

## A Szukcinát-dehidrogenáz kompetitív gátlása

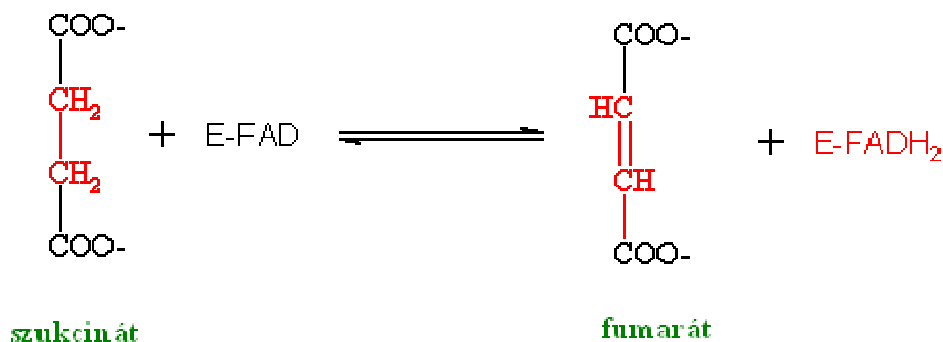
Az enzimeket számos anyag gátolhatja, illetve aktiválhatja, amelyek közül egyesek aspecifikusak, mások specifikusak. Aspecifikus enzimgátlást más módon is létre lehet hozni, pl. pH, hőmérséklet, ionkoncentráció drasztikus megváltozása, az enzimfehérje denaturálása stb. révén.). Az enzimműködés tanulmányozása 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 aszerint, hogy egy gátlószer hogyan hat az enzim aktivitására, különböző szubsztrátkoncentrációknál.

Kompetitív gátlás esetén a gátlószer olyan vegyület, ami szerkezetileg hasonlít a szubsztrátra. A szabad enzimhez kötődve megakadályozza a szubsztrát kapcsolódását, mintegy verseng a szubsztráttal az enzimhez való kötődésben. A szubsztrátkoncentráció emelésével a gátlás kivédhető. A kompetitív inhibitor hatására látszólag csökken az enzim affinitása a szubsztráthoz, azaz a  $K_M$  nő, míg a  $V_{max}$  nem változik. A gátlás lényege az, hogy az ES-komplex kialakulása gátolt, de elbomlása nem. Ha a hányadosban az ES mennyisége csökken, mert az enzim

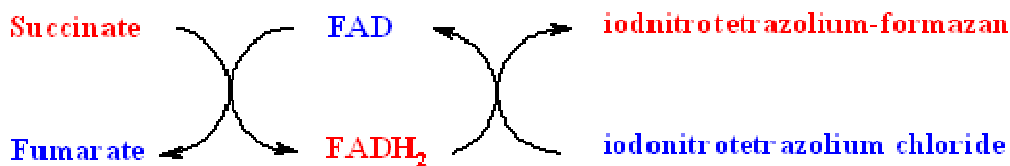
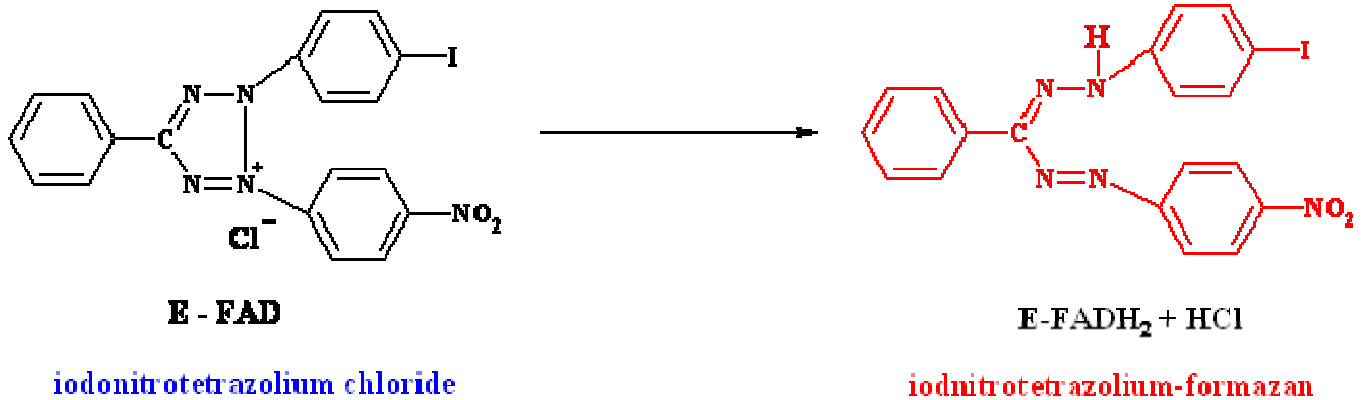
$$K_M = \frac{([E] - [ES]) * [S]}{[ES]}$$

