

## **ENZIMKINETIKAI PARAMÉTEREK KÍSÉRLETI MEGHATÁROZÁSA**

## Tartalomjegyzék

A szimulált kísérletek javasolt menete .....	3
A computer szimulációval vizsgált elméleti és gyakorlati kérdések.....	4
1. A reakciósebesség időfüggése.....	4
2. A hőmérséklet hatásai .....	6
3. A pH hatása .....	7
4. Kinetikai paraméterek statisztikai eloszlásának értékelése .....	8
Alkalmazások .....	10
1. Egy metabolikus út fiziológiásan releváns szubsztrátjának meghatározása .....	10
2. Egy metabolikus út sebesség-meghatározó lépésének azonosítása.....	11
Tesztkérdések .....	12

## A szimulált kísérletek javasolt menete

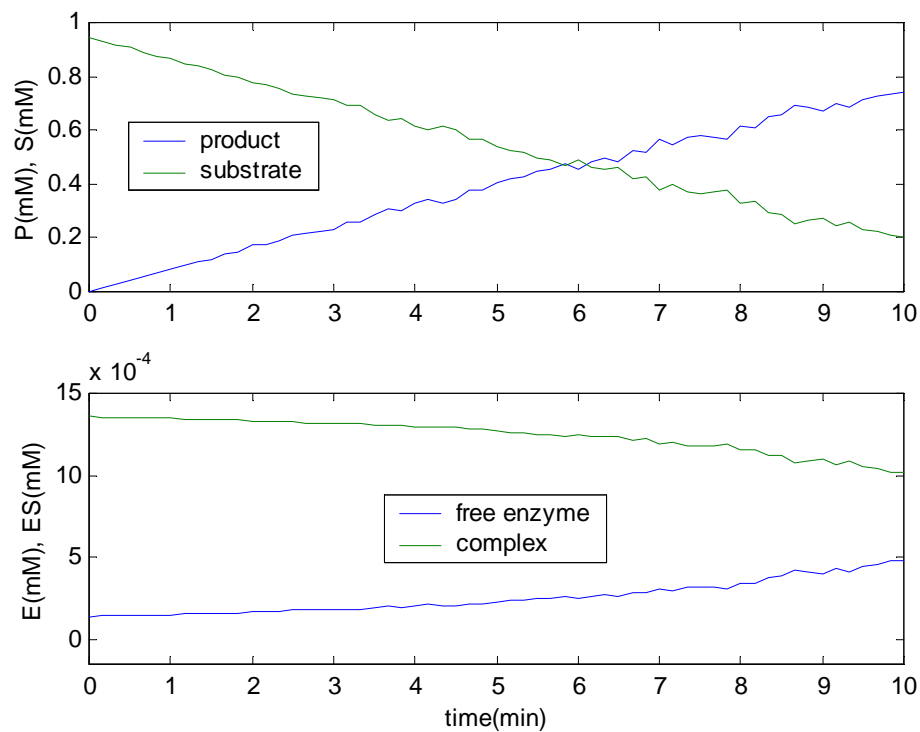
1. Állítsa be a kísérleti körülményeket. FIGYELEM! A mérési eredmények kísérleti hibát is tartalmaznak. Mindig kísérje figyelemmel a mért adatok számszerű értékeit is (a grafikus ábrázolásoknál a tengelyek automatikus beállítása miatt akár 10 %-os eltérés is óriási különbségnek tűnhet!)
  - a) válasszon reakciót (enzim  $E$  - szubsztrát párost)
  - b) vizsgálja meg a reakciósebesség pH- és hőmérséklet függését (jegyezze fel az értéktartományokat, ahol mérhető eredményeket kap)
  - c) vizsgálja meg a reakciósebesség enzimkoncentráció függését (a menüpont 1. Ábrája felhasználásával válasszon ki olyan enzimkoncentrációt, amely mellett a termék keletkezése lineáris). Hasznos támpont a kezdeti értékek megadásánál az *in vivo* koncentrációk értékei, amelyek minden képernyőn szerepelnek.
  - d) vizsgálja meg a reakciósebesség szubsztrátkoncentráció függését (a menüpont 1. Ábrája felhasználásával válasszon ki olyan szubsztrát-koncentráció tartományt, amely mellett a termék keletkezése lineáris). Hasznos támpont a kezdeti értékek megadásánál az *in vivo* koncentrációk értékei, amelyek minden képernyőn szerepelnek.
  - e) felhasználva a virtuális lehetőséget, hogy nyomon követhetjük az enzimszubsztrát komplex időbeli alakulását, ellenőrizze a steady-state feltétel érvényességét
2. Miután beállította a kísérleti körülményeket a Michaelis-Menten modellnek megfelelően, azonosítsa a kinetikai paramétereket (hogyan egyben a 2. Alkalmazás is elő legyen készítve, a meghatározást pH 7.2 -nél végezze el). A kísérleti hiba megbízható értékeléséhez legalább 5 ismétléssel dolgozzon (túl nagy számú ismétlés viszont elfogadhatatlanul hosszú kísérlethez vezet).
3. Határozza meg az azonosított kinetikai paraméterek statisztikai eloszlását (konfidencia tartományait). E lépést megelőzően a Computer szimuláció menüpont segítségével elő kell állítani nagyszámú (100 - 300) kinetikai paraméter-kombinációt szimulált kísérleti pontok alapján. Ha kísérleti pontonként kevesebb mint 10 ismétlést használ, a Monte Carlo szimulációs módszer ajánlott.
4. Ismétlje meg az 1. - 3. lépéseket minden egyes reakcióra. A gyorsabb kivitelezés érdekében a második és későbbi reakcióknál a "gyors és piszkos" azonosítási algoritmust használhatja.
5. Végezze el az 1. és 2. Alkalmazásban leírt feladatokat.

