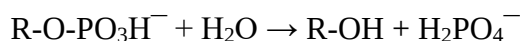


ENZYMOLOGIA
LABORATORIUM NR 3

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA PARAMETRY KINETYCZNE
KWAŚNEJ FOSFATAZY

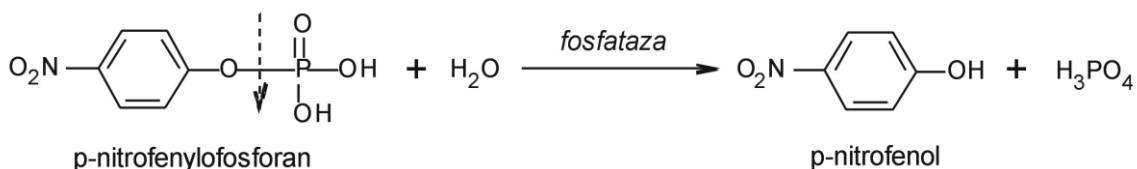
Fosfatazy to grupa enzymów należących do klasy hydrolaz, podklasy esteraz – enzymów hydrolizujących wiązania estrowe. Katalizują odszczepienie reszty fosforanowej od różnych naturalnych estrów kwasu fosforowego: cukrowców, białek, tłuszczowców, nukleotydów i wielu innych według poniższej reakcji:



Enzymy te zostały podzielone na dwie podgrupy w zależności od pH optymalnego dla ich działania, wyróżnia się:

- fosfatazy kwaśne, optimum w zakresie pH 4,0 do 7,0
- fosfatazy alkaliczne, optimum w zakresie pH 9,0 do 11,0.

Fosfatazy kwaśne charakteryzują się niską specyficznością substratową. Mogą katalizować defosforylację różnych naturalnych substratów, takich jak 3-fosfoglicerynian, fosfoenolpirogonian, ATP, czy białka modyfikowane potranslacyjnie przez fosforylację tyrozyny. Poza naturalnymi substratami enzymy te rozszczepiają także 2-glicerofosforan, fenylofosforan, fosforan fenoloftaleiny, czy estry fosforanowe fenoli, np. p-nitrofenylofosforan powodując uwolnienie fosforanu. Na podstawie jego ilości lub ilości części organicznej estru po reakcji enzymu z substratem można mierzyć aktywność. Najczęściej stosowanym w analityce sztucznym substratem jest p-nitrofenylofosforan (pNPP), z którego po defosforylacji powstaje p-nitrofenol (Rys. 1). W środowisku zasadowym związek ten daje żółte zabarwienie, którego intensywność można mierzyć spektrofotometrycznie.



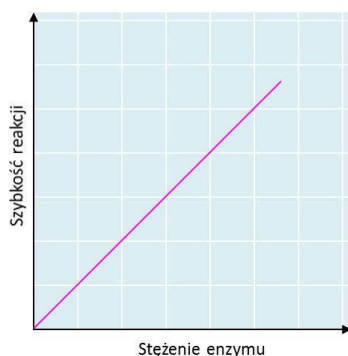
Rys. 1. Reakcja hydrolizy p-nitrofenylofosforanu katalizowana przez fosfatazę kwaśną.

Kwaśne fosfatazy występują głównie w roślinach: w bulwach, nasionach, owocach, liścieniach, korzeniach i liściach. Na terenie komórki roślinnej zlokalizowane są w cytozolu, wakuolach lub ścianie komórkowej.

Enzymy te występują także u zwierząt, gdzie są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za trawienie wewnątrzkomórkowe, zlokalizowane są w lizosomach i stanowią dla tych organelli tzw. "enzym znacznikowy". U ludzi kwaśna fosfataza używana jest jako enzym markerowy w diagnostyce, ponieważ jej aktywność wyraźnie wzrasta przy niektórych chorobach nowotworowych, chorobach wątroby i kości.

