

## úloha 8.

### Kinetika enzymové reakce.

### Inhibice enzymové reakce.

- a) Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce, stanovení molekulární aktivity (číslo přeměny) enzymu
- b) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu
- c) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, stanovení  $K_M$  a  $V_{max}$
- d) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci inhibitoru, stanovení  $K_i$  a typu inhibice

### teoretická příprava:

- trypsinová reakce
- substrátová specifita trypsinu
- přirozený a umělý substrát trypsinu
- princip měření trypsinové aktivity s použitím přirozeného substrátu
- princip měření trypsinové aktivity s použitím umělého chromogenního substrátu
- rychlost enzymové reakce
- počáteční rychlost enzymové reakce
- aktivita enzymu, jednotky enzymové aktivity
- molekulární aktivita (číslo přeměny) enzymu, jednotky molekulární enzymové aktivity
- závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu
- závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu
- rovnice Michaelise a Mentenové, Michaelisova konstanta, maximální rychlost reakce
- kompetitivní inhibice enzymu - Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce
- nekompetitivní inhibice enzymu - Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce
- akompetitivní inhibice enzymu - Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce
- inhibiční konstanta

### výpočty:

- koncentrace látky ve zředěném roztoku z údajů: koncentrace látky v neředěném roztoku, objem neředěného roztoku, objem zředěného roztoku
- absorbance neředěného vzorku z údajů: absorbance zředěného vzorku, ředění vzorku
- koncentrace látky z údajů: absorbance roztoku, absorpční koeficient, délka optické dráhy
- množství látky v roztoku z údajů: objem roztoku, koncentrace látky v roztoku
- vzájemný přepočet: hmotnost látky - látkové množství (při známé molekulové hmotnosti látky)
- molekulární aktivita (číslo přeměny) enzymu z údajů: hmotnostní koncentrace enzymu v enzymovém preparátu, objem enzymového preparátu v reakční směsi, molekulová hmotnost enzymu, počáteční (maximální) rychlost enzymové reakce

**použité zkratky:**

BAPNA = N<sub>α</sub>-benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid

PNA = 4-nitroanilin (p-nitroanilin)

DMS = dimethylsulfoxid

TIEW = trypsinový inhibitor z vaječného bílku (ovomukoid)

## úloha 8.

### a) Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce, stanovení molekulární aktivity (čísla přeměny) enzymu

#### Princip:

Rychlost reakce je definována jako změna koncentrace látky  $c$  (mol/l) za časovou jednotku  $t$  (s):

$$v = dc/dt$$

Jedná-li se o reakci katalyzovanou enzymem, lze reakční rychlost studovat jako přeměnu určitého množství látky  $n$  (mol) (v definovaném objemu reakční směsi) v čase  $t$  (s):

$$v \text{ (mol/s)} = dn/dt$$

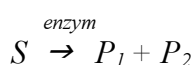
Pozorovaná rychlost reakce je mírou enzymové aktivity (množství enzymu) v reakční směsi.

Základní jednotkou enzymové aktivity je katal (kat), což je taková aktivita (množství) enzymu, která přemění 1 mol látky za sekundu (kat = mol/s). Pro praxi je tato jednotka příliš vysoká, aktivita enzymu se obvykle vyjadřuje v jednotkách  $\mu$ kat ( $\mu$ mol přeměněné látky za sekundu) nebo nkat (nmol přeměněné látky za sekundu).

Pokud měříme dobu enzymové reakce v minutách, je možné vyjadřovat enzymovou aktivitu v jednotkách  $\mu$ mol/min; takto byla dříve definovaná tzv. mezinárodní jednotka (IU) enzymové aktivity.

Rychlost enzymové reakce závisí jak na podmínkách prostředí, ve kterém reakce probíhá (teplota, pH, přítomnost různých látek ovlivňujících strukturu enzymu - srv. úlohy 7b,7c,7d), tak na koncentraci enzymu a substrátu (srv. úlohy 8b,8c), případně na přítomnosti inhibitoru (srv. úlohy 8d, 11b).

Jako jednoduchý příklad budeme nadále uvažovat enzymovou reakci, při níž se jeden substrát štěpí enzymem za vzniku dvou produktů:



Rychlost této reakce lze stanovit buď jako úbytek látkového množství substrátu  $S$  v čase  $t$  ( $v_{\Delta S} = dS/dt$ ), anebo jako přírůstek látkového množství některého z produktů  $P_1$ ,  $P_2$  v čase  $t$  ( $v_{\Delta P} = dP_1/dt = dP_2/dt = dP/dt$ ). Pro reakci s uvažovanou stechiometrií platí:  $v_{\Delta S} = v_{\Delta P}$ .

Rychlost enzymové reakce, do níž vstupuje pouze jeden substrát, je úměrná koncentraci substrátu - reakce probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu. V průběhu reakce prvního řádu se s postupným poklesem koncentrace substrátu úměrně snižuje i rychlost reakce.

Podle kinetiky reakce prvního řádu probíhají také reakce, kterých se účastní více reagujících složek, avšak všechny kromě jedné jsou v reakčním prostředí ve značném nadbytku, a se tedy jejich koncentrace během reakce prakticky nemění. Jsou to např. i hydrolytické reakce, kde je jednou z reagujících složek voda ( $A + H_2O \rightarrow B-H + C-OH$ ), jejíž koncentraci lze vzhledem k velkému nadbytku v roztoku (koncentrace vody je 55,6 mol/l) považovat za konstantní.

Je-li koncentrace substrátu vysoká a množství enzymu malé, pak může být reakční rychlost limitována množstvím enzymu a na koncentraci substrátu nezávisí. V takovém případě je množství přeměněného substrátu za časovou jednotku konstantní a reakční rychlost se v čase nemění - reakce probíhá podle kinetiky reakce nultého řádu (viz úloha 8b).

Komplikace s proměnlivým řádem reakce lze eliminovat, jestliže je enzymová reakce charakterizována pomocí *počáteční rychlosti*  $v_0$  ( $v_{0\Delta S} = [dS/dt]_{t=0}$ ,  $v_{0\Delta P} = [dP/dt]_{t=0}$ ). Na počátku reakce je v reakční směsi přítomen substrát v původní koncentraci, není přítomen reakční produkt, probíhá reakce počáteční (za daných podmínek maximální) rychlostí, koncentrace produktu roste v závislosti na čase lineárně a rychlost eventuelní vratné reakce je zanedbatelná. Počáteční rychlostí může enzymová reakce ve skutečnosti probíhat po určitou krátkou dobu, je-li substrát v nadbytku a jeho koncentrace v reakční směsi se tedy výrazně nemění, a je-li v reakční směsi zanedbatelná (vzhledem ke koncentraci substrátu) koncentrace produktu.

Počáteční rychlost enzymové reakce lze zjistit několika způsoby:

- *výpočtem* - je-li závislost úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu na čase po dobu průběhu reakce skutečně lineární, pak  $v_{0\Delta S} = \Delta S/\Delta t$ ,  $v_{0\Delta P} = \Delta P/\Delta t$ ,
- *metodou tečny* - reakční rychlost lze zjistit jako směrnici tečny (s počátkem v čase 0) nelineární závislosti úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu na čase (viz obrázek),
- *metodou extrapolace diferencí* (úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu v závislosti čase) *k nulovému času* (viz tabulka a obrázek).

Při metodě tečny a metodě extrapolace diferencí k nulovému času je zvolen vhodný pravidelný časový interval ( $dt$ ), ve kterém se stanovuje úbytek substrátu nebo přírůstek produktu. Metoda tečny bývá zatížena subjektivní chybou při sestrojování tečny.

Při metodě extrapolace diferencí k nulovému času je potřeba z naměřených hodnot úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu vypočítat rozdíly v jednotlivých časových intervalech ( $dt$ ), vynést je do grafu v závislosti na čase ( $t$ ) a extrapolovat k nulovému času. Extrapolovaný úsek na ose  $y$  udává úbytek množství substrátu nebo přírůstek množství produktu (ve zvoleném časovém intervalu) v nulovém čase. K nulovému času lze extrapolovat také přímo reakční rychlost (pokud vypočítáme reakční rychlost v jednotlivých časových intervalech a vynášíme hodnotu reakční rychlosti v závislosti na době reakce) a na ose  $y$  odečíst hodnotu počáteční reakční rychlosti.

V praxi se obvykle, je-li k dispozici vhodná analytická metoda, měří v závislosti na čase přírůstek produktu. Pokud by se měřil úbytek substrátu, je zřejmé, že by musel být signifikantní a nebyla by tedy dodržena podmínka přibližně konstantní koncentrace substrátu po celou dobu reakce v reakční směsi.

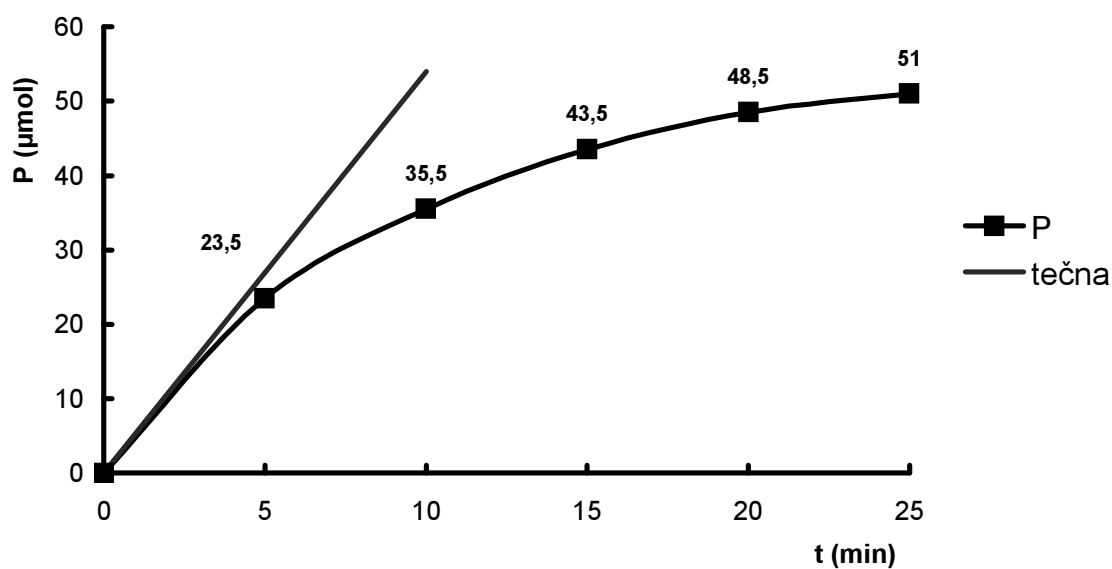
Tabulka uvádí výsledky experimentu, při němž bylo v pravidelných časových intervalech ( $dt = 5$  min) zjišťováno látkové množství jednoho z produktů  $P$  ( $\mu\text{mol}$ ) (hodnoty v grafu bez rámečků, černé čtverečky) v průběhu reakce typu  $S \rightarrow P_1 + P_2$ . Pro jednotlivé časové intervaly  $dt$  (min) byly vypočteny přírůstky látkového množství produktu  $dP$  ( $\mu\text{mol}$ ) (hodnoty v grafu v rámečcích, bílá kolečka). Experimentálně zjištěné hodnoty  $P$  ( $\mu\text{mol}$ ) i vypočítané hodnoty  $dP$  ( $\mu\text{mol}$ ) byly vyneseny v závislosti na čase  $t$  (min) do grafu.