**A kísérlet minden fázisáról vezessen jegyzőkönyvet!**

# A computer szimulációval vizsgált elméleti és gyakorlati kérdések

## 1. A reakciósebesség időfüggése

Az enzim  $E$  katalizálta  $S \rightarrow P$  reakció sebessége a  $v = \frac{dP}{dt}$  egyenlettel fejezhető ki, vagyis a termék (P) folyamatos enzimaktivitás-mérés során nyert görbéjének első deriváltja:



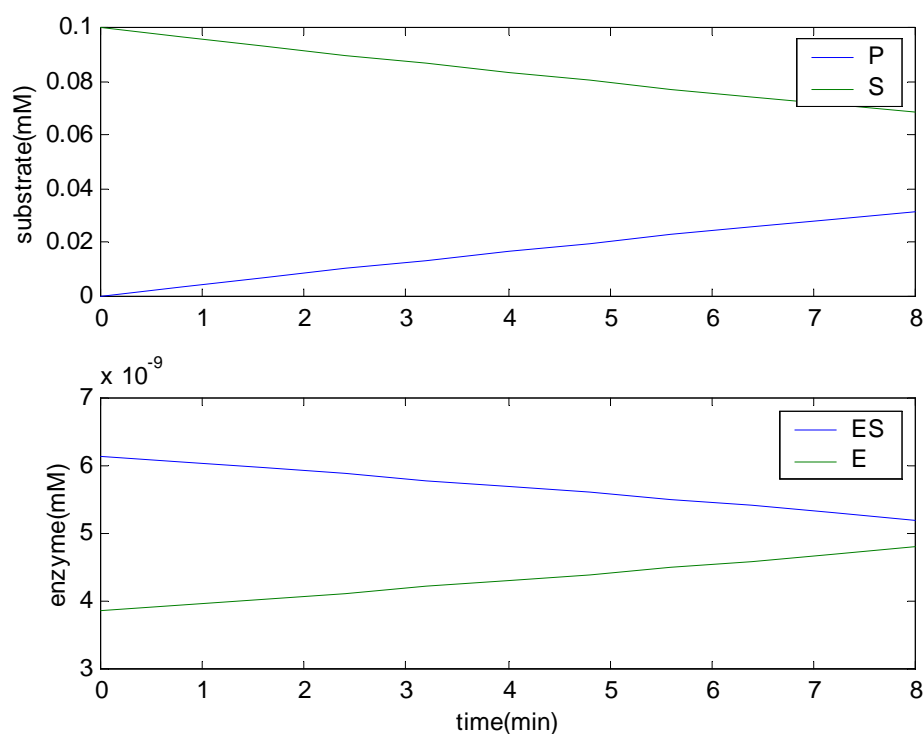
A folyamatos enzimaktivitás méréseknél egy minta elfoglalja a mérőműszert a reakció egész időtartamára, amely korlátozza az elvégezhető mérések számát. Ez a probléma nem áll fenn a végpontos enzimaktivitás-méréseknél, amikor a keletkezett terméket P csak egyszer kell megmérni a végidőpontban  $t_{max}$ .