egy része enzim-inhibítor (EI) komplexet képez, a tört értéke, azaz a  $K_M$  nő. A  $V_{max}$  nem változik, mert a már kialakult ES-komplex disszociációja (enzimre és termékre, illetve enzimre és szubsztrátra) változatlan. Meg kell még említenünk a látszólagos kompetitív gátlást, ahol az inhibitor nem az enzim aktiv centrumához kapcsolódik, hanem valamely más csoportjához, és az enzimfehérje harmadlagos szerkezetének megváltoztatásával gátolja annak szubsztrátkötő képességét. Kinetikailag nem különböztethető meg a valódi kompetitív gátlástól. Az allostérikus gátlások egy része is ilyen.

A szukcinát-dehidrogenáz (EC 1.3.99.1) a citrát-ciklus egyik enzime, ezért aktivitásának fokozása vagy gátlása közvetve befolyásolja a metabolitok többségének lebontását. Jelen kísérletben a malonsav szukcinát-dehidrogenázra gyakorolt gátló hatását vizsgáljuk. Az enzim kovalensen kötött FAD-ot tartalmaz. Ez a koenzim hidrogén akceptorként szerepel a következő reakcióban:



Az enzim a mitokondrium belső membránban lokalizálódik. Szervhomogenizátumok ismételt mosás után sem veszítik el szukcinát-dehidrogenáz aktivitásukat. az enzimaktivitást kolorimetriás eljárással mérjük. Az enzim a borostyánkősavról (szukcinát) átvett hidrogént aktivitásának mértékében képes megfelelő redox festéknek (tetrazólium sóknak) átadni. A kísérletben használt p-jódnitrotetrazolium klorid oxidált alakja szintelen, redukált alakja a jódnitro-formazán piros színű, nem autooxidálabilis.



#### Oldatok:

1. mitokondrium membrán 10 mg/ml fehérje KCl-TRIS pufferben pH 7,4
2. 0,5 M foszfát puffer pH 7,6
3. 2,5; 10; 100 mM borostyánkősav oldatok
4. 1 mM malonsav
5. 0,5 % jódnitrotetrazólium klorid (INT)
6. formiát-triton-formaldehid oldat (FTF)

## A kísérlet kivitelezése

Állítsák össze a következő oldalon levő táblázat szerint a kísérleti rendszereket. Számozott kémcsövekbe mérje össze a következő komponenseket:

Oldatok	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5 M foszfát puffer $\mu$ l	280	360	340	360	330	280	340	320	340	310	260
2,5 mM szukcinát $\mu$ l	-	20	40	-	-	-	20	40	-	-	-
10 mM szukcinát $\mu$ l	-	-	-	20	50	-	-	-	20	50	-
100 mM szukcinát $\mu$ l	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100
1 mM malonát $\mu$ l	-	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20
0,5 % INT $\mu$ l	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FTF ml	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mitokondrium membrán $\mu$ l	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
10 perc 37°C inkubálás											
FTF ml	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Keverje össze alaposan a kémcsövek tartalmát, a fényelnyelést mérje 490 nm-en a kontroll csővel szemben.

A reakció leállítása, a mitokondrium membrán szolubilizálása és a hidrofób formazán feloldása formiát-triton-formalin (FTF) eleggyel történik, a reakcióelegy szűrése vagy centrifugálása szükségtelen, közvetlenül fotomérhető. A jódnitrotetrazólium-formazán extinkciós koefficiense  $1,84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Számítsa ki a reakciósebességeket.

Ábrázolja a szukcinát-dehidrogenáz aktivitását a szubsztrátkoncentráció függvényében gátlószer nélkül és malonsav jelenlétében. Jellemezze a gátlástípust a görbe lefutása alapján.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S=szukcinát mM										
1/S 1/mM										
extinkció 490 nm										
formazán mol										
v mol/min										
1/v min/mol										