



Sejtszintű szabályozás labor

Enzimkinetika gyakorlat

Összeállította:

Scholz Éva – Salgó András – Ercsey Klára – Szántó Réka

korábbi Biokémia labor-Enzimek jegyzetéből kiindulva

Szabó Judit Eszter, Nagy Gergely Nándor, Surányi Éva Viola

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék**

2018/19 őszi félév

Tartalom

Bevezetés, a gyakorlat célja	3
Elméleti háttér.....	3
Enzimek.....	3
A katalízis molekuláris mechanizmusa	4
Modellek a katalízis molekuláris mechanizmusára.....	4
Az aktív centrum tulajdonságai	4
Az enzim működésébefolyásoló tényezők.....	5
pH.....	5
Hőmérséklet.....	5
Fémionok.....	5
Az enzim aktivitás jellemzése: enzimkinetika	5
Enzim aktivitás mérési módszerek	6
Michaelis-Menten és Briggs -Haldane enzimkinetika.....	7
Az enzimgátlás típusai.....	10
Kooperatív enzimek.....	11
Enzimek csoportosítása a katalizált reakciók típusa szerint (Enzyme Commission, E.C.).....	11
Nukleotid hidroláz enzimek	11
A gyakorlat leírása.....	14
A mérés célja.....	14
A gyakorlat során felhasznált anyagok, vegyszerek, eszközök.....	14
Anyagok, vegyszerek.....	14
Eszközök	14
A mérés menete	14
Jegyzőkönyv követelmények	16
Az értékelés szempontjai	18
A felkészülést segítő kérdések	19
Gondolkodtató kérdések a gyakorlat számolási feladataihoz.....	19

BEVEZETÉS, A GYAKORLAT CÉLJA

A gyakorlat célja, hogy megismerkedjünk, azzal, hogy az enzimek katalitikus aktivitását és a működésüket befolyásoló tényezőket hogyan vizsgálhatjuk. A mérési módszer folyamatát áttekintjük a kísérlet tervezéstől egészen az eredmények kiértékeléséig. A gyakorlat során egy nukleotid hidroláz enzim, a dUTPáz enzim működését vizsgáljuk fotometriás pH-változás mérésén alapuló enzimaktivitás módszer alkalmazásával.

ELMÉLETI HÁTTÉR

Az előadás anyaga, korábbi biokémiai és enzim kinetikai alapismeretek.

ENZIMEK

Az élőlényekben szüntelenül kémiai folyamatok játszódnak le. Ezen folyamatok összessége a sejtben az anyagcsere (metabolizmus). Mivel ezek a folyamatok közül számos spontán módon nem, vagy csak végtelenül lassan játszódna le vizes oldatban az élőlények (test)hőmérsékletén, szükség van biokatalizátorokra, melyek maguk az enzimek. **Az enzimek csökkentik a reakció aktiválási energiáját egy kisebb energiájú reakcióút megnyitása révén.** Az aktiválási energia csökkenésének mértéke néhány reakció esetében az alábbi táblázatban látható. Az enzimkatalizálta reakció sebességi állandója nő, a felezési idő pedig csökken, a reakció sebessége akár a 10^6 -szorosára is felgyorsulhat, de lényeges, hogy **a reakció kémiai egyensúlyát az enzim jelenléte nem befolyásolja**, csak az elérését gyorsítja meg.

	Aktiválási Energia (kJ/mol)	
	Enzim nélkül	Enzim jelenlétében
$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	75,6	8,4
$\text{Urea} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	103,3	52,1
$\text{Szaharóz} \rightarrow \text{Glu} + \text{Fru}$	109,2	48,3
$\text{Kazein} \rightarrow \text{peptidek}$	86,5	50,4

Az enzimek meghatározó többsége fehérje, emellett léteznek katalitikus aktivitású RNS molekulák is (ribozimek). Sok enzimnek a makromolekuláris (fehérje) részen (apoenzim) kívül valamilyen kofaktorra is szüksége van a működéséhez. Az enzimhez kötődő, szerves kofaktorokat koenzimeknek is nevezik. A koenzimet és az apo enzimet együttesen holoenzimnek nevezzük. A szervetlen kofaktorokat, például fémionokat általában inkább csak egyszerűen kofaktornak hívjuk.

A katalízis molekuláris mechanizmusa

Az enzimek reverzibilis módon az **aktív centrumukban megkötik a szubsztrátjukat, majd a rájuk jellemző módon átalakítják**. Az aktív centrum szubsztrátkötő helyből és katalitikus helyből áll. A szubsztrátkötő helyhez kapcsolódik be az átalakítandó molekula, a katalitikus helyhez pedig a koenzim, ami lehetővé teszi a szubsztrát-átalakulás lejátszódását. A szubsztrát kötő zseb és a katalitikus hely általában átfednek. Az enzimek működése igen specifikus. Beszélhetünk külön szubsztrát-, reakció-, regio-, és sztereospecifitásról.

Modellek a katalízis molekuláris mechanizmusára.

- Emil Fischer kulcs-zár elmélete (1890): a szubsztrát úgy illeszkedik az enzimbe, mint kulcs a zárba. (Nem foglalkozik az enzimek állandóan változó konformációjával.)
- Fluktuációs elmélet (1900-as évek): Az enzim konformációja állandóan változik, a megfelelő konformációjú enzim fog reakcióba lépni a szubsztráttal.
- Indukációs illeszkedés elmélete (induced fit, D.E. Koshland, Jr. (1958)): A szubsztrátmolekula részleges kötődése indukálja az enzim-molekula konformációjának olyan irányú megváltozását, hogy az enzim- szubsztrát komplex kialakulhasson.