1. Wpływ stężenia enzymu na jego aktywność

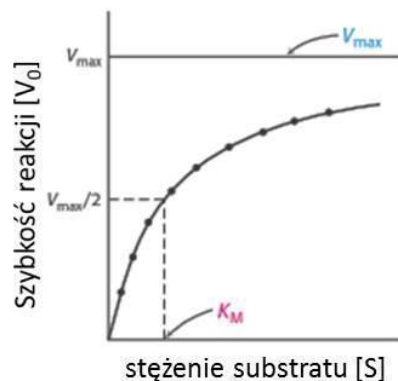
Zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu obserwuje się stosując wysokie, optymalne dawki substratu, powodujące wysycenie wszystkich cząsteczek enzymu. W takich warunkach szybkość katalizowanej reakcji jest uzależniona tylko od stężenia enzymu – im jest go więcej tym więcej cząsteczek produktu będzie powstawać i wykres tej zależności przyjmuje postać prostej (Rys. 2).



Rys. 2. Zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu.

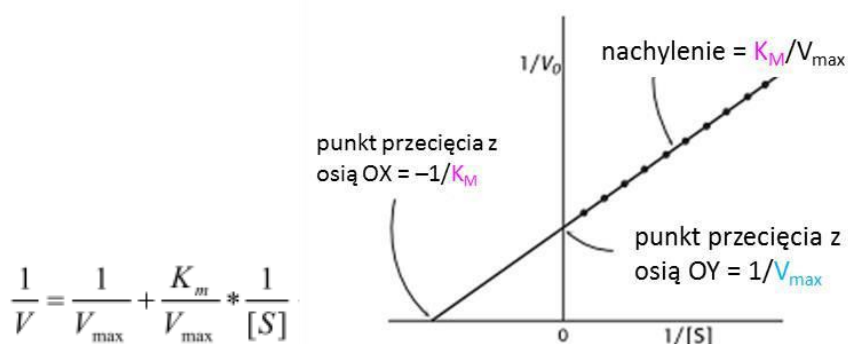
2. Wpływ stężenia substratu na aktywność enzymu

Reakcje katalizowane przez enzymy charakteryzują się punktem wysycenia enzymu substratem. Przy małych ilościach substratu wszystkie jego cząsteczki wiążą się z enzymem angażując w reakcję tylko część puli cząsteczek enzymu. Przy dużych ilościach substratu wszystkie cząsteczki enzymu są wysyczone i zaangażowane w reakcję, która przebiega wtedy z prędkością maksymalną ($V_{\max}$). Zależność prędkości reakcji od stężenia substratu opisuje równanie Michaelisa-Menten, a obrazuje ją hiperbola (Rys. 3). Każdy enzym ma również charakterystyczną stałą K_M , której wartość równa jest połowie wartości $V_{\max}$.



Rys. 3. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu [S], K_M – stała Michaelisa-Menten; V_{max} – maksymalna prędkość reakcji (Berg et al. Biochemistry).

Do wyznaczania wartości K_M i V_{max} , najczęściej stosuje się odwrotność równania Michaelisa-Menten, przekształcającą go w równanie prostej. Jest to tzw. równanie Lineweavera-Burka, którego wykresem jest linia prosta (Rys. 4).

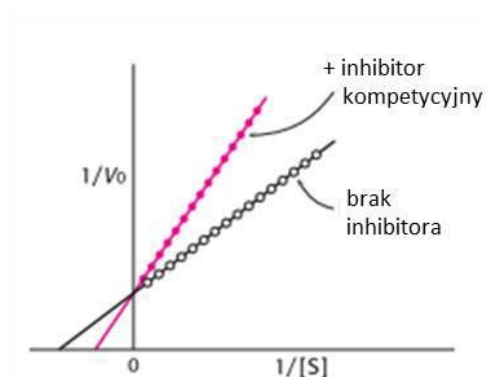


Rys. 4. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu [S] zgodnie z przekształceniem Lineweavera-Burka, K_M – stała Michaelisa-Menten; V_{max} – maksymalna prędkość reakcji (Berg et al. Biochemistry).

