

ENZIMKINETIKAI PARAMÉTEREK KÍSÉRLETI MEGHATÁROZÁSA

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| A szimulált kísérletek javasolt menete..... | 3 |
| A computer szimulációval vizsgált elméleti és gyakorlati kérdések..... | 5 |
| 1. A reakciósebesség időfüggése..... | 5 |
| 2. A hőmérséklet hatásai | 7 |
| 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..... | 12 |
| Tesztkérdések | 13 |

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), választását egyeztesse csoporttársaival, mert csak csapatmunkával lehet adatokat nyerni a virtuális metabolikus út összes lépéséről (ha valamelyik enzimről nem lesz adat, nem lehet megoldani a kitűzött feladatokat)
 - b) vizsgálja meg a reakciósebesség pH- és hőmérséklet függését (jegyezze fel az értéktartományokat, ahol mérhető eredményeket kap). Ez a vizsgálat csak tájékoztató jellegű (ellenőrizzük, hogy a később pH 7,2 és 37 °C mellett végzett mérések hogyan viszonyulnak az enzim működés optimális körülményeihez), ill. bemutatja az „optimális hőmérséklet” változó jellegét, így erre ne szánjon több mint 15 percet.
 - 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 szubsztrát-koncentráció 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. A kiválasztott tartomány magában foglaljon K_m alatti és telítő szubsztrát-koncentrációkat is.
 - e) felhasználva a virtuális lehetőséget, hogy nyomon követhetjük az enzimszubsztrát komplex időbeli alakulását, ellenőrizze a steady-state feltétel érvényességét (különösen a legalacsonyabb szubsztrát-koncentrációnál)
2. Miután beállította a kísérleti körülményeket a Michaelis-Menten modellnek megfelelően, azonosítsa a kinetikai paramétereket (hogy egyben a 2. alkalmazás is elő legyen készítve, a meghatározást pH 7.2 -nél és 37 °C-on végezze el). A kísérleti hiba megbízható értékeléséhez legalább 5 ismétléssel dolgozzon (túl nagyszámú ismétlés viszont elfogadhatatlanul hosszú kísérlethez vezet). A Lineweaver-Burk-féle ábrázolás hasznos ellenőrző pont. Ha kettős reciprok-ábrázolásban (lineáris modell szerint) határozzuk meg a kinetikai paramétereket, azok csak tökéletes modell-megfelelés és hibamentes mérés esetén érvényesek. Mind a modelltől való eltérés, mind a kísérleti hiba torzítja a számolt paramétereket reciprok adat-transzformációnál, így a menüpont 3. ábrájánál nagy eltérés jelentkezik a két egyenes között. Ilyen esetben érdemes átnézni a kísérlet körülményeit, beazonosítani a hibaforrást és megismételni a kísérletet (a leggyakoribb hibák a nem-megfelelő szubsztrát-koncentráció tartomány és a steady-state feltétel nem-teljesülése).