Ilyenkor a reakciósebesség a  $v = \frac{P_{max}}{t_{max}}$  egyenlettel adható meg feltéve, hogy a kísérleti körülmények helyes beállításával biztosítjuk a termékkeletkezés

lineáritását (a mi computer szimulációnk ilyen végpontos mérést használ). Milyen hosszú  $t_{max}$  értéket kell választani a Michaelis-Menten egyenlet

$$\left( v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \right) \text{ érvényességéhez, ahol } v \text{ "kezdeti" reakciósebesség? Vizsgálja}$$

meg az  $E$  és  $S$  koncentrációk és  $t_{max}$  értékek különböző kombinációinak hatását a  $v$ -re! A fenti egyenlet "steady-state" állapotra vonatkozik (hogyan lehet definiálni ezt az állapotot?). Az alábbi ábrák felhasználásával tegyen javaslatot arra, hogy milyen kísérleti körülményeken kell változtatni a "steady-state" kritérium érvényesítéséhez:



A szimulált kísérletek első lépéseként határozza meg a Michaelis-Menten modell szempontjából megfelelő kísérleti körülményeket a felkínált 5 reakció esetében ( $E$ , tartomány  $S$ ,  $t_{max}$ )!

## 2. A hőmérséklet hatásai

A kollízió elmélet

Egy homogén fázisú kémiai reakció sebessége a reagáló molekulák hatásos összeütközéseinek gyakoriságától függ, amelyet a részecskék kinetikai energiája és végeredményben a hőmérséklet (T) határoz meg. Az Arrhenius

egyenlet  $k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$  kifejezi a kapcsolatot a hőmérséklet és a sebességi állandó ( $k$ , amely enzim katalizálta reakciók esetében általában megegyezik a katalitikus állandóval az  $ES \rightarrow E+P$  részfolyamatban) között ( $A$  és  $E_a$  a reakcióra jellemző állandók).

Az enzim stabilitására gyakorolt hatás

Az enzimek harmadlagos szerkezete nagyszámú gyenge non-kovalens molekulán belüli kötéseken alapszik. Ha a molekula túl sok energiát vesz fel (egy kritikus értéken túl) a harmadlagos szerkezet összeomlik és az enzim denaturálódik (aktivitása elvész). A hőmérséklet növeli azok molekulák számát, amelyek a denaturáló energiatartományba kerülnek, de ez a hatás időfüggő is (alacsonyabb hőmérsékleten a denaturálódó molekulák száma lassabban emelkedik mint magasabb hőmérsékleten).

A fentiekben felvázolt két ellentétes hatás egy csúcserőértéket eredményez az enzim katalizálta reakció sebességében, ha ezt a hőmérséklet függvényében ábrázoljuk ("optimális hőmérséklet"). Mit gondol, ez az érték egy fizikai állandó jellemző az enzimre vagy netán a kísérleti körülményektől függ? Vizsgálja meg a kérdést kísérletben! (Tanács: Mérje meg az "optimális hőmérsékletet" különböző  $t_{max}$  mellett!)

### **3. A pH hatása**

Az enzimek aktív centruma gyakran tartalmaz ionizálható aminosav oldalláncokat, amelyek megfelelő ionizáltsági állapota szükséges az aktív centrum konformációjának fenntartásához, a szubsztrátok megkötéséhez vagy a reakció katalíziséhez. Másfelől egy vagy több szubsztrát tartalmazhat ionizálható csoportokat és a szubsztrát csak egyik vagy másik ionizáltsági alakja képes lehet az enzimhez kötődni vagy részt venni a katalízisben. A kritikus csoportok pK értékeit meg lehet határozni az enzimaktivitás pH-függésének vizsgálatával.

#### 4. Kinetikai paraméterek statisztikai eloszlásának értékelése

Kísérleteinkkel mi csak mintát veszünk a valódi világból. Egy enzim, amely a  $K_m$  és  $k_p$  ( $k_p=V_{max}/E_t$ ) valódi paraméterekkel jellemezhető,  $P$  termék keletkezéséhez vezet a kísérletben és mi ezt mérjük és számoljuk a reakció sebességet  $v$  különböző szubsztrát koncentrációk  $S$  mellett. E mért adatok alapján következtetni próbálunk a valódi paraméterekre a modell egyenlethez