K nelineární závislosti  $P$  na  $t$  byla sestrojena tečna s počátkem v čase 0. Směrnice tečny (velikost úseku na ose  $y$  odpovídající jednotkovému úseku osy  $x$ ) udává počáteční rychlost reakce  $v_0$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).

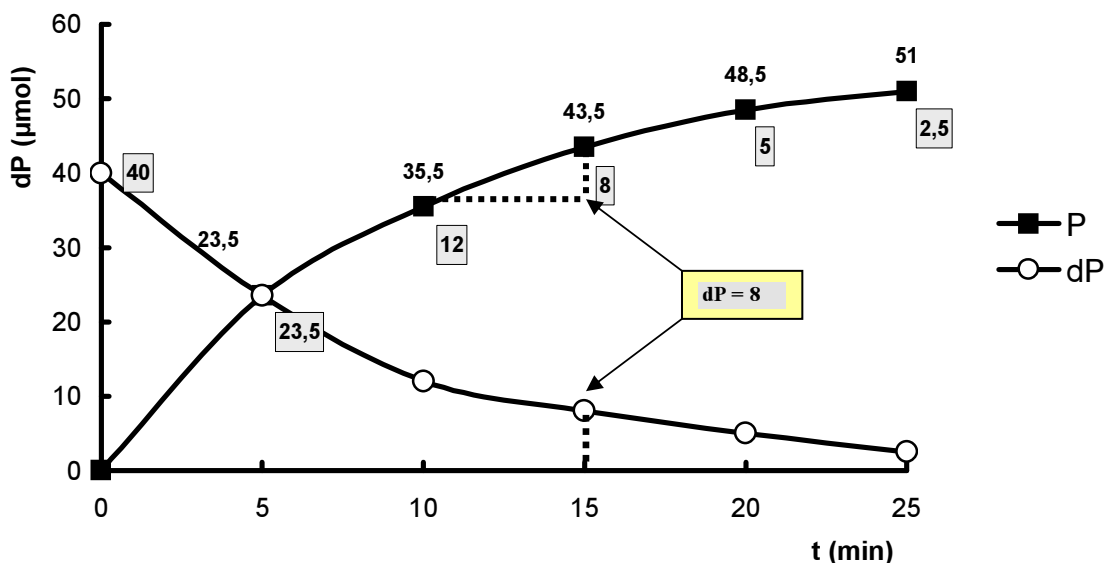
Křivka závislosti  $dP$  na  $t$  byla graficky extrapolována k nulovému času. Na ose  $y$  lze odečíst  $dP$  ( $\mu\text{mol}$ ) (pro zvolený časový interval  $dt$  (min)) v čase 0 ( $dP_0$ ) a následně vypočítat počáteční rychlost reakce  $v_0$  ( $v_0 = dP_0/dt$ ).

| t (min) | P ( $\mu\text{mol}$ ) | dP ( $\mu\text{mol}$ ) |                                    |
|---------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|
| 0       | 0                     | 40                     | <i>zjištěno extrapolací</i>        |
| 5       | 23.5                  | 23.5                   |                                    |
| 10      | 35.5                  | 12                     |                                    |
| 15      | 43.5                  | 8                      | <i>vynesení znázorněno v grafu</i> |
| 20      | 48.5                  | 5                      |                                    |
| 25      | 51                    | 2.5                    |                                    |

Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce - metoda tečny



Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce - metoda extrapolace  
diferencí přírůstků produktu k nulovému času



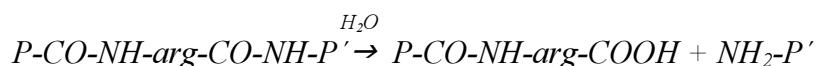
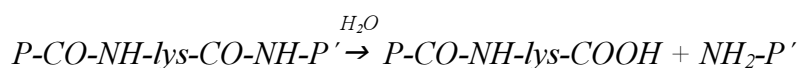
*Možnosti stanovení počáteční rychlosti  $v_0$ :*

- výpočtem (velmi nepřesné, závislost  $P$  na  $t$  není lineární):  
 $dt = 5 \text{ min}$ ,  $dP = 23,5 \text{ µmol}$ ,  $v_0 = 23,5/5 = 4,7 \text{ µmol/min}$

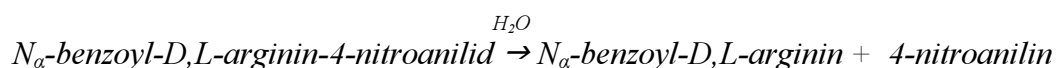
- metodou tečny:  
 $dt = 5 \text{ min}$ , úsek na ose  $y = 28 \text{ µmol}$ ,  $v_0 = 28/5 = 5,6 \text{ µmol/min}$

- metodou extrapolace diferencí k nulovému času:  
 $dt = 5 \text{ min}$ ,  $dP_0 = 40 \text{ µmol}$ ,  $v_0 = 40/5 = 8 \text{ µmol/min}$

Trypsin patří mezi serinové proteasy a hydrolyzuje peptidovou vazbu bílkovin v místě karboxylových skupin zbytků lysinu a argininu (P, P' jsou zbytky polypeptidového řetězce, *lys*, *arg* zbytky lysinu nebo argininu):



Jako přirozené substráty trypsinu bývají používány běžné bílkoviny (kasein, želatina, hemoglobin, albumin) a jako umělý chromogenní substrát kromě jiných také  $N_\alpha$ -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid ( $N_\alpha$ -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid, BAPNA), který je trypsinem štěpen za vzniku  $N_\alpha$ -benzoyl-D,L-argininu a 4-nitroanilinu (PNA):



V kyselém prostředí absorbuje 4-nitroanilin viditelné záření s maximem v okolí vlnové délky 405 nm ( $\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a jeho množství vzniklé enzymovou reakcí lze stanovit fotometricky. Okyselení vzorku zároveň ukončuje enzymovou reakci.

Trypsin je jedním z trávicích enzymů vylučovaných pankreatem (slinivkou břišní) ve formě trypsinogenu (neaktivní forma enzymu, tzv. proenzym, zymogen), který je na aktivní trypsinovou formu přeměňován buďto střevní enteropeptidasou (enterokinasou) při pH 5,2 - 6 v přítomnosti vápenatých iontů anebo autokatalyticky při pH 7,9. Dochází přitom k odstěpení hexapeptidu. pH optimum trypsinu je v mírně alkalické oblasti pH 8 - 9.

Počáteční rychlost trypsinové reakce bude v úloze stanovena dvojím způsobem:

- s použitím přirozeného bílkovinného substrátu (želatiny), kdy bude rychlost štěpení bílkoviny trypsinem sledována titračně stanovením množství volných karboxylových skupin peptidových řetězců zakončených zbytky lysinu nebo argininu (princip neutralizační titrace volných karboxylových skupin aminokyselin nebo peptidů viz úloha 2c, tzv. formolová titrace) vzniklých v různých časových intervalech. V případě bílkovinných hydrolyzátů tato metoda nedává zcela spolehlivé výsledky, neboť nelze přesně určit reakční stechiometrii: spotřebu titračního činidla ovlivňuje přítomnost funkčních skupin některých aminokyselin ve zbytcích polypeptidických řetězců (spotřebu snižují  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinu a argininu, spotřebu zvyšují karboxylové skupiny v bočních řetězcích kyseliny asparagové a kyseliny glutamové a fenolická skupina tyrosinu),

- s použitím umělého chromogenního substrátu (BAPNA), kdy bude rychlost enzymové reakce sledována fotometricky stanovením množství 4-nitroanilinu (PNA) vzniklého v různých časových intervalech.

### **Materiál a vybavení:**

0,8 % roztok preparátu trypsinu s glukosou (0,2 g/25 ml vody) (zásobní preparát: trypsin : glukosa = 1 : 20)

5 % želatina (vodný roztok)

40 % formaldehyd

0,2 mol/l hydroxid sodný

1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu

40 mmol/l roztok BAPNA v dimethylsulfoxidu (DMS)

60 mmol/l Tris-Cl pufr s přídavkem 30 mmol/l chloridu vápenatého, pH 8,2

30 % kyselina octová

pipety, zkumavky, kádinky, odměrné válce, byreta, titrační baňky, vortex, termostat, stopky

### **Postup:**

*Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím přirozeného substrátu:* Smíchejte 75 ml 40 % formaldehydu a 150 ml vody, do kádinek odměřte 125 ml roztoku želatiny a 25 ml enzymového preparátu. Do všech roztoků přidejte několik kapek fenolftaleinu a 0,2 mol/l hydroxid sodný do slabě růžového zbarvení, roztoky želatiny a trypsinu vytemperujte na teplotu 37 °C.

Připravte sadu 14 titračních baněk obsahujících 15 ml neutralizovaného zředěného roztoku formaldehydu.