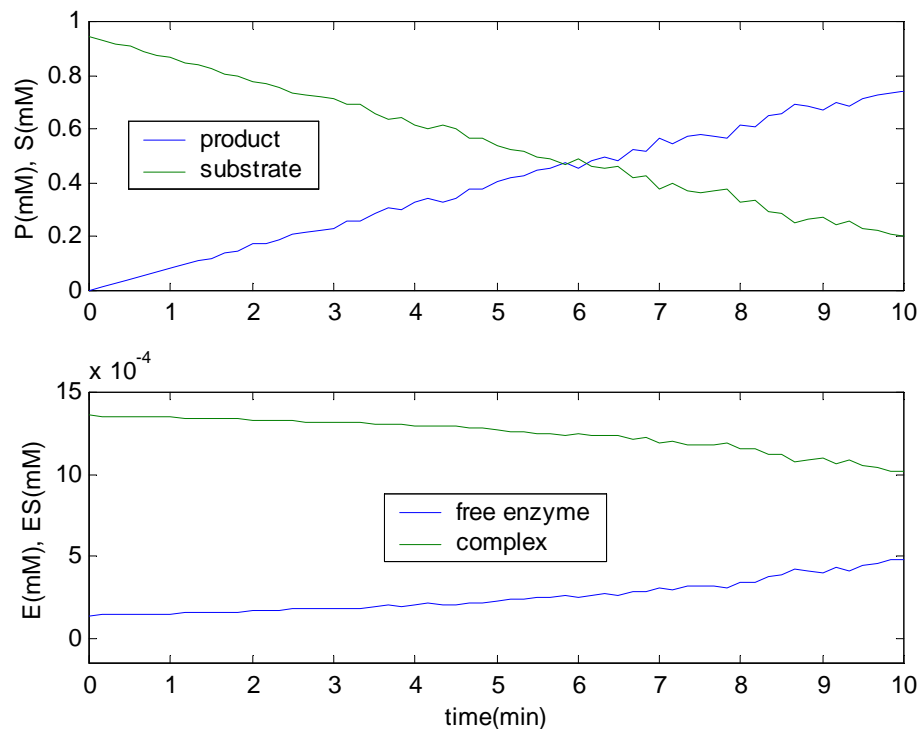
3. Határozza meg az azonosított kinetikai paraméterek statisztikai eloszlását (konfidencia tartományait). E lépést megelőzően a Computer szimuláció menüpont segítségével elő kell állítani nagyszámú (300 az ajánlott) kinetikai paraméter-kombinációt szimulált kísérleti pontok alapján (ez a lépés kb. 10 percet vesz igénybe a rendelkezésre álló számítógépeken, a művelet végét a szimuláció menüképernyő visszatérése jelzi). Ha kísérleti pontonként kevesebb mint 10 ismétlést használ, a Monte Carlo szimulációs módszer ajánlott lassú és pontos változatában. A már generált Monte Carlo adatok ábrázolása a főmenüből nyíló „Kinetikai paraméterek statisztikai eloszlása” menüpontnál lehetséges. Ott összehasonlíthatja csoporttársai által meghatározott értékeket saját eredményeivel (helyes meghatározás esetén a független kísérletek eredményei a 95 %-os valószínűségi tartományon belül lesznek).
4. Ismétlje meg a 2. - 3. lépéseket pH 6,3 mellett a 2. alkalmazásnál feltett kérdés megválaszolásához (minden körülmények között ugyanaz-e a sebesség-meghatározó lépés?). Ha ideje engedi, végezze a meghatározást 40 °C-on is (lázás állapot hatása a metabolizmusra?).
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:



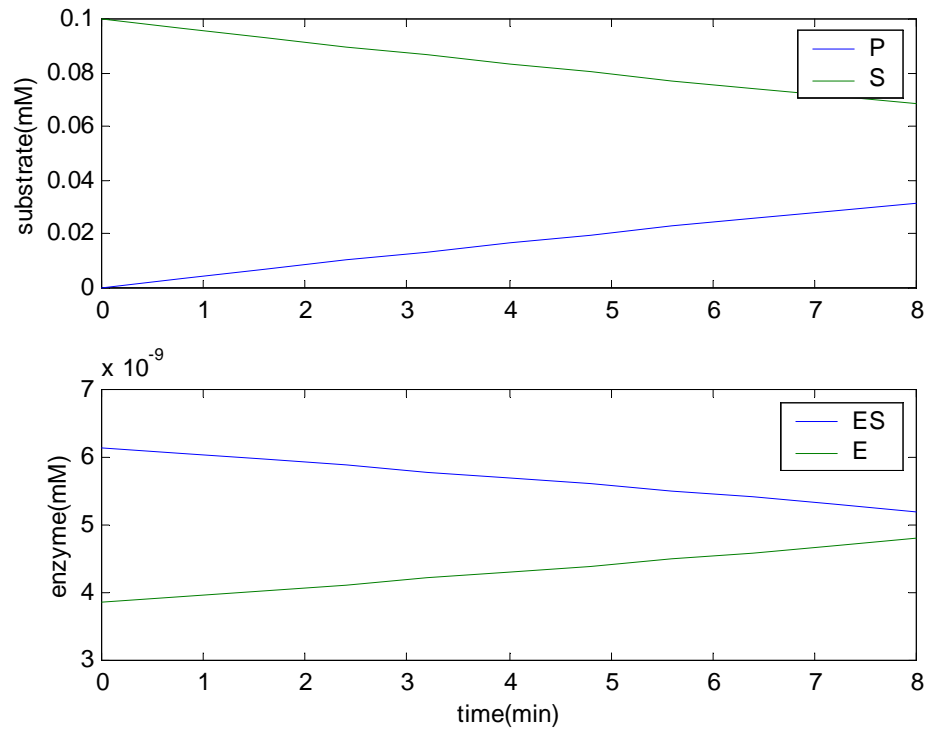
A folyamatos enzimaktivitás méréseknél egy minta elfoglalja a mérőműszert a reakció egész időtartamára, amely korlátozza az elvégezhető mérések számát. Ez a probléma nem áll fenn a végpontos enzimaktivitás-méréseknél, amikor a keletkezett terméket P csak egyszer kell megmérni a végidőpontban t_{max}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