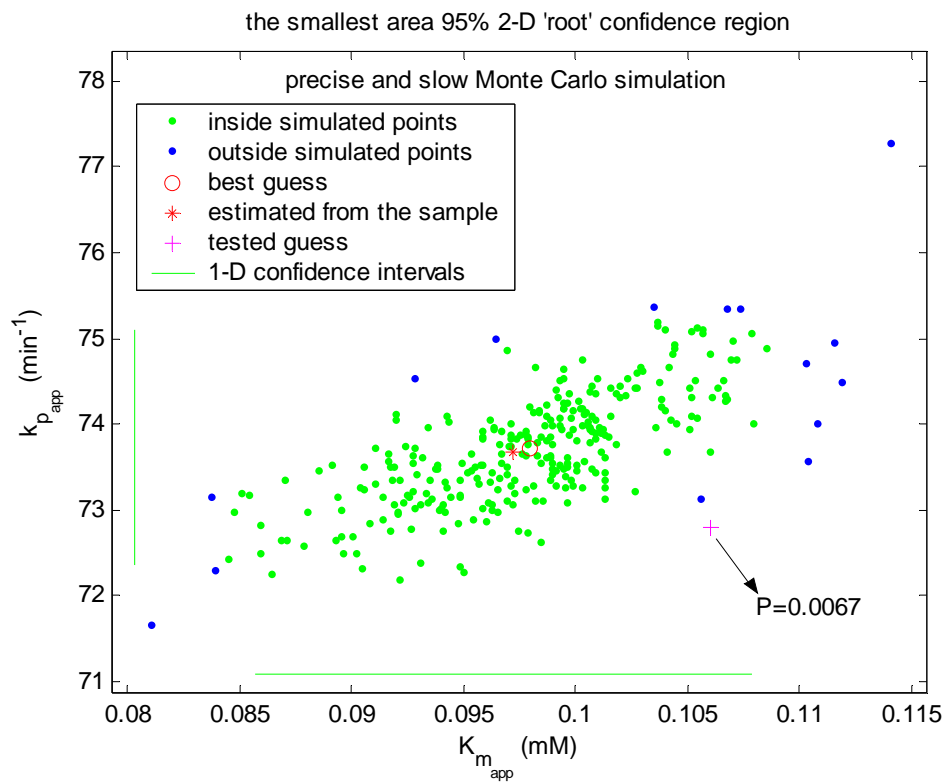
történi  $\left( v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \right)$  non-lineáris regresszióval (ennek lényege, hogy a

paraméterekhez különböző értékeket rendel hozzá a computer és ezekkel  $v$  reakciósebességet számol, a legjobban illesztett paraméter-kombináció az lesz, amellyel számolva a mért és számolt  $v$  között a legkisebb a különbség a legkisebb négyzet-eltérés módszere szerint). A biológiai variabilitás (pl. az enzimek szintézisének oxidációja vagy szennyezése) és a kísérleti hibák (pl. bemérési eltérések vagy a mérőműszer pontatlansága) miatt ezzel a módszerrel lehetetlen azonosítani a valódi paramétereket. Amit el tudunk érni, az a fenti regressziós eljárással nyert legjobb becslés (amit valós becslésnek nevezünk) és ennek statisztikai eloszlását (az az értéktartomány, amelyhez a valódi paraméter tartozik bizonyos valószínűséggel, biológiai rendszerekre általában a 95 %-os konfidencia intervallum használatos). Ligand kötődési és kinetikai problémáknál manapság a Monte Carlo szimuláció (különböző változataiban) az ajánlott eljárás a paraméter eloszlás értékeléséhez. Az alapötlet ennél az eljárásnál a következő: ha ismernénk azt a mechanizmust, amely révén a valódi paraméterek a kísérleti mintánkat eredményezik (és erre a kísérletben mért adatok eloszlásából lehet következtetni), akkor felépíthetünk parallel virtuális világképeket, ahol a valós becslés játssza a valódi paraméterek szerepét. A konkrét esetben minden használt szubsztrát koncentráció mellett rendelkezésünkre áll több (5 – 10) ismételt mérésből származó reakciósebesség-érték. Ezek alapján a számítógép meghatározza a mért sebesség eloszlását (normál eloszlást feltételezve, ami átlaggal és SD paraméterrel jellemezhető). A továbbiakban a számítógép véletlenszerűen a valódi kísérletnek megfelelő számú pontot húz ki ezekből a sebességeloszlásokból, ezeket tekinti mért eredménynek, átlagukkal végrehajtja a Michaelis-Menten egyenlet szerint a non-lineáris regressziót és meghatározza a kinetikai paramétereket. Ezt a virtuális kísérletet több százszor ismételve, a paraméterek nagyszámú szintetikus becsléséhez jutunk (ebben az esetben a computer végzi azt, amit a kutató is csinálna, ha a hozzá szükséges ideje és anyagi támogatása lenne: több százszor ismétli meg a kísérletet). A Monte Carlo módszer egyik változatánál (amelyet "bootstrap"-nek nevezünk) nem szükséges a mért adatok eloszlását ismerni (a computer úgy építi fel a szintetikus mintákat, hogy ismételten véletlenszerűen húz ki adatokat a mért mintahalmazból), de ehhez nagyobb számú mért mintára van szükség. A valódi