A katalízis molekuláris mechanizmusa pontmutációval is vizsgálható. Adott aminosavat megváltoztatva, az enzimaktivitás változásából következtethetünk az adott aminosav katalízisben betöltött szerepére.

Az aktív centrum tulajdonságai

- Maga az aktív centrum az egész enzimnek általában viszonylag kis része csak.
- Az aktív centrum 3 dimenziós szerkezetét a fehérjeláncban egymástól távol lévő aminosavak is kialakíthatják.
- Az enzim-szubsztrát kötődésben kovalens kölcsönhatás vagy gyenge másodlagos kötőerők: ionos, hidrogénhid, dipólus, van der Waals, vagy hidrofób kölcsönhatás egyaránt részt vehetnek.
- A szubsztrát kötés specifikusát az aktív centrum atomjainak meghatározott elrendeződése biztosítja.

Az enzim működésébefolyásoló tényezők

Az enzimaktivitást igen sok tényező befolyásolja. Néhány fontosabb paraméter hatása a következő.

pH

A pH befolyásolhatja a molekulák konformációját és a konformáció stabilitását, hatással lehet a szubsztrát kötődésére és befolyásolhatja a katalitikus csoportok működését. A reakciósebesség pH-függése maximumos görbével írható le. Kedvező esetben a maximum-görbe felmenő- és lemenő ága szabályos szigmoid görbe. Lényeges, hogy az enzim aktivitásának pH-optimuma nagyon gyakran nem egyezik meg stabilitásának pH-optimumával.

Hőmérséklet

A reakciósebesség hőmérsékletfüggése szintén maximumos görbével írható le. Ez két hatás eredőjeként jelentkezik. Egyrészt a hőmérséklet emelésével nő a reakciósebesség (ld. Arrhenius egyenlet), másrészt magasabb hőmérsékleten a fehérjék hődenaturációja egyre inkább jelentőssé válik.

Fémionok

A fémionok szerepe azért jelentős, mert már igen kis koncentrációban jelentős reakciósebesség csökkenést vagy növekedést eredményezhetnek. A hatás fémion- és enzimfüggő. Az adott fémion a reakció lejátszódásához nélkülözhetetlen lehet, a reakciósebességet növelheti, csökkentheti, de akár inaktíválhatja is az enzimet, ha irreverzibilisen kötődik hozzá. A fémionok befolyásolhatják a szubsztrát kötődését is. Pl. a nukleotidok sok esetben nukleotid-fémion komplexként kötődnek az enzimekhez.

A fentiekén kívül az enzimek működését befolyásolhatja még az oldat ionösszetétele is. Például a nukleotidok és a DNS kötését erősen befolyásolhatja az ionerő, és így a sókoncentráció is. Emellett természetesen az enzimek működését befolyásolja az is, hogy jelen van-e a megfelelő kofaktoruk vagy koenzimük, illetve, hogy jelen vannak-e különböző aktivátorok vagy inhibitorok (pl. allosztérikus aktivátorok és inhibitorok).

Az enzim aktivitás jellemzése: enzimkinetika

Egy enzim aktivitása legjobban az időegység alatt átalakított szubsztrát (vagy keletkezett termék) mennyiségével jellemezhető. **Az enzim reakciók időbeli lefolyásával az enzimkinetika foglalkozik.** Ahhoz, hogy a reakció kinetikai jellemzőit meghatározzuk, követnünk kell az átalakított szubsztrát vagy a keletkező termék(ek) mennyiségének változását az időben.

Enzim aktivitás mérési módszerek

Az enzim aktivitás mérési módszerek ("aktivitás assay") lényege az **enzim-katalizált reakció során történő változások érzékeny és megbízható időbeni követése, egy adott enzim azonosítása vagy jellemzése céljából.**

Az assay során a reakció követésére alkalmas lehet egy jel, amennyiben az a szubsztrát(ok) fogyáshoz, vagy a termék(ek) keletkezése során változást mutat és a jelváltozás a zajnak legalább kétszerese. A reakció követésére szolgáló jel előállítható a vizsgált enzim reakciótermékének továbbreagáltatásából, ekkor **csatolt enzimreakcióról** beszélünk.

A reakció követésének talán a legkönnyebb módja egy **színes vegyület megjelenésének vagy eltűnésének megfigyelése. Spektrofotométer** alkalmazásával a fényelnyelésen (abszorpción) alapuló módszerek kiterjeszhetők a közeli UV tartományban elnyelő molekulák fotometriás követésére. A pH változás közvetett követésére is alkalmas lehet ez a módszer gyengén pufferált oldatban, **sav-bázis indikátor** abszorbanciájának követésével.

Az optikai módszerek közé tartozik a **fluoreszcens jel** követése is. Ez a módszer egyfelől a fényelnyelésnél számottevően nagyobb érzékenységgel bír, másfelől csak néhány szubsztrát vagy termék rendelkezik jól követhető fluoreszcens jellel, mint például a NADH.

A pH változással járó enzimatis reakciók (pl. lipázok aktivitása) esetén a **pH változás elektrokémiai jele** is követhető, itt azonban figyelembe kell venni, hogy a pH változás befolyásolhatja az enzim működését. Ennek kiküszöbölésére lehet olyan gyengén pufferolt oldatban végezni az enzim aktivitás mérést, ami még lehetővé teszi a változás detektálást, de megakadályozza, hogy a pH szélsőségesen, az enzim aktivitását befolyásolva változzon. Alternatívaként lehet folyamatosan semlegesítő oldatot adagolni a mérés során.

A reakció során termelődő hő is alkalmas lehet a követésre **izotermális titrációs kalorimetria** révén, ehhez döntő fontosságú, hogy a mérés során a hőváltozás döntő része a vizsgált reakcióból eredjen.

A fenti módszerek a reakció lefutásának, a termékkeletkezés időbeli változásának **folytonos időbeli követését teszik lehetővé.** Ezzel egyrészt kiszűrhetőek a mérést zavaró hirtelen változások, másrészt azonosítani lehet a reakciónak azt a szakaszát, amikor az átalakulás az időben lineáris. A lineáris tartomány vizsgálata gyakorlati okokból fontos: ha ezt a tartományt vizsgáljuk, könnyebb az enzim működésére vonatkozó következtetéseket levonni.

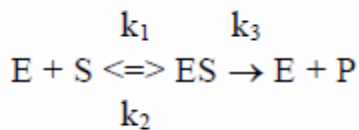
A folytonos módszerekkel szemben a **végpont-mérési eljárások a reakció leállítás utáni termék keletkezés vagy szubsztrát fogyás azonosításán alapulnak** - erre példa a HPLC-elválasztáson, illetve

radioaktív meghatározáson alapuló módszer. Ezek alkalmazásánál fontos meggyőződni arról, hogy lehetőség szerint a reakció **előrehaladásának lineáris tartományában dolgozzunk.**

Michaelis-Menten és Briggs -Haldane enzimkinetika

A legegyszerűbb enzimreakció kinetikáját Michaelis és Menten írta le 1913-ban. A gyakorlatban manapság a Michaelis-Menten kinetikai modell G.E. Briggs és James B.S. Haldane által kiegészített változatát használjuk az enzimaktivitás jellemzésére. E szerint az enzim (E) és a szubsztrát (S) egy ún. enzim-szubsztrát (ES) komplexet képez, majd ez bomlik tovább a termékre és az enzimre.

A Michaelis – Menten enzimkinetika alapegyenlete tehát:



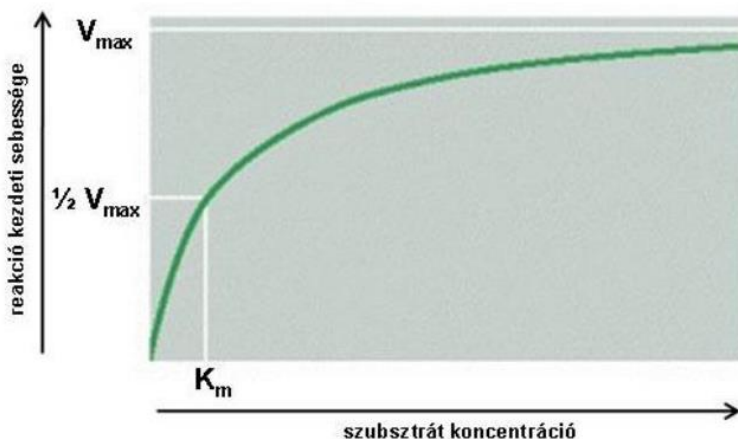
Az ES komplex képződésére a k_1 (a szubsztrát asszociációs sebességi állandója), visszaalakulására a k_2 (a szubsztrát disszociációs sebességi állandója), a termék képződésére pedig a k_3 sebességi állandó jellemző. A k_3 sebességi állandó az ún. **átviteli szám (turnover number), ami azt fejezi ki, hogy egy enzim molekula egy másodperc alatt hány db szubsztrátot alakít át.** Mértékegysége tehát 1/s. Értéke igen tág határok között változhat.

Átviteli szám

Szénsavanhidráz	600000 1/s
Acetilkolinészteráz	25000 1/s
Kimotripszin	100 1/s
DNS-polimeráz	15 1/s

A Michaelis-Menten kinetikai modellben a termék képződésének sebességét a szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázolva, egy telítési görbét kapunk (l. alábbi ábra), amit az alábbi, **Michaelis-Menten egyenlet** ír le:

$$V_0 = V_{\max} [S] / ([S] + K_M)$$



(Az ábra a Biokémia alapjai jegyzetből származik. Eredeti forrása: *Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell, 4th edition* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/figure/A469/?report=objectonly>)

A reakció lineáris, kezdeti szakaszában mért reakciósebesség állandó enzimkoncentráció és végtelen nagy szubsztrát koncentráció esetén egy maximális érték felé tart (v_{max}), amit akkor ér el, ha minden enzim molekula szubsztráttal telített ($[ET]=[ES]$). A K_M (Michaelis-Menten állandó) az ES komplex stabilitására jellemző érték, amely annál kisebb, minél stabilabb a komplex.

$$K_M = (k_2 + k_3)/k_1$$

$$K_M = [S]_{v_{max}/2}$$

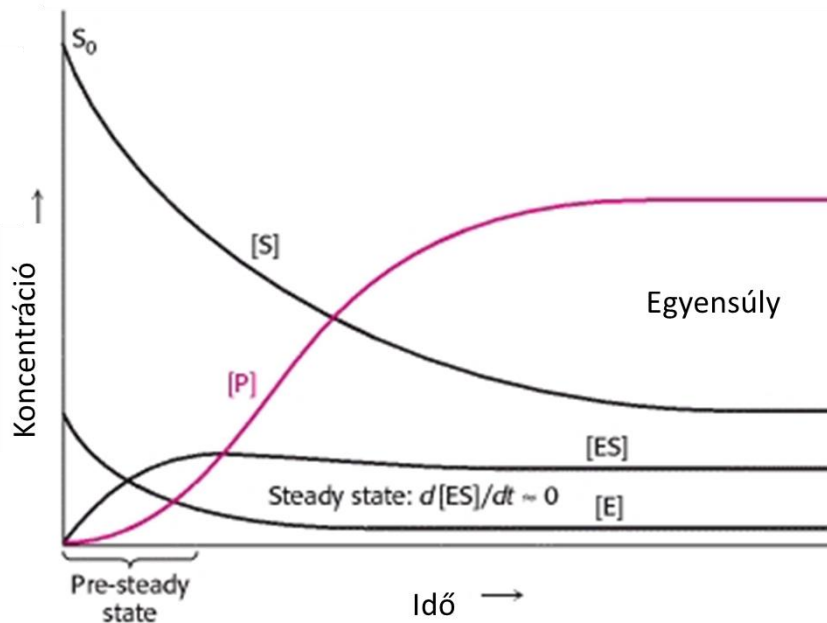
Ahogy a fenti ábrából és az egyenletekből is látható, a K_M megegyezik azzal a szubsztrát koncentrációval, amelyen a kezdeti sebesség a v_{max} felével egyenlő.

Az enzim reakció jellemzésére a leggyakrabban a Michaelis konstans és a k_3 átviteli számot használjuk. Az átviteli szám a $v_{max} = k_3[E]$ egyenlet alapján, az enzim koncentráció ismeretében kiszámolható. Egyszerű esetben az átviteli szám megegyezik a k_{cat} katalitikus sebességi állandóval.

Az enzim reakció jellemzésére használt további fontos paraméter a katalitikus hatékonyság is (k_{cat}/K_M), ami a katalitikus sebességi állandó (k_{cat}) és a Michaelis konstans hányadosa. A katalitikus hatékonyság dimenziója $\text{ idő}^{-1} \cdot \text{koncentráció}^{-1}$ (pl. $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) egy-szubsztrátos reakció esetén.

Michaelis-Menten Enzimkinetika modell feltételezései- gyakorlati megfontolások

A Michaelis-Menten kinetikai modell Briggs és Haldane által kiegészített változata azt feltételezi, hogy egy gyors kezdeti szakasz után (pre-steady-state) az ES komplex koncentrációja állandó marad (steady-state vagy stacionárius szakasz).



Az ábra a Stryer: Biochemistry c, könyv ábrájának módosításával készült. Az eredeti ábra forrása: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 8.4, The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22430/>

Ahhoz, hogy a steady-state megközlítés igaz legyen, arra van szükség, hogy 1, kezdeti sebességet mérjünk; 2, a szubsztrát nagy feleslegben legyen az enzimhez képest (a gyakorlatban ez általában 10X-es felesleget jelent).

A fentiekre azért van szükség, hogy:

- A termék átalakulása lineáris legyen az időben.
- Az enzim számára elérhető szubsztrát koncentrációt egyenlőnek tekinthessük a teljes (hozzáadott) szubsztrát koncentrációjával. Ez azért fontos, mert a mérés során nem tudjuk pontosan meghatározni, hogy a szubsztrát pontosan hányad része van komplexben az enzimmel. Ezen egyszerűsítés alkalmazásához mind a nagy szubsztrát felesleg, mind pedig a kezdeti reakciósebesség mérése hozzájárul a következő módon:
 - A szubsztrát nagy feleslege biztosítja, hogy az **enzim koncentráció elhanyagolható legyen a szubsztrát koncentrációhoz képest**. Így adott időpillanatban a szubsztrátnak csak elhanyagolható része lehet komplexben az enzimmel.
 - A kezdeti sebesség mérése biztosítja, hogy a reakciósebesség meghatározásának pillanatában, a reakció kezdetén, nagy feleslegben hozzáadott **szubsztrát mennyisége még ne csökkenjen jelentősen (< 10%)**.

- A kezdeti sebesség mérésével biztosíthatjuk, azt is, **hogy a reakció elegendően ne legyen jelen termék.** Így a termék hatásával nem kell foglalkoznunk.

Michaelis-Menten modell illesztése a mérési adatokra

A számítógépek elterjedése előtt a v_{max} és K_M értékeket jellemzően a Michaelis-Menten egyenlet linearizálásának segítségével számolták ki. Az ún. Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolás esetén a reakciósebesség reciprokát ábrázoljuk a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében. Ekkor egy egyenest, amelynek tengelymetszeteiből ($1/v_{max}$ ill. $-1/K_M$) leolvasható v_{max} és K_M értéke (részletesebben lásd Biokémia előadás jegyzet). Az egyenlet linearizálásával azonban a mesterségesen növelhetjük a mérési adatok hibáját, a tengely metszetek meghatározásának viszonylag nagy a bizonytalansága. Emiatt manapság, már **ajánlatosabb a mérési adatokra nem lineáris regresszió segítségével közvetlenül a Michaelis-Menten egyenletet illeszteni.**

További, az enzim aktivitást jellemző paraméterek

Specifikus aktivitás

Mivel nem mindegy, hogy adott aktivitást milyen mennyiségű minta képvisel, ezért hasznos a specifikus aktivitás fogalma, ami az egységnyi tömegű fehérjére (nem az adott enzimre, hanem a mintában levő össz-fehérjére) vonatkoztatott aktivitás. (Mértékegysége pl $\mu\text{mol termék/perc/mg}$ minta). A specifikus aktivitás az enzimtisztaság mértékéül szolgálhat. Tisztítás során nő a specifikus aktivitás, hiszen nő az adott enzim mennyiségének aránya a többi fehérjéhez képest. Ha tisztítás során a specifikus aktivitás tovább nem növelhető, az enzim tisztának mondható. Ezt a paramétert tehát az enzim preparátum és nem az enzim jellemzésére használjuk, sok esetben viszont sajnos csak ez található meg a publikációkban/adatbázisokban.

Az enzimgátlás típusai

Az enzimgátlás lehetnek irreverzibilis vagy reverzibilis. Ez utóbbi típus további csoportokra oszthatók:

Kompetitív (versengő)

Az inhibitor és a szubsztrát molekula verseng az enzim aktívhelyért. Példa erre, amikor az inhibitor molekula a szubsztrátnak valamilyen szerkezeti analógja. Ebben az esetben elérhető a maximális sebesség, de csak nagyobb szubsztrát koncentrációnál. Az inhibitor jelenléte a versengés révén tehát látszólag növeli a szubsztrát K_M értékét.

Nem kompetitív

Az inhibitor máshol kötődik, mint a szubsztrát molekula, így hatását bármekkora szubsztrát koncentrációnál kifejti. Ekkor nem érhető el a maximális sebesség, de K_M értéke nem változik.

Unkompetitív

Ebben az esetben az inhibitor a már létrejött enzim-szubsztrát komplexhez (ES) kötődik. Ekkor nem érhető el az eredeti maximális sebesség, és K_M értéke is kisebb lesz.

Ezek az enzimkinetikai vizsgálatok az inhibitormolekula hatásmechanizmusának kutatásakor jól hasznosíthatók.

***! Fontos megjegyezni, hogy enzim gátlás vizsgálatokor is teljesülniük kell a Michaelis-Menten modell feltételeinek, valamint a vizsgált inhibitor molekulát a szubsztráthoz hasonlóan nagy feleslegben kell alkalmazni, ahhoz, hogy a V_{max} és a K_M értékek változásai alapján el tudjuk dönteni, hogy milyen inhibíciós mechanizmusról van szó.**

Kooperatív enzimek

Nem minden enzimreakció írható le a Michaelis-Menten enzimkinetikával, ezzel a modellel nem írható le a kooperatív (az allosztéria alosete) enzimek kinetikája. A legtöbb allosztérikus enzim több alegységből felépülő fehérje-komplex. Ezen enzimeknél a reakciósebesség- szubsztrátkoncentráció görbe nem hiperbolikus, hanem szigmoidális. (Vö. a mioglobin oxigénkötő-képessége hiperbolikus, a hemoglobiné szigmoidális görbével jellemezhető.) Ennek oka, hogy az alegységek szubsztrátkötése kooperatív, vagyis a szubsztrát kötése az egyik aktív helyhez, képes megváltoztatni a molekulán lévő másik aktív hely tulajdonságait.

***! Gyakorlati szempontból ugyancsak fontos annak eldöntése szempontjából, hogy az enzimünk Michaelis-Menten kinetikát követ-e, hogy betartsuk a Michaelis-Menten modell feltételezéseiből eredő megkötéseket. Ha nem kezdeti sebességet mérünk, vagy az enzim koncentráció nem elhanyagolható a szubsztrát koncentrációhoz képest, akkor lehetséges, hogy emiatt kapunk szigmoid reakciósebesség- szubsztrátkoncentráció görbét, és nem azért, mert allosztérikus enzimekkel van dolgunk.**

Enzimek csoportosítása a katalizált reakciók típusa szerint (Enzyme Commission, E.C.)

1. Oxidoreduktázok redoxreakciók
2. Transzferázok funkcióscsoport transzportja
3. Hidrolázok hidrolitikus reakciók
4. Liázok nem hidrolitikus úton bontó enzimek
5. Izomerázok izomerizáció
6. Ligázok kötés kialakítás ATP felhasználásával

Nukleotid hidroláz enzimek

A biokémia szinte minden alapvető folyamata nukleotidok felhasználásával valósul meg, melyek energiahordozó, nukleinsav építőegység vagy szabályzó jel szerepet láthatnak el. Mindez a nukleotidok

hidrolízisének különleges voltán alapul, mely során egy vízmolekula végez nukleofil támadást a nukleotid trifoszfátlánc valamely foszfát centrumára és a reakció foszfát, vagy pirofoszfát csoport távozását eredményezi.

A ribo és dezoxiribonukleozid trifoszfát (NTP és dNTP) molekulák terminális **foszforsavanhidrid** csoportjának hidrolízise (a (d)NTP \rightarrow (d)NDP + foszfát átalakulás) **nagy negatív szabadentalpia változással** jár, ami a kötésbomlás nyomán hasznos munkára fordítható. Az így felszabaduló energiát az élőlények jellemzően molekulák konformációjának megváltoztatására fordítják. A nukleotidok között kitüntetett szerepe van az ATP-nek. Az **ATP** egy közös „**energiavaluta**” ami összeköti a lebontó folyamatokat az energiaigényes felépítő és egyéb folyamatokkal. Mindez számos sejtbeli folyamat, mint például szintetikus reakciók, a motorfehérjék mozgása, vagy aktív transzportot végző pumpák működésének alapját adja. Ezen folyamatban többnyire a terminális foszfát csoportot (γ -foszfát) hasítják le az enzimek az ATP molekuláról. Nukleotid hidrolízis történik a DNS és RNS szintézise során is, ekkor az utolsó két foszfátot (β és γ vágja le a DNS és RNS polimeráz, a hátramaradó nukleotid monofoszfát részt pedig az épülő DNS/RNS molekulába építi. Ez a folyamat is energiefelszabadulással jár, amit a DNS-t, illetve RNS-t építő polimerázok a DNS illetve RNS mentén történő irányított mozgásra is felhasználnak

Az (d)NTP hidrolízisének kedvező energetikai jellegéhez számos tényező járul hozzá.

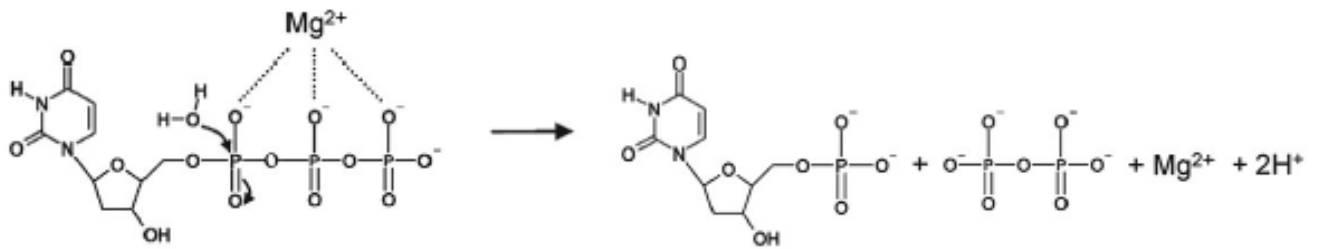
- Az **(d)NTP-ben négy negatív töltés** is közel van egymáshoz, és ezek elektrosztatikusan **taszítják egymást**. A foszforsavanhidrid kötés **hidrolízisével** a terminális foszfát vagy pirofoszfát a töltések egy részével együtt távozik, így **csökken ez a taszítás**.
- a keletkező foszfát vagy pirofoszfát kedvezőbb energiaállapotnak megfelelő geometriát vehet fel, valamint hidratáltsága is javul.
- A hátramaradó **(d)NDP vagy (d)NMP** rész azonnal **deprotonálódik**, ez a protonfelszabadulás szintén kedvező exoterm hőváltozással, valamint entrópiánövekedéssel jár, mivel a két kiindulási anyaggal (víz és **(d)NTP**) szemben a termékek száma háromra nő ((d)NDP, P_i és H^+).

Habár a NTP molekulák hidrolízise termodinamikailag nagymértékben kedvező az **dNTP-k kinetikailag stabil** vegyületek, mert a hidrolízishez szükséges **aktiválási szabadentalpia magas**. Az dNTP hidrolízis így csak megfelelő **enzim jelenlétében** zajlik nagy sebességgel.

Az dNTP hidrolizáló enzimek döntő többsége Mg^{2+} fémiont használ kofaktorként, az enzim-katalizálta reakció nem játszódik le ennek távollétében.

A gyakorlat során egy nukleotid hidroláz enzim, a dUTPáz aktivitását mérjük. A dUTPáz feladata, hogy lebontsa a dUTP-t a sejtben, és így megakadályozza, hogy a dUTP a dTTP helyett a DNS-be épüljön (a polimeráz adeninnel szemben mindkettőt beépíti). A DNS-ben az uracil hibának számít és

kivágódik. Ha túl sok uracil van a DNS-ben az mutációk számának emelkedéséhez és genomi instabilitáshoz vezet.



Nukleotid (dUTP) pirofoszforolízise.

Az ábra az alábbi cikkből származik: Kovári J, Barabás O, Varga B, Békési A, Tölgyesi F, Fidy J, Nagy J, Vértessy BG. 2008. Methylene substitution at the alpha-beta bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site. *Proteins* [Internet] 71:308–319. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932923>

A GYAKORLAT LEÍRÁSA

A mérés célja

A mérés célja a dUTPáz enzim Michaelis-Menten paramétereinek (v_{\max} , K_M), valamint átviteli számának meghatározása. Valamint, ha a gyakorlat idejébe belefér, a Mg^{2+} ion hatásának vizsgálata a fenti paraméterekre. A gyakorlat során hangsúlyt fektetünk a mérés tervezésre is.

Ehhez a gyakorlat során egy gyengén pufferolt sav-bázis indikátor oldat segítségével, spektrofotometriásan fogjuk követni a dUTPáz reakció hatására bekövetkező pH változást, és így a dUTPáz reakciót.

A gyakorlat során felhasznált anyagok, vegyszerek, eszközök

Anyagok, vegyszerek

- $MgCl_2$ mentes fenolvörös puffer, gyengén pufferált (1 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 40 μ M fenolvörös)
- $MgCl_2$ -t tartalmazó fenolvörös puffer, gyengén pufferált (1 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 μ M fenolvörös) - Mg^{2+} ion hatásának vizsgálatához
- dUTP oldat (tárolás: $-20^\circ C$)
- Rekombináns módon előállított dUTPáz enzim oldat (tárolás: $-80^\circ C$)
- pH mérő
- Keverő bot

Eszközök

- Jasco 750 termosztálható spektrofotométer
- Vízfürdő a termosztáláshoz
- 1 ml műanyag küvetták
- 1.5 ml eppendorf műanyag reakciócsövek
- 15 ml-es falconcső
- Jégfürdő
- Centrifuga
- Pipetták és pipettahegyek

A gyakorlat menete

- I. Kíséret tervezés: milyen enzim és szubsztrát koncentrációt használjunk? Gondolkodtató interaktív beszélgetés, számolások, előkísérletek a méréshez
- II. dUTPáz Michaelis-Menten paraméterek meghatározása $MgCl_2$ hiányában
- III. dUTPáz aktivitásának /vagy ha az idő engedi Michaelis-Menten paraméterek meghatározása $MgCl_2$ jelenlétében
- IV. Konklúziók levonása

Előkészületek a kísérletekhez/mérés

1. Készítsük el a dUTP oldatot. A nukleotid oldatot felolvasztás után vortexeljük az oldatot.
2. Olvasszuk fel a -80°C -on tárolt dUTPáz törzsoldatot.
3. Bekapcsoljuk a spektrofotométert és a vízfürdőt. A vízfürdő hőmérsékletét 20°C -ra állítjuk.
4. Bekapcsoljuk a számítógépet, majd elindítjuk a fotométerhez tartozó programot. A spektrofotométer UV lámpáját nem kapcsoljuk fel a gyakorlathoz (a program erre rákérdez). Nyissuk meg az aktivitás_gyakorlat parameter fájl, mely tartalmazza a mérés beállításait.
5. A referencia küvetta állásba és az egyes mérőállásba helyezzünk egy-egy üres küvetta, Ha a hőmérséklet elérte a beállított értéket, végezzük el a blank mérést.
6. Mérjük össze a mérés tervezés során meghatározott reakcióelegyet (dUTPáz + fenolvörös puffer) falconcsőbe.
6. Mérjük a reakcióelegyet a műanyag küvetta, majd a küvetta helyezzük a spektrofotométer 1-es, termosztált állásába, a referencia küvetta állásba helyezzünk egy üres küvetta- Indítsuk el az adatfelvételt, majd várjunk amíg az alapvonal stabil lesz.
7. A keverőbotra pipetázzuk a dUTP oldatot, majd ezt 3-5 gyors mozdulattal keverjük bele a reakcióelegybe, ezzel elindítva az enzimreakciót.
8. A reakció végbemenetelét észlelve állítsuk meg az adatfelvételt, majd mentjük el a mérést
9. A mérés végén mossuk el alaposan desztillált vízzel a használt küvetta és kapcsoljuk ki a műszert, a számítógépet és a termosztátot.
10. A mérést végezzük el az adott kísérlet típustól függően, különböző enzim és dUTPáz koncentrációknál.

Kiértékelés

1. Határozzuk meg a reakcióval járó abszorbanciaváltozást (ΔA), leolvassva az abszorbanciát a dUTP hozzáadásakor, valamint a reakció végén, a fotométerhez tartozó kiértékelő program segítségével.
2. Illesszünk egyenest a jelváltozás kezdeti, 10% szakaszára és határozzuk meg ennek meredekségét ($m = \Delta A / \Delta t$).
9. Számítsuk ki az adott szubsztrát koncentrációhoz (S) tartozó kezdeti sebességet (v_0) az alábbi egyenlet alapján:

$$v_0 = m * [S] / \Delta A$$

10. A Michaelis-Menten paraméterek meghatározásához, határozzuk meg az enzim kezdeti sebességét állandó enzimkoncentráció és különböző szubsztrát koncentrációk esetén, és ábrázoljuk ezeket a szubsztrátkoncentráció függvényében. A Michaelis-Menten egyenletnek megfelelő hiperbolát az

adatpontokra illesztve határozzuk meg a maximális reakciósebességet (v_{\max}) és a Michaelis-állandót (K_M).

$$v_0 = v_{\max} \cdot [S] / (K_M + [S])$$

Határozzuk meg az enzim átviteli számát (k_{cat}) a maximális reakciósebességet az enzimkoncentrációval osztva:

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]}$$

Határozzuk meg az enzim katalitikus hatékonyságát is.

Jegyzőkönyv követelmények

A lényeg, hogy a jegyzőkönyv elejétől a végéig reprodukálható legyen! A mértékegységek megfelelő használata minimum követelmény. Hiányzó vagy nem megfelelő mértékegységek esetén a jegyzőkönyv visszadobásra kerül.

- Rövid elméleti bevezető a Michealis-Menten kinetikáról
- Mérésleírás (milyen enzimet milyen módszerrel mérünk?) A módszer leírásánál törekedni kell arra, hogy a leírás alapján a mérés reprodukálható legyen. Azaz minden lépést le kell írni a gyakorlaton történtek szerint (akkor is, ha az órán történtek különböznek a jegyzetben szereplő adatoktól), a pontos mennyiségek és mértékegységek megadásával. Egy bemérés megadás akkor teljes, ha szerepel i) a kiindulási törzsoldat koncentrációja ÉS a bemérési térfogat, ÉS a végtérfogat; vagy ii) az oldat végkoncentrációja meg van adva (gyakorlati szempontból ekkor is érdemes megadni a mérési térfogatokat is).
- Órai méréstervezés menete és célja
- Az összes mérési adat és a számolt mennyiségek (ΔA és v_0) táblázatosan legyenek megadva (mindegyik mértékegységekkel!)
- v_0 számolás menete 1 példán bemutatva
- ΔA ábrázolása ΔS függvényében (tengelyfeliratokkal, mértékegységgel, diagramcímmel), az egyenesre egyenes illesztése (egyenlet és R^2 feltüntetésével), az illesztett egyenes értékelése röviden. Esetlegesen kiugró pontok esetén 2 opció közül lehet választani:
 - o 2 diagram készítésével az egyikben bemutatandó az összes adatpont (illesztést is el lehet végezni, ekkor célszerű az R^2 értékeket összehasonlítani), a másikon a kiugró pontok elhagyásával történhet az illesztés
 - o A kiugró pontot külön adatsorban megadva ábrázolható a diagram, ebben az esetben a külön adatsorhoz tartozó pontok más jelzéssel jelennek meg a diagramban, és az illesztésben csak az összetartozó adatsor pontjait veszi figyelembe a szoftver.
- A jel-zaj arányának ismeretében, a ΔS - ΔA grafikonból határozzuk meg azt is, hogy mi az a legkisebb szubsztrát koncentráció, ahol még értékelhető a mérés.

- v_0 kezdeti sebesség értékek ábrázolása ΔS függvényében, a 0;0 pont ábrázolásával együtt. Az egyenesre Michealis-Menten görbe illesztése (ld. segédlet), az egyenes egyenlete, az illesztés R^2 együtthatója feltüntetésével. A kapott v_{max} és K_M értékek megadása. (Tengelyfeliratok, mértékegységek, diagramcím ugyancsak szükségesek.) Kiugró pontok esetén a fentebb ismertetett 2 megoldás közül bármelyik választható. Az illesztett görbe értékelése.
- k_{cat} és K_M megadása, illetőleg a katalitikus hatékonyság kiszámítása, ezek értékelése. A feltüntetett értékek tizedesjegyeinek száma reális legyen a mérés hibájához képest.
- $MgCl_2$ -os mérési eredmények bemutatása
- Eredmények értelmezése, értékelése, egyéb megjegyzések és következtetések. Ebben a részben választ várunk a következő kérdésekre: Megfelelő minőségű adatokat kaptunk-e, a mért adatokból megbízhatóan következtethetünk-e az enzimünk tulajdonságaira? Ha nem megbízhatóak az adatok, a mérési körülményeket végig gondolva, melyik az a mérési paraméter/reagens koncentráció, amit meg lehetne változtatni? Amennyiben megbízhatóak az eredmények, milyen hatással van a $MgCl_2$ az enzim aktivitására? Mi lehet ennek a biokémiai háttere?

Segédlet Michealis-Menten görbe illesztéséhez

Nagyon ajánljuk az OriginPro programmal való megismerkedést, mivel nagyon sok mindent tud, és a későbbiekben is hasznos lehet a program ismerete. Az oktatas.ch.bme.hu oldalon a biokémia labor leiratok mappában egy régebbi Origin verzióra vonatkozó telepítési és használati útmutató áll mindenki rendelkezésére.

Ugyanakkor a program használata nem kötelező, bármilyen szoftver segítségével el lehet végezni a jegyzőkönyvben megkövetelt kiértékeléseket. Egyenest akár excel felhasználásával is nagyon könnyen lehet illeszteni. A Michaelis-Menten egyenlet illesztésére pedig alkalmas az alábbi online alkalmazás is: <http://mycurvefit.com/>

AZ ÉRTÉKELÉS SZEMPONTJAI

Felkészültség (A sikeres beugró ZH feltétele a gyakorlaton való részvételnek!)

A beugró anyaga ez a jegyzet és az órai előadás.

A beugró feladatok között számolási feladatokra is lehet számítani, ezért mindenkinél saját számológép szükséges a gyakorlatra.

Az órai aktivitás az elfogadott jegyzőkönyv pontszámát tört pontszám esetén felfelé kerekítheti.

Gyakorlaton vezetett jegyzőkönyv + számolás otthon

A gyakorlat során a munkavédelmi és biztonságtechnikai előírások betartása kötelező!

Ajánlott irodalom:

Elődi: Biokémia

Wunderlich Lívius-Szarka András: A biokémia alapjai

Stryer: Biochemistry

Lehninger: Principles of Biochemistry

Sarkadi Lívia: Biokémia mérnökhallgatóknak

Hans Bisswagner: Enzyme assays. Perspectives in Science, 2014, 1, 41-55.

A FELKÉSZÜLÉST SEGÍTŐ KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. Egy 17 mM-os dUTP törzsoldatból szeretnénk készíteni 100 μl 1,5 mM-os végkoncentrációjú oldatot. Mekkora térfogatú dUTP oldatot és desztillált vizet pipettázunk össze az oldat elkészítéséhez?
2. Egy enzim maximális reakció sebessége $0,1 \mu\text{M/s}^{-1}$, Michelis állandója pedig $12,5 \mu\text{M}$.
 - a. Mekkora kezdeti sebességgel rendelkezik az enzim $121 \mu\text{M}$ szubsztrát jelenlétében?
 - b. A mérést nem megfelelően végeztük és nem kezdeti sebességet mértünk. Ehelyett a kezdeti sebességet akkor határoztuk meg, amikor már csak az eredetileg hozzáadott $121 \mu\text{M}$ szubsztrát i) 50%-a; ii) 10% volt jelen a mérésben. Mekkora sebességeket mértünk ezekben az időpillanatokban?
3. Miért fontos, hogy kezdeti sebességet mérjünk, ha egy enzim Michaelis-Menten paramétereit szeretnénk meghatározni?
4. Hogyan befolyásolja az enzim jelenléte az általa katalizált reakció
 - a. egyensúlyát?
 - b. sebességét?
 - c. aktiválási energiáját?
5. Írd fel a Michaelis-Menten egyenletet, definiáld az egyenlet paramétereit!
6. Hogyan befolyásolhatja egy enzim működését a hőmérséklet, a pH, illetve az oldat ion összetételének megváltoztatása?
7. Miért alkalmazunk nagy szubsztrát felesleget a steady-state mérésekben?

Megjegyzés: a Beugróban ehhez hasonló, és ettől eltérő, a jegyzet anyagával kapcsolatos, egyszerű és gondolkodtató, olykor egyszerű számolást igénylő kérdések is várhatóak.

GONDOKODTATÓ KÉRDÉSEK A GYAKORLAT SZÁMOLÁSI FELADATAIHOZ

Szeretnénk vizsgálni egy enzimet, amiről tudjuk, hogy Michaelis-Menten enzimkinetikával modellezhető a működése, és amelyről tudjuk, hogy $T=20^\circ\text{C}$ a katalitikus aktivitása kb. $1,5\text{-}2,5 \text{ s}^{-1}$, Michelis állandója pedig $1\text{-}3 \mu\text{M}$. Ennek az enzimnek a pontos kinetikai paramétereit szeretnénk meghatározni, amihez meg kellene terveznünk az aktivitásmérést.

- A becsült K_M érték ismeretében, a legkisebb és legnagyobb mérendő szubsztrátkoncentráció megadásával határozzuk meg, hogy milyen szubsztrátkoncentráció tartományban érdemes mérni a K_M pontos meghatározásához.
- Hány különböző szubsztrátkoncentrációval érdemes elvégezni a mérést?
- A legkisebb és a legnagyobb szubsztrátkoncentráció között hogyan osszuk fel a maradék mérési pontot?

- Tudjuk, hogy 20 másodpercnél rövidebb reakciót nem nagyon tudunk kiértékelni. A katalitikus aktivitás ismeretében milyen enzim koncentrációt érdemes választani a méréshez? (A reakciógörbe a legkisebb szubsztrátkoncentráció esetében lesz a legrövidebb, így ennél a feladatnál ezt a szubsztrátkoncentrációt érdemes figyelembe venni.)