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

$\left(v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \right)$ érvényességéhez, ahol v "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 csúcserőket 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

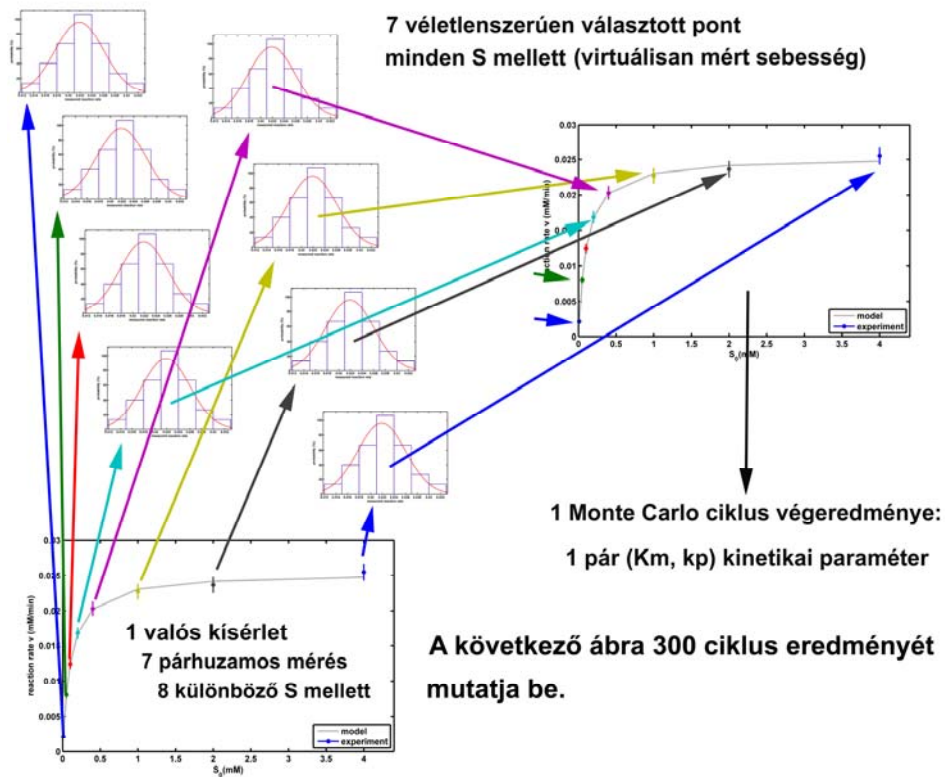
Az enzimek aktív centruma gyakran tartalmaz ionizálható aminosav oldalláncokat, amelyek megfelelő ionizáltsági állapota szükséges az aktív centrum konformációjának fenntartásához, a szubsztrátok megkötéséhez vagy a reakció katalíziséhez. Másfelől egy vagy több szubsztrát tartalmazhat ionizálható csoportokat 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 (ez nem képezi jelen gyakorlatunk tárgyát).

