

Enzymová kinetika – část 4 (vícesubstrátové reakce)

Úloha 1

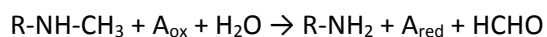
Nukeosiddifosfokinasa z lidských erythrocytů katalyzuje reakci $\text{GTP} + \text{dGDP} \rightarrow \text{GDP} + \text{dGTP}$. Závislost počáteční rychlosti na koncentracích substrátů shrnuje tabulka udávající hodnoty počátečních rychlostí v ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) pro různé kombinace obou substrátů:

	[GTP] ($\mu\text{mol/l}$)			
[dGDP] ($\mu\text{mol/l}$)	22	30	50	200
20	0,095	0,112	0,141	0,196
25	0,102	0,120	0,155	0,223
40	0,112	0,136	0,180	0,284
100	0,125	0,156	0,218	0,385

Určete pomocí primárního a sekundárního výnosu kinetické parametry K_M^{dGDP} , K_M^{GTP} a v_{lim} . Jaký je pravděpodobný mechanismus reakce? Kterých nezávislých metod by bylo možno využít k jeho ověření?

Úloha 2

Enzym N-methylglutamátdehydrogenasa z bakterie *Pseudomonas MA* katalyzuje oxidaci N-methylaminokyseliny podle rovnice:



v níž A_{ox} a A_{red} symbolizuje oxidovanou a redukovanou formu elektronového akceptoru. Při fixní počáteční koncentraci umělého akceptoru 2,6-dichlorfenolindofenolu rovné 50 $\mu\text{mol/l}$ byly pro reakce různých substrátů zjištěny následující zdánlivé kinetické parametry:

substrát	K_M ($\mu\text{mol/l}$)	v_{lim} ($\text{nmol min}^{-1} (\text{mg proteinu})^{-1}$)
N-methyl-L-glutamát	43	74
N-methyl-L-soleucin	200	79
N-methyl-L-aspartát	1300	77
N-methyl-L-fenylalanin	2500	80
N-methyl-L-alanin	6000	78
N-methyl-L-serin	36000	76
N-methyl-L-glycin	100000	74

Výsledky kinetického studia různých akceptorů A při saturující koncentraci N-methyl-L-glutamátu udává tabulka:

akceptor	K_M (mmol/l)	v_{lim} ($\text{nmol min}^{-1} (\text{mg proteinu})^{-1}$)
hexakvanoželezitan	1,4	22
2,6-dichlorfenolindofenol	0,054	120
fenazinmethosulfát	0,011	360

Závislosti reciproké počáteční rychlosti na reciproké koncentraci N-methyl-L-glutamátu pro různé fixní koncentrace 2,6-dichlorfenolindofenolu představovaly vzájemně rovnoběžné přímky. Reakci inhibovaly glutarát a 2-oxoglutarát kompetitivně s N-methyl-L-glutamátem. Reakční produkty L-glutamát a formaldehyd neinhibovaly ani v koncentracích $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, až již byly aplikovány odděleně nebo ve směsi. Navrhněte mechanismus enzymové reakce, který by byl v souladu s experimentálními nálezy. Který krok patrně určuje výslednou rychlost pochodu?

Úloha 3

Reakci katalysovanou adenylátkinasou (ATP:AMP-fosfotransferasa) inhibuje analog přechodového stavu P^1, P^4 -bis(adenosin-5')tetrafosfát ($A_{P_4}A$) kompetitivně vzhledem k oběma substrátům (MgATP i AMP). Jaký je pravděpodobný mechanismus adenylátkinasové reakce?

Úloha 4

Enzym L-threonindehydrogenasa katalysuje oxidaci L-threoninu NAD^+ . Přitom vzniká NADH a L-2-amino-3-oxobutyrate, který spontánně dekarboxyluje na aminoaceton a CO_2 . Ze studia závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátů vyplynulo, že reakce má sekvenční mechanismus. K přesnějšímu určení bylo užito strukturních analogů substrátů L-allothreoninu a adenosin-5'-difosforibosy. Ukázalo se, že obě látky inhibují studovanou reakci. V případě L-allothreoninu je inhibice kompetitivní vzhledem k L-threoninu a akompetitivní vzhledem k NAD^+ . Naproti tomu adenosin-5'-difosforibosa kompetuje s NAD^+ a vzhledem k L-threoninu má charakter inhibitoru nekompetitivního. Interpretujte popsané výsledky a navrhněte mechanismus L-threonindehydrogenasové reakce.

Úloha 5

Malátdehydrogenasa (dekarboxylující) katalysuje oxidační dekarboxylaci L-malátu podle rovnice:



Průběh reakce lze sledovat fotometricky. Při kinetickém studiu bylo zjištěno, že oba primární výnosy měly tvar svazků protínajících se přímkou. K bližšímu vyjasnění mechanismu bylo testováno, zda přídavky jednoho z produktů ovlivní směrnici (s) nebo úsek (u) závislosti reciproké počáteční rychlosti na reciproké koncentraci variabilního substrátu. Výsledky uvádí tabulka:

Variabil. substr. / Produkt	NADPH	HCO ₃ ⁻	pyruvát
L-malát	s, u	s, u	u
NADP ⁺	s	s, u	u

Interpretujte vhodně tato zjištění a pomocí Clelandova schematu nakreslete pravděpodobný reakční mechanismus.

Úloha 6

Enzym prolylhydroxylasa katalyzuje syntézu hydroxyprolinu v kolagenu hydroxylací určitých prolinových zbytků peptidového substrátu. Kromě peptidu jako substráty slouží 2-oxoglutarát, kyslík, železnatý ion a redukční činidlo (např. askorbát). Při reakci dochází k stechiometrické dekarboxylaci 2-oxoglutarátu na sukcinát a CO_2 , přičemž se jeden atom kyslíku z molekuly O_2 inkorporuje do hydroxyprolinu a druhý do vznikajícího sukcinátu. Kinetika prolylhydroxylasové reakce byla studována pomocí měření koncentračních závislostí počáteční rychlosti. Ve všech případech byla postupně měřena koncentrace jednoho z ligandů při různých fixních koncentracích ligandu druhého; koncentrace všech ostatních komponent zůstávaly konstantní. Zpracování výsledků se dělo formou obvyklých reciprokových výnosů. Přitom se dospělo k následujícím poznatkům:

- a) Závislosti $1/v$ na $1/[2\text{-oxoglutarát}]$ při různých fixních koncentracích Fe^{2+} měly charakter přímek vzájemně se protínajících na svislé ose, kdežto průsečík přímek $1/v$ vs. $1/[\text{Fe}^{2+}]$ pro fixní koncentrace 2-oxoglutarátu ležel od svislé osy vlevo.
 - b) U párů tvořených substráty Fe^{2+} , 2-oxoglutarát, O_2 a polypeptid $(\text{Pro-Pro-Gly})_n$ měly primární grafy vesměs podobu svazku přímek protínajících se nalevo od svislé osy. V případě vysoké (saturující) koncentrace O_2 se ve výnosu $1/v$ vs. $1/[(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}]$ pro různé fixní koncentrace 2-oxoglutarátu získaly rovnoběžky.
 - c) Rovnoběžné přímky se v primárních grafech objevily i ve všech případech, kdy jedním ze substrátů byl askorbát.
 - d) Poly (L-prolin) inhiboval reakci kompetitivně vzhledem k peptidovému substrátu a kompetitivně vzhledem k Fe^{2+} a 2-oxoglutarátu.
 - e) Reakční produkt sukcinát působil jako kompetitivní inhibitor vzhledem k 2-oxoglutarátu a jako inhibitor nekompetitivní vzhledem k ostatním substrátům.
 - f) Inhibice kolagenem byla nekompetitivní vzhledem ke všem substrátům.
- Diskutujte význam poznatků shrnutých v bodech a-f a navrhněte mechanismus prolylhydroxylasové reakce.