Smíchejte připravené roztoky želatiny a trypsinu, promíchejte a ihned odeberte dvakrát 10 ml směsi do dvou titračních baněk obsahujících formaldehyd (odběr vzorků v čase 0 - slepý vzorek). Oba vzorky titrujte 0,02 mol/l hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení. Další vzorky (vždy dva paralelní vzorky) odebírejte a titrujte stejným způsobem 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minut po zahájení enzymové reakce.

*Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím chromogenního substrátu:* Do 12 zkumavek (paralelní dvojice) pipetujte 1,5 ml Tris-Cl pufru a 0,2 ml roztoku BAPNA. Zkumavky s reakční směsí vytemperujte na teplotu 37 °C.

Enzymovou reakci startujte přidavkem 0,3 ml roztoku trypsinu v intervalech 20 sekund a reakci přesně po 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minutách (nezapomeňte přičítat 20ti sekundové intervaly - viz tabulka) zastavujte v paralelních dvojicích zkumavek přidavkem 0,5 ml roztoku kyseliny octové - důkladně promíchejte.

Jako slepý vzorek připravte směs 1,5 ml Tris-pufru, 0,2 ml roztoku BAPNA, 0,5 ml roztoku kyseliny octové a 0,3 ml roztoku trypsinu, do které byl trypsin pipetován až po přidavku kyseliny octové.

Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku.

| zkumavka<br>č. | doba<br>reakce<br>t (min) | start reakce -<br>čas<br>na stopkách | konec reakce -<br>čas<br>na stopkách | A <sub>405</sub> | ØA <sub>405</sub> | ředění<br>vzorku | A <sub>405</sub><br>neředěný<br>vzorek |
|----------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|--|
| 1              | 5                         | 20''                                 | 5'20''                               |                  |                   |                  |  |
| 2              |                           | 40''                                 | 5'40''                               |                  |                   |                  |  |
| 3              | 10                        | 1'                                   | 11'                                  |                  |                   |                  |  |
| 4              |                           | 1'20''                               | 11'20''                              |                  |                   |                  |  |
| 5              | 15                        | 1'40''                               | 16'40''                              |                  |                   |                  |  |
| 6              |                           | 2'                                   | 17'                                  |                  |                   |                  |  |
| 7              | 20                        | 2'20''                               | 22'20''                              |                  |                   |                  |  |
| 8              |                           | 2'40''                               | 22'40''                              |                  |                   |                  |  |
| 9              | 25                        | 3'                                   | 28'                                  |                  |                   |                  |  |
| 10             |                           | 3'20''                               | 28'20''                              |                  |                   |                  |  |
| 11             | 30                        | 3'40''                               | 33'40''                              |                  |                   |                  |  |
| 12             |                           | 4'                                   | 34'                                  |                  |                   |                  |  |

Pokud jsou hodnoty A<sub>405</sub> vyšší než cca 0,8, je závislost absorbance vzorku na koncentraci produktu již nelineární vzhledem k neplatnosti Lambert-Beerova zákona pro tuto oblast hodnot absorbancí. Vzorky je nutné definovaným způsobem naředit vodou a znovu změřit A<sub>405</sub>.

Jsou-li hodnoty A<sub>405</sub> nižší než 0,2 i po 30 minutách reakce, je potřeba buďto pracovat s koncentrovanějším preparátem enzymu anebo prodloužit dobu reakce (což je z principu možné, ale nevhodné z časových důvodů), a měření zopakovat.



### Vyhodnocení:

*Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím přirozeného substrátu:* Do protokolu uveďte tabulku obsahující experimentální (spotřeba hydroxidu sodného při jednotlivých titracích, průměrná spotřeba hydroxidu sodného u paralelních vzorků) a vypočtené údaje:

převažující stechiometrie formolové titrace: **1 : 1**

| doba reakce t (min)  | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|--|---|---|----|----|----|----|----|
| spotřeba 0,02 mol/l NaOH (ml)  |   |   |    |    |    |    |    |
| průměrná spotřeba 0,02 mol/l NaOH (ml)   |   |   |    |    |    |    |    |
| průměrná spotřeba 0,02 mol/l NaOH po odečtení spotřeby slepého vzorku (ml)   |   |   |    |    |    |    |    |
| látkové množství spotřebovaného 0,02 mol/l NaOH ( $\mu\text{mol}$ )  |   |   |    |    |    |    |    |
| látkové množství volných skupin -COOH v 10 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}$ )  |   |   |    |    |    |    |    |
| látkové množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}$ )   |   |   |    |    |    |    |    |
| přírůstek látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}$ )                               |   |   |    |    |    |    |    |
| reakční rychlost (aktivita enzymu) v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) |   |   |    |    |    |    |    |

Uveďte počáteční rychlost trypsinové reakce ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) jako poměr přírůstku látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi a doby reakce pro prvních 5 minut reakce:

$v_0$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) =

Do grafu vynesete závislost *látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi na čase* a k závislosti sestrojíte tečnu s počátkem v čase 0. Ze směrnice tečny vypočtete počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku volných skupin -COOH ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

Do grafu vynesete závislost *přírůstku* (ve zvoleném časovém intervalu 5 minut) *látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi na čase* a závislost extrapolujete k nulovému času. Z extrapolované hodnoty přírůstku (ve zvoleném časovém intervalu 5 minut) látkového množství volných skupin -COOH v celém objemu reakční směsi v čase 0 vypočtete počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku volných skupin -COOH ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

Do grafu vyneste závislost *reakční rychlosti na době reakce*. Závislost extrapolujte k nulovému času a na ose *y* odečtěte hodnotu počáteční reakční rychlosti. Uveďte zjištěnou hodnotu počáteční reakční rychlosti ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

*Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím chromogenního substrátu:* Do protokolu uveďte tabulky doplněné experimentálními ( $A_{405}$ ) a vypočtenými údaji.

$$(\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

objem (neředěného) vzorku pro fotometrii (ml):

| zkumavka č. | doba reakce <i>t</i> (min) | $c_{\text{PNA}}$ (mmol/l) | $n_{\text{PNA}}$ ( $\mu\text{mol}$ ) | $dn_{\text{PNA}}$ ( $\mu\text{mol}$ ) | $dn_{\text{PNA}}$ v 1 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}$ ) | reakční rychlost (aktivita enzymu) v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) |
|-------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| 1           | 5                          |                           |                                      |                                       |  |  |
| 2           |                            |                           |                                      |                                       |  |  |
| 3           | 10                         |                           |                                      |                                       |  |  |
| 4           |                            |                           |                                      |                                       |  |  |
| 5           | 15                         |                           |                                      |                                       |  |  |
| 6           |                            |                           |                                      |                                       |  |  |
| 7           | 20                         |                           |                                      |                                       |  |  |
| 8           |                            |                           |                                      |                                       |  |  |
| 9           | 25                         |                           |                                      |                                       |  |  |
| 10          |                            |                           |                                      |                                       |  |  |
| 11          | 30                         |                           |                                      |                                       |  |  |
| 12          |                            |                           |                                      |                                       |  |  |

Vypočtěte počáteční rychlost trypsinové reakce ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) jako poměr přírůstku látkového množství 4-nitroanilinu v 1 ml reakční směsi a doby reakce pro prvních 5 minut reakce:  
 $v_0$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) =

Do grafu vyneste závislost *látkového množství 4-nitroanilinu v 1 ml reakční směsi na čase* a k závislosti sestrojte tečnu s počátkem v čase 0. Ze směrnice tečny vypočtěte počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku 4-nitroanilinu ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

Do grafu vyneste závislost *přírůstku* (ve zvoleném časovém intervalu 5 minut) *látkového množství 4-nitroanilinu v 1 ml reakční směsi na čase* a závislost extrapolujte k nulovému času. Z extrapolované hodnoty přírůstku (ve zvoleném časovém intervalu 5 minut) látkového množství 4-nitroanilinu v čase 0 vypočtěte počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku 4-nitroanilinu ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

Do grafu vyneste závislost *reakční rychlosti na době reakce*. Závislost extrapolujte k nulovému času a na ose *y* odečtěte hodnotu počáteční reakční rychlosti. Uveďte zjištěnou hodnotu počáteční reakční rychlosti ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ):

Na základě znalosti reakční stechiometrie vypočtete, kolik procent z původního množství substrátu bylo v průběhu reakce spotřebováno:

*počátek reakce:*

- objem reakční směsi (ml):
- koncentrace BAPNA v reakční směsi (mmol/l):
- množství BAPNA v reakční směsi ( $\mu\text{mol}$ )(100 %):

*konec reakce:*

- objem vzorku pro fotometrii (ml):
- koncentrace PNA ve vzorku pro fotometrii (mmol/l):
- množství PNA ve vzorku pro fotometrii ( $\mu\text{mol}$ ):
- množství BAPNA ve vzorku pro fotometrii ( $\mu\text{mol}$ ):
- množství BAPNA ve vzorku pro fotometrii (%):
- úbytek BAPNA v reakční směsi během reakce (%):

Uveďte podrobnější údaje o úbytku substrátu během reakce:

objem reakční směsi (ml):

| doba reakce<br>t (min) | $c_{\text{PNA}}$<br>(mmol/l) | $n_{\text{PNA}}$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $n_{\text{BAPNA}}$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | % BAPNA | úbytek<br>BAPNA<br>během reakce<br>(%) |
|------------------------|------------------------------|---|---|---------|--|
| 0                      | 0                            | 0                                       |   | 100     | 0                                      |
| 5                      |                              |   |   |         |  |
| 10                     |                              |   |   |         |  |
| 15                     |                              |   |   |         |  |
| 20                     |                              |   |   |         |  |
| 25                     |                              |   |   |         |  |
| 30                     |                              |   |   |         |  |

Pokuste se odhadnout, kolik substrátu může být za zvolených podmínek stanovení (počáteční koncentrace substrátu, množství enzymu) vyčerpáno, aniž by se snížila počáteční (maximální) rychlost reakce:

*Srovnání dvou metod stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce.* Hodnoty počáteční rychlosti trypsinové reakce stanovené oběma metodami a různým postupem zpracování výsledků vzájemně srovnajte a případné rozdíly vysvětlete:

|  |  |
|--|--|
| <i>neutralizační titrace, přirozený substrát trypsinu</i>    | $v_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) vypočtená |
| jako $\Delta P/\Delta t$ pro prvních 5 min reakce            |  |
| ze směrnice tečny závislosti $P$ na $dt$                     |  |
| z extrapolované hodnoty $dP_0$ závislosti $dP$ na $dt$       |  |
| z extrapolované hodnoty $v_0$ závislosti $v$ na $dt$         |  |
|  |  |
| <i>fotometrické stanovení, chromogenní substrát trypsinu</i> | $v_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) vypočtená |
| jako $\Delta P/\Delta t$ pro prvních 5 min reakce            |  |
| ze směrnice tečny závislosti $P$ na $dt$                     |  |
| z extrapolované hodnoty $dP_0$ závislosti $dP$ na $dt$       |  |
| z extrapolované hodnoty $v_0$ závislosti $v$ na $dt$         |  |

Vypočtete molekulární aktivitu (číslo přeměny) trypsinu v přítomnosti přirozeného substrátu a v přítomnosti umělého chromogenního substrátu s použitím experimentálně zjištěných a následujících údajů:

- zásobní preparát trypsinu obsahuje: 38 mg trypsinu/100 ml
- $M_{\text{trypsin}} = 23\,300$

- maximální rychlost reakce v přítomnosti přirozeného substrátu (zjištěná extrapolacími metodami) ( $\mu\text{mol}/\text{min}$  v 1 ml reakční směsi):

- maximální rychlost reakce v přítomnosti přirozeného substrátu (zjištěná extrapolacími metodami) ( $\text{mol}/\text{s}$  v 1 ml reakční směsi):

- maximální rychlost reakce v přítomnosti umělého chromogenního substrátu (zjištěná extrapolacími metodami) ( $\mu\text{mol}/\text{min}$  v 1 ml reakční směsi):

- maximální rychlost reakce v přítomnosti umělého chromogenního substrátu (zjištěná extrapolacími metodami) ( $\text{mol}/\text{s}$  v 1 ml reakční směsi):

- objem enzymového preparátu v 1 ml reakční směsi (ml):

- množství enzymového preparátu v 1 ml reakční směsi (g):

- množství enzymového preparátu v 1 ml reakční směsi (mol):

**- molekulární aktivita trypsinu v přítomnosti přirozeného substrátu**

(doplňte fyzikální rozměr):

**- molekulární aktivita trypsinu v přítomnosti umělého chromogenního substrátu**

(doplňte fyzikální rozměr):

## úloha 8.

### b) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu

#### **Princip:**

Je-li v reakční směsi dostatečný nadbytek substrátu (koncentrace substrátu je deseti- až stonásobkem hodnoty Michaelisovy konstanty, srv. úloha 8c), probíhá enzymová reakce rychlostí, která odpovídá 90 - 99 % maximální rychlosti  $V_{\max}$  (srv. úloha 8c). Za těchto podmínek (nasycení enzymu substrátem) probíhá enzymová reakce podle kinetiky nultého řádu (rychlost je nezávislá na koncentraci substrátu) a  $V_{\max}$  je přímo úměrná koncentraci enzymu.

Pomocí  $V_{\max}$  (mol/s) lze nepřímo vyjádřit aktivitu (množství) enzymu v reakční směsi na základě jeho schopnosti katalyzovat přeměnu substrátu na produkt. (Jednotky enzymové aktivity tedy mají stejný fyzikální rozměr jako rychlost enzymové reakce (srv. úloha 8a).) V praxi se toto nepřímé vyjádření běžně používá namísto přímého určení koncentrace enzymu např. jako molární nebo hmotnostní koncentrace, neboť stanovit látkové množství nebo hmotnost enzymu obsaženého v biologickém materiálu je velmi obtížné.

#### **Materiál a vybavení:**

0,8 % roztok preparátu trypsinu s glukosou (0,2 g/25 ml vody) (zásobní preparát: trypsin : glukosa = 1 : 20)

40 mmol/l roztok BAPNA v dimethylsulfoxidu (DMS)

60 mmol/l Tris-Cl pufr s přísadkou 30 mmol/l chloridu vápenatého, pH 8,2

30 % kyselina octová

zkumavky, pipety, vortex, termostat, stopky

**Postup:**

Do 12 zkumavek (paralelní dvojice) pipetujte postupně 1,5 ml Tris-Cl pufru a dále podle rozpisu:

| zk. č. | ml roztoku enzymu | ml vody | start reakce - čas na stopkách | konec reakce - čas na stopkách | $A_{405}$ | $\bar{O}A_{405}$ | ředění vzorku | $A_{405}$ neředěný vzorek | $C_{PNA}$ (mmol/l) | $n_{PNA}$ ( $\mu$ mol) | $v_0$ ( $\mu$ mol/min) (aktivita enzymu) |
|--------|-------------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|------------------|---------------|---------------------------|--------------------|------------------------|--|
| 1      | 0,05              | 0,25    | 20''                           | 5'20''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 2      |                   |         | 40''                           | 5'40''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 3      | 0,1               | 0,2     | 1'                             | 6'                             |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 4      |                   |         | 1'20''                         | 6'20''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 5      | 0,15              | 0,15    | 1'40''                         | 6'40''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 6      |                   |         | 2'                             | 7'                             |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 7      | 0,2               | 0,10    | 2'20''                         | 7'20''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 8      |                   |         | 2'40''                         | 7'40''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 9      | 0,25              | 0,05    | 3'                             | 8'                             |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 10     |                   |         | 3'20''                         | 8'20''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 11     | 0,3               | 0,00    | 3'40''                         | 8'40''                         |           |                  |               |                           |                    |                        |  |
| 12     |                   |         | 4'                             | 9'                             |           |                  |               |                           |                    |                        |  |

Zkumavky vytemperujte na teplotu 37 °C. Enzymovou reakci startujte přidavkem 0,2 ml roztoku BAPNA v intervalech 20 sekund a reakci přesně po 5 minutách (nezapomeňte přičítat 20ti sekundové intervaly - viz tabulka) zastavujte v paralelních dvojicích zkumavek přidavkem 0,5 ml roztoku kyseliny octové - důkladně promíchejte.

Jako slepý vzorek připravte směs 1,5 ml Tris-pufru, 0,2 ml roztoku BAPNA, 0,5 ml roztoku kyseliny octové a 0,3 ml vody.

Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku. Přesahují-li absorbance hodnotu 0,8, vzorky definovaným způsobem nařeďte vodou (včetně slepého vzorku).

Jsou-li hodnoty  $A_{405}$  nižší než 0,2 i v případě, kdy bylo v reakci použito 0,3 ml roztoku enzymu, je potřeba buď pracovat s koncentrovanějším enzymovým preparátem anebo prodloužit dobu reakce (což je z principu možné, ale nevhodné z časových důvodů), a měření zopakovat.

V dalších částech úlohy bude v jednotlivých experimentech používáno vždy 0,05 ml roztoku enzymu, v této části úlohy je tedy potřeba zjistit, zda je nutné enzymový preparát zředit anebo naopak použít jiný, koncentrovanější roztok enzymu.

**Vyhodnocení:**

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními ( $A_{405}$ ) a vypočtenými údaji.

( $\epsilon_{PNA} = 9,62 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

objem vzorku pro fotometrii (ml):

Do grafu vynesete závislost *aktivity enzymu na objemu enzymového preparátu v reakční směsi*.

Na základě znalosti reakční stechiometrie vypočtete, kolik procent z původního množství substrátu bylo v průběhu jednotlivých reakcí spotřebováno:

objem reakční směsi (ml):

| ml roztoku enzymu | $c_{\text{PNA}}$<br>(mmol/l) | $n_{\text{PNA}}$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $n_{\text{BAPNA}}$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | % BAPNA | úbytek BAPNA během reakce (%) |
|-------------------|------------------------------|---|---|---------|-------------------------------|
| <i>čas 0</i>      | 0                            | 0                                       |   | 100     | 0                             |
| <i>čas 10 min</i> |                              |   |   |         |                               |
| 0,05              |                              |   |   |         |                               |
| 0,1               |                              |   |   |         |                               |
| 0,15              |                              |   |   |         |                               |
| 0,2               |                              |   |   |         |                               |
| 0,25              |                              |   |   |         |                               |
| 0,3               |                              |   |   |         |                               |

Uveďte, za jakých podmínek probíhala reakce počáteční (maximální) rychlostí:

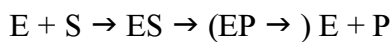
## úloha 8.

### c) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, stanovení $K_M$ a $V_{max}$

#### Princip:

Rychlost enzymových reakcí je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí (srv. úlohy 7b, 7c, 7d), množství enzymu v reakční směsi (srv. úloha 8b), přítomnosti efektorů (modifikátorů) (srv. úloha 8d) a také na koncentraci substrátů.

Jednosubstrátové (srv. úloha 8a) reakce probíhají podle obecného schématu:



(E = enzym, S = substrát, P = produkt/y/)

Při konstantní koncentraci enzymu je počáteční rychlost jednosubstrátové enzymové reakce  $v_0$  (mol/s) závislá na koncentraci substrátu [S] (mol/l) podle vztahu:

$$v_0 = (V_{max} \cdot [S]) / (K_M + [S]) \quad (\text{rovnice Michaelise a Mentenové})$$

kde  $V_{max}$  (mol/s) je *maximální rychlost reakce* (počáteční rychlost reakce za podmínek nasycení enzymu substrátem) a  $K_M$  (mol/l) je *Michaelisova konstanta*.  $K_M$  je základní kinetickou konstantou, která je za určitých podmínek (pH, teplota, složení reakční směsi atd.) typická pro každou dvojici enzym - substrát.

*Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu* (při konstantní koncentraci enzymu) má hyperbolický průběh (rovnoosá /pravoúhlá/ hyperbola s posunutým začátkem o souřadnicích [ $V_{max}$ ; -  $K_M$ ]) a sestává ze dvou částí rozdělených hodnotou  $K_M$ :

$$v_0 = (V_{max} \cdot [S]) / (K_M + [S])$$

$[S] \ll K_M \Rightarrow v_0 \approx V_{max} \cdot [S] / K_M = \text{konst.} [S]$

$[S] \gg K_M \Rightarrow v_0 \approx V_{max} \cdot [S] / [S] = V_{max}$

- *při nízkých koncentracích substrátu* je jen malá část molekul enzymu vázána do komplexu ES, pro koncentraci volného enzymu tedy platí:  $[E] \gg [ES]$ , rychlost reakce je úměrná koncentraci substrátu [S] a reakce probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu (srv. úloha 8a).

V praxi se podmínek nadbytku enzymu v reakční směsi využívá pro stanovení koncentrace substrátu (srv. úlohy 12a, 12b, 12c).

- *při vysokých koncentracích substrátu* je naopak všechen enzym vázán do komplexu ES, takže platí  $[E] \ll [ES]$ , reakce se vzhledem k substrátu stává reakcí nultého řádu (srv. úloha 8a), je dosaženo maximální (limitní, mezní) rychlosti reakce  $V_{max}$ , která už se zvyšující se koncentrací substrátu dále nestoupá, neboť pro další substrát už není k dispozici volný enzym (nasycení /saturace/ enzymu substrátem).



Množství vznikajících produktů se při dostatečně vysoké koncentraci substrátu mění s časem lineárně a směrnice přímkou popisující závislost  $dP/dt$  je ekvivalentní koncentraci enzymu (aktivitě enzymu). V praxi probíhá za podmínek nadbytku substrátu v reakční směsi (nepřímé - kinetické) měření aktivity enzymu:  $V_{\max}$  je při nasycení enzymu substrátem úměrná koncentraci enzymu (viz úloha 8b).

- při koncentracích substrátu blízkých hodnotě  $K_M$  probíhá reakce podle kinetiky reakce smíšeného řádu.

$K_M$  numericky odpovídá takové koncentraci substrátu, při které probíhá enzymová reakce polovinou maximální rychlosti:

$$v_0 = V_{\max}/2 \Leftrightarrow [S] = K_M$$

$K_M$  je (na rozdíl od  $V_{\max}$ ) nezávislá na koncentraci enzymu, závisí však na prostředí, v němž probíhá enzymová reakce (pH, teplota, přítomnost efektorů). Charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu vzhledem k příslušnému substrátu - je mírou afinity enzymu k substrátu. Hodnoty  $K_M$  se pro různé enzymy pohybují v širokém rozmezí (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$  mol/l). Čím je hodnota  $K_M$  nižší, tím větší má enzym afinitu k substrátu (polovina  $V_{\max}$  je dosaženo při nižší koncentraci substrátu).

Praktický význam zjištění hodnoty  $K_M$  je následující:

- hodnoty  $K_M$  určují přibližně vnitrobuněčné koncentrace substrátů enzymů intermediárního metabolismu,
- porovnání hodnot  $K_M$  je obvykle prvním krokem při zkoumání totožnosti enzymů izolovaných z různých organismů, tkání nebo subcelulárních frakcí buňky,
- u enzymů se širší substrátovou specifitou (srv. úlohy 10a, 10b, 10c, 10d, 11a, 11b) se považuje za fyziologický ten substrát, který má nejnižší hodnotu  $K_M$ ,
- znalost hodnoty  $K_M$  má bezprostřední význam pro optimalizaci podmínek stanovení aktivity enzymů v biologickém materiálu, při použití enzymů k analytickým účelům apod.

Význam  $V_{\max}$  spočívá v jejím vztahu k rychlostní konstantě reakce  $EP \rightarrow E + P$ . V oblasti saturace enzymu substrátem, kdy reakční rychlost dosahuje mezní hodnoty a reakce je vzhledem k substrátu nultého řádu, je faktorem limitujícím rychlost reakce koncentrace enzymu (srv. úloha 8b), takže

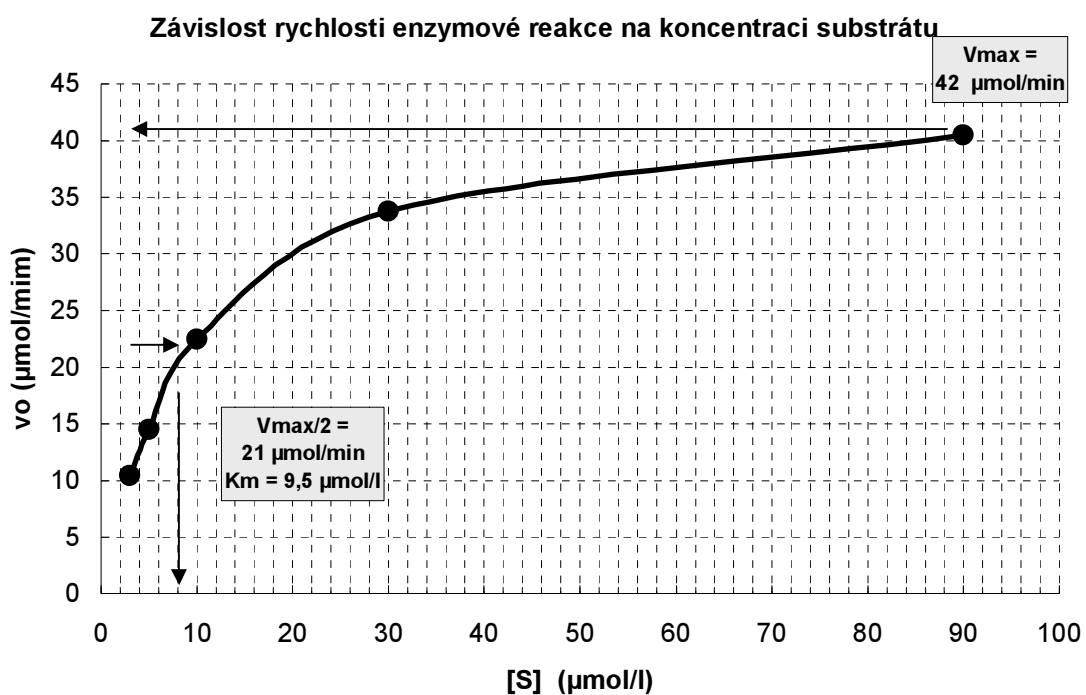
$$v_0 = V_{\max} = k \cdot [E]$$

Je-li známa molární koncentraci enzymu  $[E]$ , lze tedy z hodnoty  $V_{\max}$  vypočítat rychlostní konstantu  $k$  (viz úloha 8a). Tato konstanta udává *molekulární* (přesněji molární) *aktivitu enzymu* (tzv. *číslo přeměny*) ( $s^{-1}$ ) - počet molekul (molů) substrátu přeměněných jednou molekulou (molem) enzymu za časovou jednotku. Vysoké číslo přeměny znamená, že katalyzovaná reakce probíhá vysokou rychlostí.

Nedostatkem rovnice Michaelise a Mentenové je, že popisuje pouze počáteční rychlost reakce (pro  $t = 0$ , srv. úloha 8a), kdy je složení reakční směsi konstantní (koncentrace substrátu se neliší od výchozí, známé  $[S]$  a koncentrace produktu v reakční směsi je nulová). Z toho důvodu je nutno provádět kinetická měření v pokud možno co nejkratším čase, obecně za podmínek, při nichž se na produkt nepřeměnilo více než 10 % substrátu vneseného do reakční směsi na počátku reakce.

Nejjednodušší způsob grafického zjištění hodnot  $K_M$  a  $V_{max}$  spočívá v sestrojení závislosti počáteční rychlosti enzymové reakce  $v_0$  na koncentraci substrátu  $[S]$  podle výše uvedené rovnice Michaelise a Mentenové (tabulka uvádí experimentálně zjištěné hodnoty, které byly vyneseny do grafu):

| $[S]$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) | $v_0$ ( $\mu\text{mol/min}$ ) |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 3                           | 10.4                          |
| 5                           | 14.5                          |
| 10                          | 22.5                          |
| 30                          | 33.8                          |
| 90                          | 40.5                          |



$V_{max} = 42 \mu\text{mol/min}$  (odečteno z osy  $y$ )  $\Rightarrow$

$V_{max}/2 = 21 \mu\text{mol/min} \Rightarrow K_M = 8,5 \mu\text{mol/l}$  (odečteno z osy  $x$ )

Odečtení  $V_{\max}$  a  $K_M$  z nelineární závislosti  $v_0$  na  $[S]$  je však dosti nepřesné a proto se prakticky nepoužívá. Rovnici Michaelise a Mentenové lze několika způsoby lineárně transformovat na rovnice typu  $y = ax + b$  (obecná rovnice přímky), kde  $x$  je nezávisle proměnná,  $y$  je závisle proměnná,  $a$  je směrnice přímky a  $b$  je úsek na ose  $y$ :

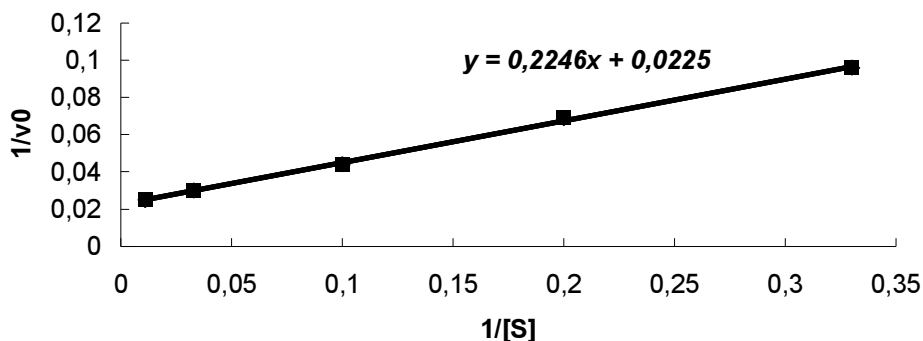
| <i>linearizace podle</i> | linearizovaný tvar rovnice Michaelise a Mentenové | $x$       | $y$       | výnos $y$ proti $x$   | $a$ (směrnice přímky) | $b$ (úsek na ose $y$ ) |
|--------------------------|---|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Lineweaver - Burk        | $1/v_0 = K_M/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max}$   | $1/[S]$   | $1/v_0$   | $1/v_0$ proti $1/[S]$ | $K_M/V_{\max}$        | $1/V_{\max}$           |
| Hanes                    | $[S]/v_0 = (1/V_{\max}) \cdot [S] + K_M/V_{\max}$ | $[S]$     | $[S]/v_0$ | $[S]/v_0$ proti $[S]$ | $(1/V_{\max})$        | $K_M/V_{\max}$         |
| Eadie - Hofstee          | $v_0 = -K_M \cdot v_0/[S] + V_{\max}$             | $v_0/[S]$ | $v_0$     | $v_0$ proti $v_0/[S]$ | $-K_M$                | $V_{\max}$             |
| Eadie-Scatchard          | $v_0/[S] = -v_0/K_M + V_{\max}/K_M$               | $v_0$     | $v_0/[S]$ | $v_0/[S]$ proti $v_0$ | $-1/K_M$              | $V_{\max}/K_M$         |

Lineární závislosti umožňují přesněji odečítat hodnoty  $K_M$  a  $V_{\max}$  ze směrnice anebo z úseku na ose  $y$  (případně z průsečíku přímky s osou  $x$ ). I když je v současnosti tento způsob vyhodnocení kinetických dat již zastaralý a místo něj se používá nelineární regrese kinetických dat s využitím speciálního počítačového software, pro běžné účely je dostačující.

