjištěno, že akrolein způsobuje účinnou ireverzibilní inhibici aldolasy. V jednom z experimentů bylo určité množství enzymu inkubováno s různými počátečními koncentracemi akroleinu a po 5 minutách byl měřením residuální aktivity určen stupeň inaktivace v %.

[akrolein] ₀ (mmol dm ⁻³)	0,13	0,25	0,50	1,00	2,00
% inaktivace	26,3	41,7	57,1	69,0	76,9

Ukažte, že prvním krokem při inaktivaci enzymu je reverzibilní vazba akroleinu na enzym, stanovte zdánlivou disociační konstantu a porovnejte ji s Michaelisovou konstantou acetaldehydu ($K_M = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Pokuste se navrhnout mechanismus interakce akroleinu s deoxyriboza-5-fosfát-aldolase.