3. Wpływ inhibitorów na aktywność enzymu

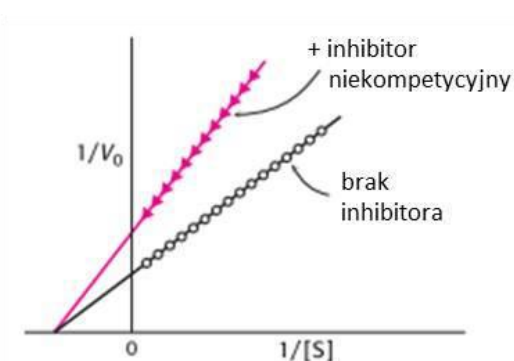
Aktywność biokatalityczna wielu enzymów może zostać obniżona lub całkowicie zahamowana poprzez związanie specyficznych cząsteczek zwanych inhibitorami. Inhibitory ograniczają działanie enzymów poprzez zmiany w obrębie centrum aktywnego – albo blokują miejsce dla substratu, albo oddziałują w innym miejscu zaburzając strukturę centrum. Inhibitorami mogą być metabolity komórkowe, leki, trucizny, sole, analogi substratów. Inhibicja może trwale uszkodzić enzym, nazywamy ją wtedy nieodwracalną lub czasowo ograniczyć działanie enzymu – inhibicja odwracalna. Pod względem mechanizmu działania wyróżnia się dwa zasadnicze typy inhibicji: kompetycyjną (współzawodniczącą) i niekompetycyjną (niewspółzawodniczącą).

Do inhibicji kompetycyjnej dochodzi wtedy, gdy inhibitor współzawodniczy z substratem o centrum aktywne. Szybkość reakcji zależy od wzajemnego stosunku stężeń substratu i inhibitora, jeżeli stężenie substratu będzie przewyższać stężenie inhibitora, to szybkość reakcji zmniejszy się nieznacznie bądź w ogóle nie ulegnie zmianie. Jeśli przeważać będzie ilość inhibitora w roztworze, to reakcja katalizowana ulegnie inhibicji czyli zmniejszeniu szybkości reakcji. Wzrost stężenia inhibitora powoduje, że wartość $1/V_{\max}$ pozostanie niezmienną, jednak żeby ją osiągnąć konieczne jest znacznie wyższe stężenie substratu. Zwiększa się natomiast wartość K_M (Rys.5)



Rys. 5. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu $[S]$ zgodnie z przekształceniem Lineweavera-Burka, dla reakcji z inhibitorem kompetycyjnym i bez; K_M – stała Michaelisa-Menten; $V_{\max}$ – maksymalna prędkość reakcji (Berg et al. Biochemistry).

Drugi typ inhibicji to inhibicja niekompetycyjna. W tym przypadku inhibitor nie jest podobny do substratu, ale jest w stanie związać się z enzymem w innym miejscu niż centrum aktywne. Powoduje to zmianę konformacji tego centrum i obniżenie zdolności katalitycznej. Sytuacja taka powoduje obniżenie wartości $V_{\max}$, nie zmieniając wartości K_M (Rys. 6).



Rys. 6. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu $[S]$ zgodnie z przekształceniem Lineweavera-Burka, dla reakcji z inhibitorem niekompetycyjnym i bez; K_M – stała Michaelisa-Menten; $V_{\max}$ – maksymalna prędkość reakcji (Berg et al. Biochemistry).

Typ inhibicji można określić przeprowadzając reakcje enzymatyczne przy różnych stężeniach substratu oraz inhibitora i wyznaczając wartość K_M i V_{max} . Po narysowaniu wykresu zależności, na podstawie jego kształtu można wywnioskować jaki mechanizm działania ma zastosowany inhibitor.