Nejoblíbenější, i když nejméně přesné, je vyhodnocení dat pomocí linearizace podle Lineweavera a Burka, velmi často je používáno také přesnější vyhodnocení podle Hanese:

| experimentálně získaná data |                               | výnos podle Lineweavera a Burka |         |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------|
| $[S]$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) | $v_0$ ( $\mu\text{mol/min}$ ) | $1/[S]$                         | $1/v_0$ |
| 3                           | 10.4                          | 0.333                           | 0.096   |
| 5                           | 14.5                          | 0,2                             | 0.069   |
| 10                          | 22.5                          | 0,1                             | 0.044   |
| 30                          | 33.8                          | 0,033                           | 0.03    |
| 90                          | 40.5                          | 0.011                           | 0.025   |

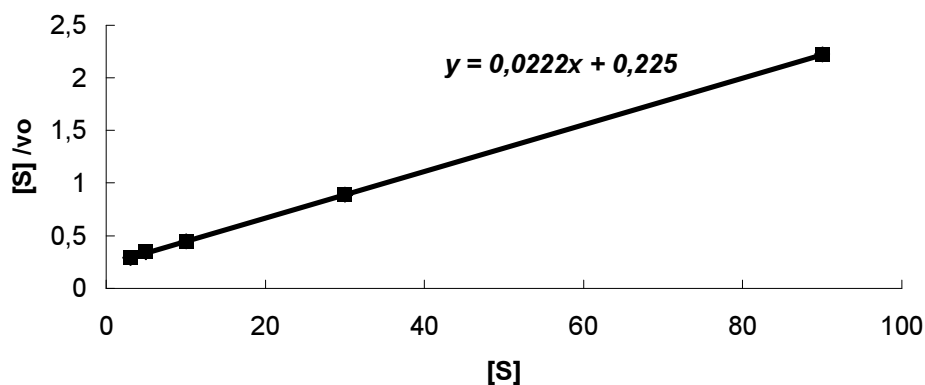
**Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Lineweavera a Burka**



úsek osy  $y = 0,0225 \Rightarrow 1/V_{\max} = 0,0225 \Rightarrow V_{\max} = 44,44 \mu\text{mol}/\text{min}$   
 směrnice přímky  $= 0,2246 \Rightarrow K_M/V_{\max} = 0,2246 \Rightarrow K_M = 9,97 \mu\text{mol}/\text{l}$   
 průsečík přímky a osy  $x$  má souřadnice  $[-1/K_M; 0]$

| experimentálně získaná data      |                                      | výnos podle Hanese |            |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------|
| [S] ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ ) | $v_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) | [S]                | [S]/ $v_0$ |
| 3                                | 10.4                                 | 3                  | 0.288      |
| 5                                | 14.5                                 | 5                  | 0.344      |
| 10                               | 22.5                                 | 10                 | 0.444      |
| 30                               | 33.8                                 | 30                 | 0.888      |
| 90                               | 40.5                                 | 90                 | 2.222      |

**Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Hanese**

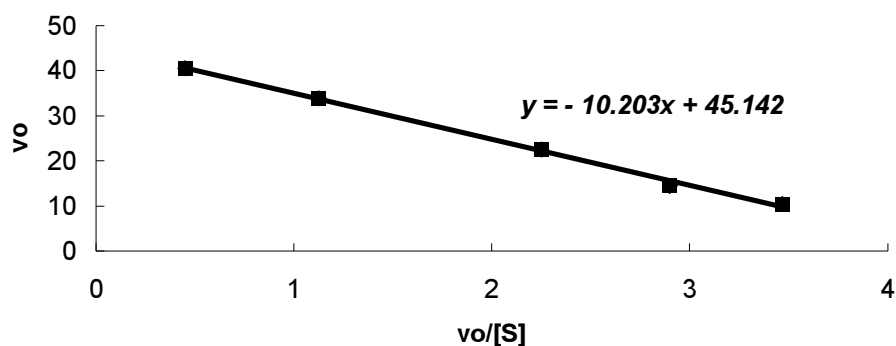


směrnice přímky  $= 0,0222 \Rightarrow 1/V_{\max} = 0,0222 \Rightarrow V_{\max} = 45,05 \mu\text{mol}/\text{min}$   
 úsek osy  $y = 0,225 \Rightarrow K_M/V_{\max} = 0,225 \Rightarrow K_M = 10,13 \mu\text{mol}/\text{l}$   
 průsečík přímky a osy  $x$  má souřadnice  $[-K_M; 0]$

Dostí přesné, i když méně používané, je vyhodnocení dat podle Eadieho a Hofsteeho nebo podle Eadieho a Scatcharda:

| experimentálně získaná data  |                                  | výnos podle Eadieho a Hofsteeho |       |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------|
| [S]<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $v_0$<br>( $\mu\text{mol/min}$ ) | $v_0/[S]$                       | $v_0$ |
| 3                            | 10.4                             | 3.467                           | 10.4  |
| 5                            | 14.5                             | 2.9                             | 14.5  |
| 10                           | 22.5                             | 2.25                            | 22.5  |
| 30                           | 33.8                             | 1.127                           | 33.8  |
| 90                           | 40.5                             | 0.45                            | 40.5  |

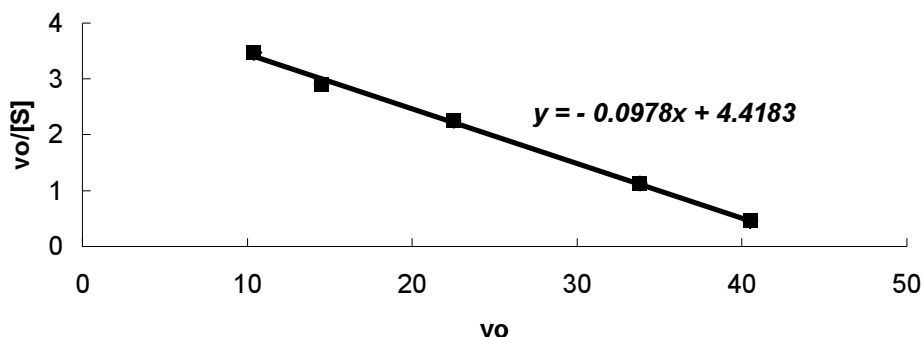
### Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Eadieho a Hofsteeho



úsek osy  $y = 45,142 \Rightarrow V_{\max} = 45,14 \mu\text{mol/min}$   
 směrnice přímky  $= -10,203 \Rightarrow -K_M = -10,203 \Rightarrow K_M = 10,20 \mu\text{mol/l}$   
 průsečík přímky a osy  $x$  má souřadnice  $[V_{\max}/K_M; 0]$

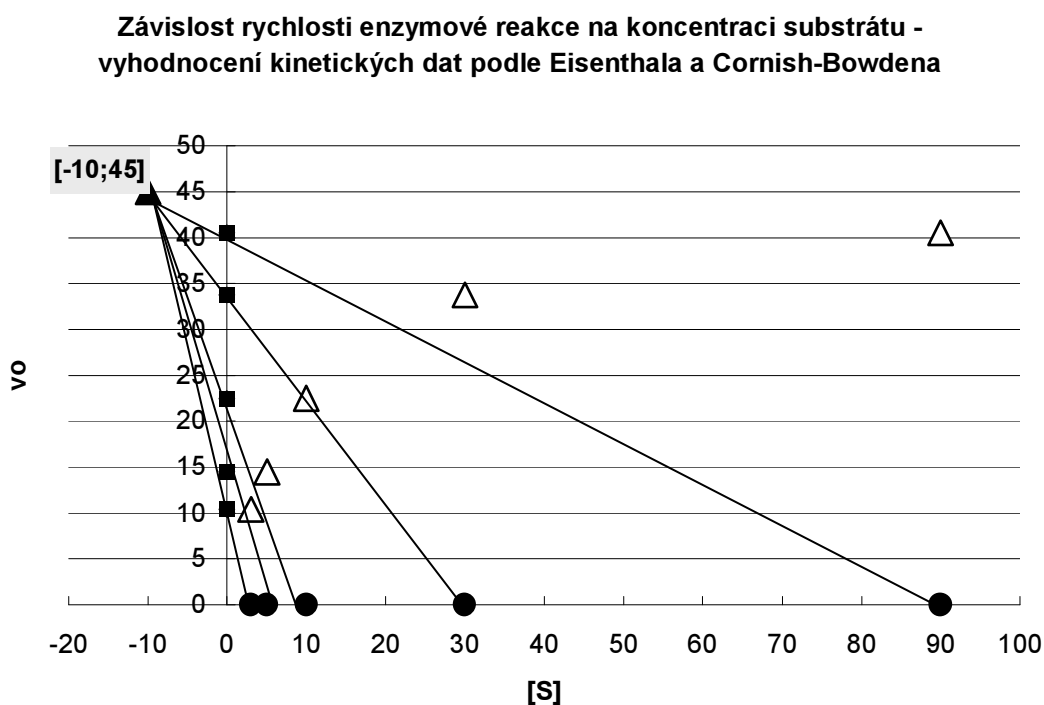
| experimentálně získaná data  |                                  | výnos podle Eadieho a Scatcharda |           |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------|
| [S]<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $v_0$<br>( $\mu\text{mol/min}$ ) | $v_0$                            | $v_0/[S]$ |
| 3                            | 10.4                             | 10.4                             | 3.467     |
| 5                            | 14.5                             | 14.5                             | 2.9       |
| 10                           | 22.5                             | 22.5                             | 2.25      |
| 30                           | 33.8                             | 33.8                             | 1.127     |
| 90                           | 40.5                             | 40.5                             | 0.45      |

### Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Eadieho a Scatcharda



směrnice přímky =  $-0,0978 \Rightarrow -1/K_M = -0,0978 \Rightarrow K_M = 10,22 \mu\text{mol/l}$   
 úsek osy  $y = 4,4183 \Rightarrow V_{\text{max}}/K_M = 4,4183 \Rightarrow V_{\text{max}} = 45,16 \mu\text{mol/min}$   
 průsečík přímky a osy  $x$  má souřadnice  $[V_{\text{max}}, 0]$

Další grafická metoda stanovení hodnot  $K_M$  a  $V_{\text{max}}$  (podle Eisenthala a Cornish-Bowdena) spočívá v sestrojení spojnic mezi příslušnými hodnotami  $[S]$  (na ose  $x$  - černá kolečka) a  $v_o$  (na ose  $y$  - černé čtverečky) u normální saturační křivky (závislost  $v_o$  na  $[S]$  podle rovnice Michaelise a Mentenové - bílé trojúhelníčky). Průsečík všech spojnic (černý trojúhelníček) ve 4. kvadrantu má souřadnice  $[-K_M; V_{\text{max}}]$  ( $[-10; 45]$ ):











## úloha 8.

### d) Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci inhibitoru, stanovení $K_i$ a typu inhibice

#### Princip:

Katalytickou účinnost enzymů ovlivňuje řada látek - efektorů (modifikátorů). Zvyšují-li aktivitu enzymu, jedná se o *pozitivní efekty - aktivátory*; snižují-li aktivitu enzymu, jedná se o *negativní efekty - inhibitory*. Efekty mění aktivitu enzymu tím, že se vážou buď přímo v aktivním centru enzymu, nebo mimo ně (allosterické efekty).

Podle možnosti obnovit původní aktivitu enzymu lze rozlišit *vratnou (reverzibilní)* a *nevratnou (ireverzibilní)* inhibici. Reverzibilní inhibitor lze z enzymu odstranit (např. dialýzou) a obnovit tak enzymovou aktivitu. Při ireverzibilní inhibici se již nedá aktivita enzymu žádným způsobem obnovit; spíše než o inhibici se tedy jedná o *inaktivaci* enzymu. Kinetika je ireverzibilní inhibice (inaktivace) jednoduchá: postupnými přídávky inhibitoru se rozsah inhibice stále zvětšuje, až je všechn enzym vázán do komplexu enzym-inhibitor a tím inaktivován.

Reverzibilní inhibitory působí nejčastěji následujícími mechanismy: buďto vyvolávají změnu struktury molekuly enzymu a následkem toho pak enzym ztrácí schopnost katalytické účinnosti, anebo konkurují substrátu při vazbě na aktivní centrum a tím snižují rychlost přeměny substrátu.

Z hlediska mechanismu působení na enzym existují čtyři základní typy (zpravidla reverzibilní) inhibice, navzájem dobře rozeznatelné kinetickým měřením - srovnáním velikosti Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce naměřených bez inhibitoru ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) a v jeho přítomnosti ( $K_M'$ ,  $V_{max}'$ ):

- *kompetitivní inhibice* - inhibitor neovlivňuje maximální rychlost reakce ( $V_{max}' = V_{max}$ ), ale zvyšuje Michaelisovu konstantu ( $K_M' > K_M$ ),
- *nekompetitivní inhibice* - inhibitor snižuje maximální rychlost reakce ( $V_{max}' < V_{max}$ ), Michaelisova konstanta se však nemění ( $K_M' = K_M$ ),
- *akompetitivní inhibice* - inhibitor snižuje maximální rychlost reakce i Michaelisovu konstantu, ale tak, že se nemění jejich poměr ( $K_M'/K_M = V_{max}'/V_{max}$ ),
- *smíšená inhibice* - inhibitor mění maximální rychlost reakce, Michaelisovu konstantu i jejich poměr ( $K_M'/K_M \neq V_{max}'/V_{max}$ ).

*Kompetitivní inhibitory* mají strukturu (celé molekuly nebo její části uplatňující se ve vazbě na enzym) natolik podobnou substrátu, že je enzym nerozezná a tvoří s nimi namísto komplexu enzym-substrát inaktivní komplex enzym-inhibitor, který se nepřeměňuje na produkt (inhibitor není schopen se přeměnit na produkt). Tvorba komplexu enzym-kompetitivní inhibitor je vratná. Je-li současně přítomen substrát, soutěží s inhibitorem o aktivní místo enzymu. Rozsah inhibice pak závisí na poměru koncentrací obou látek a na poměru jejich afinit k enzymu. Účinek inhibitoru lze zcela odstranit nadbytkem substrátu. K dosažení maximální rychlosti reakce v přítomnosti inhibitoru je třeba vyšší koncentrace substrátu než v prostředí bez inhibitoru. Kompetitivní inhibice je důsledkem neabsolutní specifity enzymu.

*Nekompetitivní inhibitory* v typickém případě neovlivňují vazbu substrátu na enzym, ale snižují rychlost přeměny substrátu na produkt. Někdy se však mohou ireverzibilně vázat do aktivního centra enzymu, případně poblíž aktivního centra, a v tomto druhém případě stericky bránit přístupu substrátu k aktivnímu centru enzymu. Jejich účinek je nezávislý na koncentraci substrátu (nesoutěží se substrátem o vazebné místo) a nelze jej odstranit zvýšením koncentrace substrátu. Rozsah inhibice závisí pouze na koncentraci inhibitoru a jeho afinitě k enzymu. Jestliže se vážou zcela mimo aktivní centrum enzymu, je mechanismus jejich účinku zpravidla založen na allosterickém efektu: inhibitory mění konformaci enzymu z aktivní na inaktivní prostřednictvím šířící se změny struktury, kterou vyvolávají vazbou na molekulu enzymu. Ve výsledku je situace podobná, jako kdyby byla v reakční směsi snížena koncentrace enzymu, který je k dispozici pro katalýzu.

*Akompetitivní inhibitory* se mohou vázat na enzym, teprve když vazba substrátu vhodně pozmění konformaci enzymu. Nevážou se tedy na volný enzym, ale na komplex enzym-substrát, přičemž zabrání přeměně substrátu na produkt. Akompetitivní inhibici nelze zrušit nadbytkem substrátu. Je typická pro vícesubstrátové reakce (proto nebude dále podrobněji popisována).

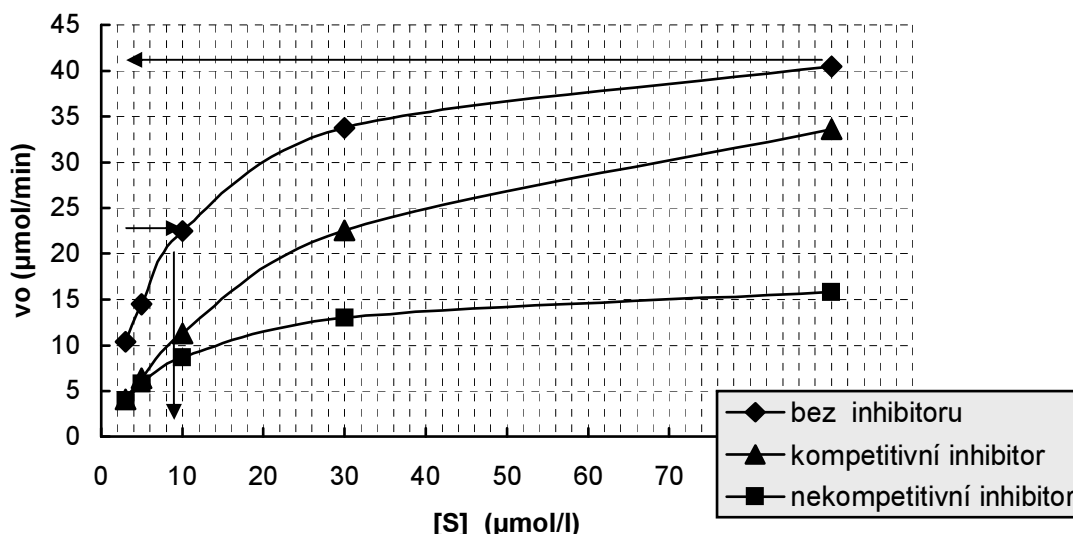
Důležitou skupinou přirozených inhibitorů tvoří inhibitory polypeptidové povahy, které inaktivují některé proteolytické enzymy. Patří sem i skupina inhibitorů trypsinu.

Účinek inhibitoru kvantitativně charakterizuje *inhibiční konstanta*  $K_i$ , která udává koncentraci inhibitoru  $[I]$  (mol/l), při níž je dosaženo právě 50 % inhibice enzymu (50 % enzymu přítomného v reakční směsi je vázáno do komplexu enzym-inhibitor).