paraméterek és a valós becslés közti különbséget a valós becslés és a szintetikus becslések közti különbséggel lehet jellemezni. A valós becslés statisztikai eloszlását azok a határvonalok jellemzik, amelyeken belül a szintetikus paraméterek kívánt hányada (pl. 95 %) megtalálható (Ld. az alábbi ábra). A becsült paraméterek eloszlása felhasználható annak eldöntésére, hogy különböző kísérletekben nyert paraméterek azonosak-e vagy statisztikailag eltérnek egymástól. Az utóbbi kérdés eltérő valószínűségi szinteken válaszolható meg (biológiai rendszerekben általában 5 %-os szinten). Feladat: Hasonlítsa össze saját eredményét csoporttársaid eredményével!

Példa



## Alkalmazások

### 1. Egy metabolikus út fiziológiásan releváns szubsztrátjának meghatározása

Metabolikus utak vizsgálatánál gyakran felmerül a kérdés, hogy néhány lehetséges szubsztrát közül melyik a fiziológiásan releváns. Ilyen kérdés tisztázásához az alternatív szubsztrátokat használó enzim aktivitását először magas (telítő) szubsztrát koncentrációk mellett mérik (meghatározzák a  $V_{max}$  értékét). Például az agyban a hexokináz mind a glukózt, mind a fruktózt foszforilálhatja és így felmerül a kérdés, hogy mindkét szubsztrát fiziológiásan fontos-e. Az agyszövetből nyert hexokináz *in vitro* meghatározott  $V_{max}$  értékei a következők:

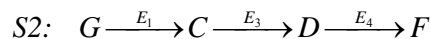
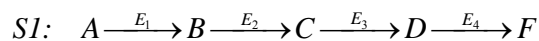
Szubsztrát	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )
glukóz	17
fruktóz	25

*In vivo* azonban a szubsztrát koncentrációja sokkal alacsonyabb lehet mint az a koncentráció, amely mellett a maximális aktivitást mérték. A glukóz és fruktóz esetében az agyszövetben mért intracelluláris koncentrációk  $10\ \mu\text{M}$ , illetve  $1\ \mu\text{M}$ . A  $K_m$  értékek ismerete kritikus a feltett kérdés megválaszolásához:

Szubsztrát	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
glukóz	10
fruktóz	1000

Melyik szubsztrátot részesíti előnyben az agy?

Most tekintsük át a következő metabolikus utakat, amelyek a computer szimulációnál rendelkezésre álló reakciókból állnak:



Felhasználva saját kísérleti adatait és az  $A$ , ill.  $G$  szubsztrátok intracelluláris koncentrációira megadott értékeket döntsék el, hogy melyik úton keletkezik  $F$  *in vivo*.

## 2. Egy metabolikus út sebesség-meghatározó lépésének azonosítása

A  $K_m$ ,  $V_{max}$  és az *in vivo* szubsztrátkoncentráció ismeretében azonosítani lehet egy metabolikus út sebesség-meghatározó lépését, amely döntő jelentőséggel bír a folyamat fiziológias szabályozásában és farmakológiai beavatkozások megtervezésében.

A metabolikus útban szereplő enzimek maximális aktivitásának összehasonlításával el lehet dönteni egy reakció egyensúlyi vagy nem-egyensúlyi jellegét. A sorban megelőző vagy követő reakcióhoz képest magas  $V_{max}$  egyensúlyi reakcióra utal ( $\Delta G \approx 0$ ), míg alacsony  $V_{max}$  nem-egyensúlyira ( $\Delta G \ll 0$ ).

Diskusszióra javasolt kérdés: Hogyan lehet értelmezni a fenti állítást a biokémiai reakciók szabadenergia változásának fényében

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \ln \frac{[product]}{[substrate]}, \quad \text{ahol } \Delta G^{0'} \text{ a standard}$$

szabadenergia változása pH=7.0-nél? Használja fel a metabolikus utak termodinamikájáról szóló ismereteit!

A reakció nem-egyensúlyi jellege szükséges, de nem elégséges feltétele a sebesség-meghatározó szerepnek. Ha a szubsztrát-koncentráció lényegesen alacsonyabb az enzim  $K_m$  értékénél, a szubsztrát-koncentráció ingadozása a katalitikus aktivitás arányos változásához vezet és így a metabolikus útban az anyagáramlás a rendelkezésre álló szubsztráttól és nem az enzimtől függ. Ezzel szemben a  $K_m$ -hez képest magas *in vivo* szubsztrát-koncentráció jelentős változása kis hatást gyakorolna a katalitikus aktivitásra. Így megállapítható, hogy nagy valószínűséggel az a nem-egyensúlyi reakció lesz sebesség-meghatározó, amely *in vivo* telítve van szubsztráttal. E kritériumot felhasználva azonosítsa az *SI* metabolikus út sebesség-meghatározó lépését különböző fiziológias körülmények között! Pl. nyugalomban a vázizom intracelluláris pH értéke 7,2, míg intenzív munka során akár 6,3-ra is csökkenhet. Ugyanaz lesz-e a metabolikus szabályozás a két állapotban? Változik-e a metabolikus kontroll lázas állapotban?

## Tesztkérdések

Az alábbi kérdésekkel ellenőrizheti, hogy elméleti felkészültsége elegendő-e a sikeres kísérletezéshez. A helyes válaszok adják meg a jelszót a gyakorlat további fázisához.

1. Mely állítások igazak a Michaelis-Menten egyenletre  $\left( v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \right)$ , amelyet

széles körben alkalmazunk az enzimek jellemzésére?

- A. Az egyenletet korlátozás nélkül lehet alkalmazni minden enzim katalizálta reakcióra.
- B. A  $v$  olyan kísérleti körülmények között mérhető, amikor  $S$  csökkenése elhanyagolható a kezdeti szubsztrát koncentrációhoz képest (pl.  $\Delta S < 0.1 \cdot S_0$ ).
- C. A  $v$  olyan kísérleti körülmények között mérhető, amikor elég sok termék keletkezik vagyis  $S$  csökkenése lényeges a kezdeti szubsztrát koncentrációhoz képest (pl.  $\Delta S > 0.1 \cdot S_0$ ).
- D. Az egyenlet csak egyensúlyi rendszerre érvényes.
- E. Az egyenlet csak "steady-state" rendszerre érvényes.

2. Mely állítások igazak egy metabolikus út sebesség-meghatározó lépésére?

- A. *In vivo* a metabolikus út összes többi reakciója általában nagyobb sebességgel zajlik, mert a sebesség-meghatározó lépés  $V_{\max}$  értéke a legalacsonyabb.
- B. E reakció standard szabadenergia változása nagy pozitív érték.
- C. E reakció *in vivo* szabadenergia változása nagy pozitív érték.
- D. E reakció standard szabadenergia változása nagy negatív érték.
- E. E reakció *in vivo* szabadenergia változása nagy negatív érték.

3. Mely állítások igazak az enzimaktivitást befolyásoló tényezőkre?

- A. A pH a szubsztrátok és az enzim szerkezetében szereplő aminosav-oldalláncok protonáltsági állapotán keresztül befolyásolja a reakció sebességét.
- B. A pH nem befolyásolja olyan enzim-katalizálta reakciók sebességét, amelyekben a szubsztrátok nem tartalmaznak ionizálható funkciócsoportokat, mert ilyen esetekben az enzim-szubsztrát kölcsönhatás független a molekulák elektromos töltésétől.

- C. Egy enzimaktivitás-mérés során a hozzáadott aktív enzim mennyiségét állandónak kell tekinteni a vizsgálat időtartamára függetlenül a pH és hőmérséklet esetleges nagyfokú változásaitól.
- D. A hőmérséklet emelkedése növeli az enzim katalizálta reakciók sebességét a gyakoribb hatásos kollíziók miatt, de egy bizonyos kritikus értéken túl csökkenéshez vezet az enzim harmadlagos szerkezetének összeomlása miatt (denaturáció).
- E. A D. pontban leírt összefüggés kísérleti vizsgálata során meghatározott optimális hőmérséklet az adott enzim fizikai jellemzője és független a kísérleti körülményektől.