4. Kinetikai paraméterek statisztikai eloszlásának értékelése

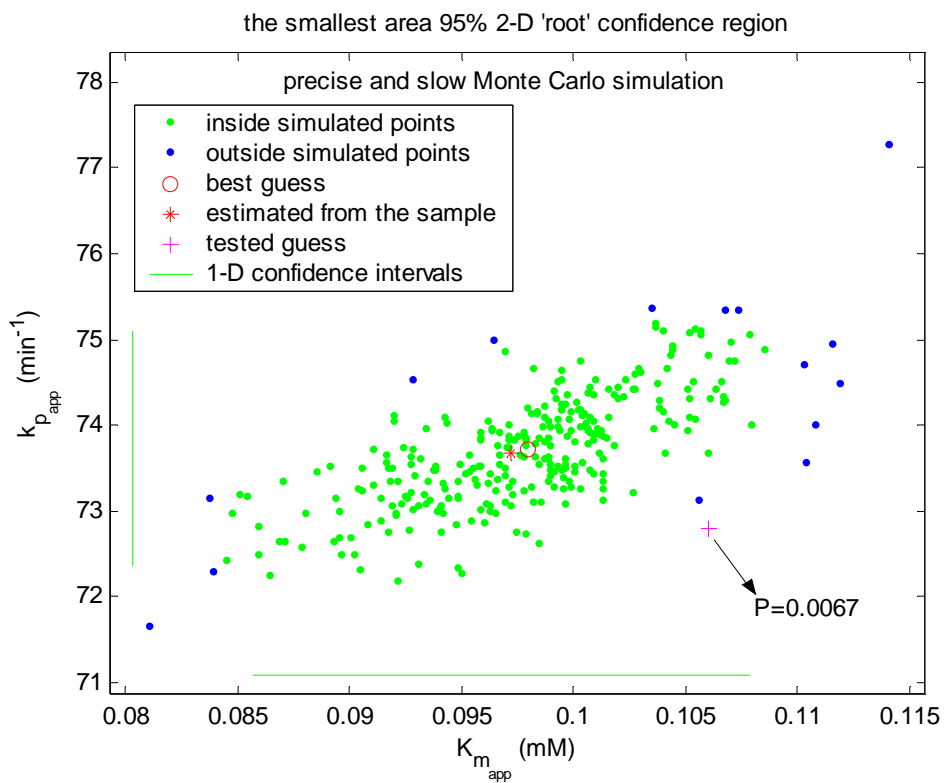
Kísérleteinkkel mi csak mintát veszünk a valódi világból. Egy enzim, amely a K_m és k_p ($k_p=V_{max}/E_t$) valódi paraméterekkel jellemezhető, P termék keletkezéséhez vezet a kísérletben és mi ezt mérjük és számoljuk a reakció sebességet v különböző szubsztrát koncentrációk S mellett. E mért adatok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

történő $\left(v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \right)$ 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. Egy Monte Carlo ciklus folyamatát az alábbi ábra szemlélteti.



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 határvonalak jellemzik, amelyeken belül a szintetikus paraméterek kívánt hányada (pl. 95 %) megtalálható (Ld. a fenti ábrát). A becslt 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 csoporttársai eredményével!

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:

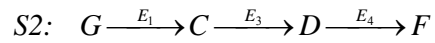
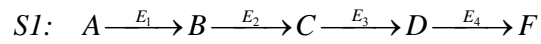
| Szubsztrát | V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|------------|---|
| glukóz | 17 |
| fruktóz | 25 |

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 (μM) |
|------------|-------------------------|
| 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 fiziológiás 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

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

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 fiziológiás 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 funkciós csoportokat, 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.