Následující tabulka a graf uvádějí experimentálně zjištěné hodnoty počáteční rychlosti enzymové reakce v závislosti na koncentraci substrátu bez inhibitoru, v přítomnosti kompetitivního (inhibitor A) a v přítomnosti nekompetitivního (inhibitor B) inhibitoru:

|                              | <i>bez inhibitoru</i>            | <i>inhibitor A</i>               | <i>inhibitor B</i>               |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| [S]<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $v_0$<br>( $\mu\text{mol/min}$ ) | $v_0$<br>( $\mu\text{mol/min}$ ) | $v_0$<br>( $\mu\text{mol/min}$ ) |
| 3                            | 10.4                             | 4.1                              | 3.96                             |
| 5                            | 14.5                             | 6.4                              | 5.75                             |
| 10                           | 22.5                             | 11.3                             | 8.7                              |
| 30                           | 33.8                             | 22.6                             | 13                               |
| 90                           | 40.5                             | 33.6                             | 15.8                             |

**Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu v přítomnosti kompetitivního a nekompetitivního inhibitoru**



Z grafu lze odečíst jak kinetické parametry neinhibované reakce ( $K_M$ ,  $V_{max}$  - znázorněno šipkami), tak parametry reakcí inhibovaných ( $K_M'$ ,  $V_{max}'$ ), a z jejich hodnoty usuzovat na typ inhibice (kompetitivní, nekompetitivní). Přesnější zjištění hodnot  $K_M$ ,  $V_{max}$  a  $K_M'$ ,  $V_{max}'$  opět umožňují lineárnizované výnosy experimentálně zjištěných dat (podle Lineweavera a Burka, podle Hanese, podle Eadieho a Hofsteeho, podle Eadieho a Scatcharda), ze kterých lze navíc snadno zjistit velikost inhibiční konstanty  $K_i$  použitého inhibitoru.

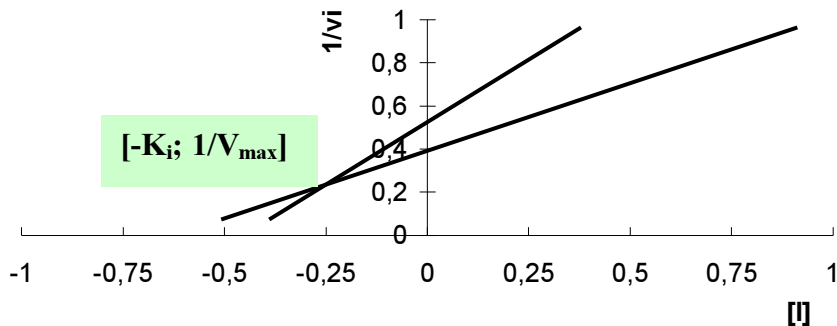
Experimentálně jednodušší a přitom přesnější postup zjištění velikosti  $K_i$  však spočívá (nikoliv v měření závislosti  $v_0$  na  $[S]$  v přítomnosti a nepřítomnosti inhibitoru, ale) v měření závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci inhibitoru při konstantní koncentraci substrátu v reakční směsi (měření je nutno provést při alespoň dvou konstantních koncentracích substrátu). Jde o přímou metodu zjištění  $K_i$  podle Dixona, která zároveň umožňuje usuzovat na typ inhibice. Nevyžaduje přitom znalost kinetických parametrů neinhibované reakce.

Grafické vyhodnocení je provedeno výnosem hodnot  $1/v_0$  proti  $[I]$ .

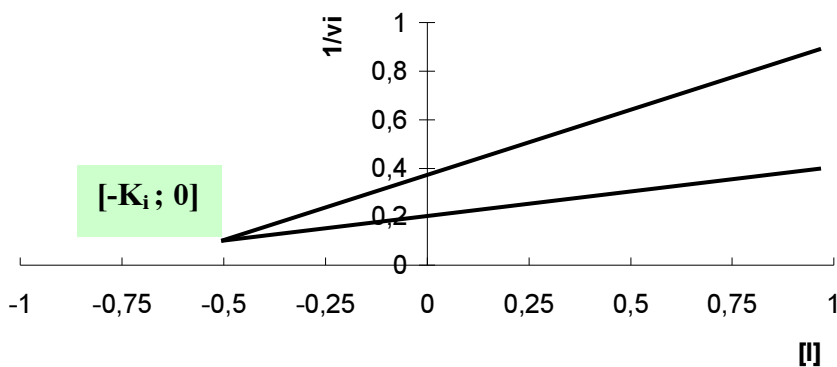
Při kompetitivní inhibici se přímky závislosti  $1/v_0$  proti  $[I]$  naměřené při dvou různých koncentracích substrátu protínají ve 4. kvadrantu, jejich průsečík má souřadnice  $[-K_i; 1/V_{max}]$ .

Při nekompetitivní inhibici se přímky závislosti  $1/v_0$  proti  $[I]$  naměřené při dvou různých koncentracích substrátu protínají na ose  $x$ , jejich průsečík má souřadnice  $[-K_i; 0]$ .

**Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci kompetitivního inhibitoru - vyhodnocení podle Dixona**



**Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci nekompetitivního inhibitoru - vyhodnocení podle Dixona**



**Materiál a vybavení:**

0,8 % roztok preparátu trypsinu s glukosou (0,2 g/25 ml vody) (zásobní preparát: trypsin : glukosa = 1 : 20)

40 mmol/l roztok BAPNA v dimethylsulfoxidu (DMS)

60 mmol/l Tris-Cl pufr s přidavkem 30 mmol/l chloridu vápenatého, pH 8,2

dimethylsulfoxid (DMS)

30 % kyselina octová

1  $\mu$ M TIS v Tris-pufu (0,027 mg/ml)

zkumavky, pipety, vortex, termostat, stopky

**Postup:**

Do 24 zkumavek (paralelní dvojice) pipetujte 1,5 ml pufru a dále podle rozpisu:

| zk. č.   | ml roztoku BAPNA | ml roztoku inhibitoru TIS | ml DMS | ml vody | start reakce - čas na stopkách | konec reakce - čas na stopkách | A <sub>405</sub> | ØA <sub>405</sub> | c <sub>PNA</sub> (mmol/l) | n <sub>PNA</sub> (µmol) | v <sub>0</sub> (µmol/min) |
|----------|------------------|---------------------------|--------|---------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1<br>2   | 0,025            | 0,000                     | 0,025  | 0,400   | 20''<br>40''                   | 10'20''<br>10'40''             |                  |                   |                           |                         |                           |
| 3<br>4   | 0,025            | 0,050                     | 0,025  | 0,350   | 1'<br>1'20''                   | 11'<br>11'20''                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 5<br>6   | 0,025            | 0,075                     | 0,025  | 0,325   | 1'40''<br>2'                   | 11'40''<br>12'                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 7<br>8   | 0,025            | 0,100                     | 0,025  | 0,300   | 2'20''<br>2'40''               | 12'20''<br>12'40''             |                  |                   |                           |                         |                           |
| 9<br>10  | 0,025            | 0,125                     | 0,025  | 0,275   | 3'<br>3'20''                   | 13'<br>13'20''                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 11<br>12 | 0,025            | 0,150                     | 0,025  | 0,250   | 3'40''<br>4'                   | 13'40''<br>14'                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 13<br>14 | 0,050            | 0,000                     | 0,000  | 0,400   | 20''<br>40''                   | 10'20''<br>10'40''             |                  |                   |                           |                         |                           |
| 15<br>16 | 0,050            | 0,050                     | 0,000  | 0,350   | 1'<br>1'20''                   | 11'<br>11'20''                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 17<br>18 | 0,050            | 0,075                     | 0,000  | 0,325   | 1'40''<br>2'                   | 11'40''<br>12'                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 19<br>20 | 0,050            | 0,100                     | 0,000  | 0,300   | 2'20''<br>2'40''               | 12'20''<br>12'40''             |                  |                   |                           |                         |                           |
| 21<br>22 | 0,050            | 0,125                     | 0,000  | 0,275   | 3'<br>3'20''                   | 13'<br>13'20''                 |                  |                   |                           |                         |                           |
| 23<br>24 | 0,050            | 0,150                     | 0,000  | 0,250   | 3'40''<br>4'                   | 13'40''<br>14'                 |                  |                   |                           |                         |                           |

Zkumavky inkubujte v termostatu temperovaném na teplotu 37 °C po dobu cca 10 minut. Zkumavky rozdělte na dvě skupiny (1-12 a 13-24) a v každé skupině proveďte enzymovou reakci zvlášť.

Enzymovou reakci startujte přidávkem 0,05 ml roztoku trypsinu v intervalech 20 sekund (spusťte stopky, po 20 sekundách startujte přidávkem enzymu ve zkumavce č. 1 – důkladně promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 20 sekundách startujte přidávkem enzymu ve zkumavce č. 2, atd., viz tabulka). Přesně po 5 minutách opět v pravidelných intervalech 20 sekund reakci zastavujte přidávkem 0,5 ml kyseliny octové - důkladně promíchejte.

Jako slepé vzorky připravte:

- pro zkumavky č. 1 - 12: 1,5 ml Tris-pufry, 0,025 ml roztoku BAPNA, 0,025 ml DMS, 0,4 ml vody, 0,5 ml kyseliny octové a 0,05 ml roztoku trypsinu – přidejte do směsi jako poslední,
- pro zkumavky č. 13 - 24: 1,5 ml Tris-pufry, 0,050 ml roztoku BAPNA, 0,4 ml vody, 0,5 ml kyseliny octové a 0,05 ml roztoku trypsinu – přidejte do směsi jako poslední.

Změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 405 nm proti příslušnému slepému vzorku.

### Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními ( $A_{405}$ ) a vypočtenými údaji.

( $\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

objem vzorku pro fotometrii (ml):

Experimentální výsledky graficky zpracujte pomocí linearizovaného výnosu podle Dixon.

Experimentálně zjištěné a vypočtené údaje nejprve přehledně shrňte do tabulky:

objem reakční směsi (ml):

| $C_{\text{inhibitor}}$<br>(mol/l) | koncentrace substrátu<br>(mmol/l) 0,5   |         | koncentrace substrátu<br>(mmol/l) 1     |         |
|-----------------------------------|---|---------|---|---------|
|                                   | $v_0$<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) | $1/v_0$ | $v_0$<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) | $1/v_0$ |
|                                   |   |         |   |         |
|                                   |   |         |   |         |
|                                   |   |         |   |         |
|                                   |   |         |   |         |
|                                   |   |         |   |         |
|                                   |   |         |   |         |

Z grafu odečtete hodnotu  $K_i$  inhibitoru a určete, o jaký typ inhibice se jedná:

$K_i$ :

typ inhibice:

Na základě znalosti reakce katalyzované trypsinem, struktury aktivního centra trypsinu, struktury substrátu a inhibitoru zjištěné výsledky vysvětlete: