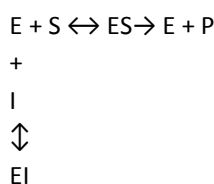


A Szukcinát-dehidrogenáz kompetitív gátlása malonáttal

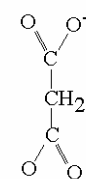
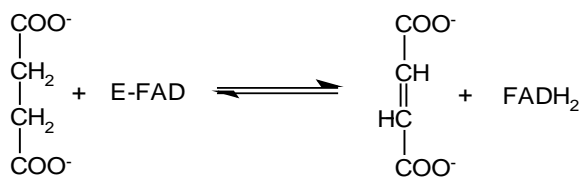
Az enzimeket számos anyag gátolhatja, illetve aktiválhatja. Aspecifikus enzimgátlást létre lehet hozni, pl. pH, hőmérséklet, ionkoncentráció drasztikus megváltozása, az enzimefehérje denaturálása révén. Az enzimműködés tanulmányozása szempontjából fontosabb a specifikus gátlószerek hatásának vizsgálata. Valamely specifikus gátlószer hatását legjobban az enzim aktivitására kifejtett hatásán keresztül tanulmányozhatjuk. Az enzimaktivitás követésével különböző gátlástípusokat különíthetünk el.

Kompetitív gátlás esetén a gátlószer olyan vegyület, ami reverzibilisen kötődik az enzimhez és így több szubsztrátra van szükség ahhoz, hogy az enzim a maximális reakciósebesség felével működjön, azaz a Michaelis konstans, a K_m nő. A gátlás lényege az, hogy kevesebb szabad enzim áll rendelkezésre az ES-komplex kialakulásához. A szubsztrátkoncentráció emelésével a gátlás kivédhető, a V_{max} nem változik.



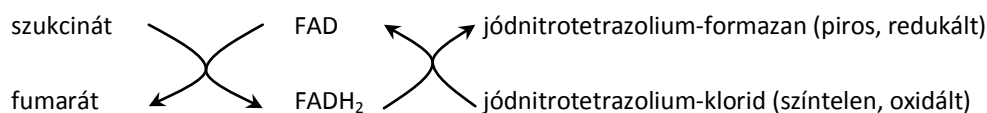
A fenti definícióból következik, hogy a kompetitív gátlás fogalma kizárólag az enzim kinetikai viselkedését jellemzi gátlószer mellett és nem mond semmit az enzim és inhibitor molekula közötti kölcsönhatás szerkezeti háttéréről (pl. arról sem, hogy az inhibitor az aktív centrumhoz vagy alloszterikus helyhez kötődik, bár történelmileg az első leírt kompetitív gátlószerek a szubsztrát szerkezeti analógjai voltak, amelyek az enzim aktív centrumához kötődnek, és a malonát is szubsztrátanalóg).

A szukcinát-dehidrogenáz a citrátciklus egyetlen enzimje, amely a mitokondrium belső membránjában, és nem a mátrixban van, és egyben a légzési lánc II. komplexe is. Csak ennek a komplexnek nincs protonpumpa aktivitása. Jelen kísérletben a malonsav, a 3 szénatomos dikarbonsav, szukcinát-dehidrogenázra gyakorolt kompetitív gátló hatását vizsgálják. Az enzim szorosan kötött FAD proszтетikus csoportot (és vas-kén centrumokat) tartalmaz hidrogén- ill. elektronakceptorként. A gyakorlaton különböző koncentrációjú szukcinátnak, mint szubsztrátnak a fumaráttá való oxidációját vizsgálják malonát nélkül és gátlószerrel.



Malonate = malonát

A mitokondriumban az elektron a II. komplexről az ubikinonra (koenzim Q) kerül, a kísérletben az enzim a borostyánkősavról (szukcinát) átvett hidrogént aktivitásának mértékében képes megfelelő redoxfestéknek (tetrazólium sóknak) átadni. A kísérletben használt p-jódnitrotetrazólium-klorid (INT) oxidált alakja színtelen, redukált alakja, a jódnitroformazán, piros színű, nem autooxidálható. Az oldat fotométerrel mérhető abszorbanciája (A) arányos a jódnitroformazán koncentrációjával (c), ami viszont az enzim aktivitásától függ ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$, ahol $\epsilon = 0,0184 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ a formazánra jellemző arányossági állandó, vagyis $1 \mu\text{M}$ koncentrációjú formazán oldat abszorbanciája 1 cm fényúthossz esetén (régiben mikromoláris extinkciós koefficiens), $l = 1 \text{ cm}$ a fényút hossza a mért oldatban).



A formazán termék koncentrációja az eredeti reakcióelegy térfogatában a Lambert—Beer törvény alapján számolható

$$c_{\text{formazán}} = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \cdot 7, \text{ ahol } A \text{ az abszorbancia } 490 \text{ nm-en, } \epsilon = 0,0184 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}, l = 1 \text{ cm és } 7 \text{ a hígulási faktor (0,5 ml reakcióelegy}$$

7-szeresére hígul a leállító reagenssel).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S=szukcinát mM										
1/S mM ⁻¹										
A (abszorbancia)										
formazán μmol/l= μM										
v μM/min										
1/v min/μM										

Az eredmények értékeléséhez a Michaelis-Menten egyenletet alkalmazzuk $v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S}$, kettős reciprok ábrázolásban

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}. \text{ A modell érvényességi feltételeit (ld. enzimkinetika számítógépes szimulációja című gyakorlat)}$$

ellenőrizni szükséges. Nagy valószínűséggel a steady-state nem áll fenn, ha a reakció alatt az alkalmazott szubsztrát több mint 10 %-a alakult át terméké. Ezért szükséges összevetni a reakció teljes ideje alatt keletkezett formazán mennyiségét a rendelkezésre álló szubsztrát mennyiségével (szukcinát mennyisége) és azokat az eredményeket, amelyeknél a feltétel nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni az értékelésnél.

Ábrázolás:

1. Ábrázolja ugyanazon a miliméterpapíron a szukcinát-dehidrogenáz aktivitását (v reakciósebesség) a szubsztrátkoncentráció ([S] = [szukcinát]) függvényében gátlószer nélkül és malonsav jelenlétében. Jellemezze a gátlástípust a görbe lefutása alapján.

2. A kettősreciprok ábrázolás segítségével próbálja leolvasni a K_m és v_{\max} értékek reciprokát majd kiszámolni a két kinetikai jellemzőt. Az ordináta nem a bal szélén van, mert a $-1/K_m$ a negatív tartományban található.