Miarą aktywności enzymu jest szybkość reakcji enzymatycznej (V). Podobnie jak w przypadku reakcji chemicznych, do pewnego momentu jest ona proporcjonalna do stężenia substancji reagujących i wyznacza się ją poprzez pomiar przyrostu stężenia produktu reakcji w czasie. Miarą szybkości reakcji w danym momencie jest więc wzrost stężenia produktu, jaki następuje w jednostce czasu. Aktywność enzymatyczną wyrażamy w dwóch standardowych jednostkach. Są to: jednostka enzymatyczna (U) oraz katal (kat). Jednostka enzymatyczna (U) jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przekształcenie 1 μ mola substratu w ciągu 1 minuty, w warunkach optymalnych dla danego enzymu. Katal (kat) jest jednostką aktywności enzymatycznej obowiązującą w układzie SI i jest definiowany jako aktywność katalityczna, która zwiększa szybkość reakcji o 1 mol na sekundę, w warunkach optymalnych.

W warunkach optymalnych przy nadmiarze substratu i stałym stężeniu enzymu szybkość reakcji powinna być wielkością stałą a wykres szybkości odpowiadać linii prostej (reakcja zerowego rzędu). Jednak w rzeczywistości wraz z upływem czasu szybkość reakcji (V) często maleje wskutek ubytku substratu, hamowania przez produkt oraz stopniowej inaktywacji enzymu. Dlatego w rzeczywistości tylko w początkowej fazie reakcja szybkość działania enzymu jest liniową funkcją czasu – jest to tzw. szybkość początkowa reakcji enzymatycznej (V_0).

$$V_0 = \frac{\text{produkt } [\mu\text{mole}]}{\text{czas } [\text{min}]} \quad \text{lub} \quad V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

gdzie:

V_0 – szybkość reakcji początkowej

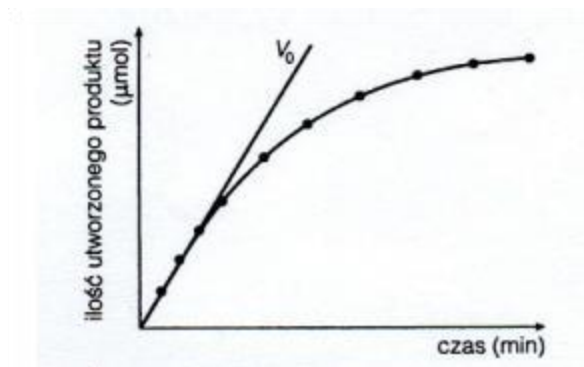
$V_{\max}$ – szybkość maksymalna reakcji dla enzymu wysyczonego substratem

$[S]$ – stężenie substratu

K_m – stała Michaelisa

W analizach *in vitro* stężenie substratu maleje w czasie reakcji, w miarę jego zużywania i przy dłuższym czasie inkubacji zależność pomiędzy przyrostem produktu, a czasem reakcji nie będzie funkcją liniową (Rys. 7). Również enzym w trakcie wykonywania oznaczeń może ulegać denaturacji, co pogłębia powyższy efekt. Wartość V_0 uzyskuje się przez wykreślenie

linii prostej stycznej do początkowego odcinka krzywej, poczynając od czasu zerowego (Rys. 7). Nachylenie tej prostej ma wartość V_0 . Dla badań kinetyki enzymów *in vitro* niezwykle ważne jest więc określenie czasu reakcji, w którym przyrost produktu reakcji enzymatycznej jest wprost proporcjonalny do czasu.



Rys. 7. Prędkość początkowa reakcji enzymatycznej jako funkcja wzrost ilości produktu w czasie.

ODCZYNNIKI

1. 8 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP)
2. 0,1 M NaOH
3. 0,5 M bufor Tris-octan o pH: 4; 5,5; 6,5; 8
4. 0,02 M molibdenian amonu

WYKONANIE

Rozmrozić ekstrakt enzymatyczny ziemniaka z poprzednich ćwiczeń, w trakcie zajęć przetrzymać go na stole.

Grupa dzieli się na dwa zespoły. Każdy zespół przeprowadza całe ćwiczenie we własnym zakresie (każdy zespół pracuje na swoim ekstrakcie) wykonując wszystkie przewidziane reakcje. W trakcie przygotowywania sprawozdania wyniki z obu zespołów traktowane są jako dwa powtórzenia jednego eksperymentu, więc należy wyciągać z nich średnią.

1. Wpływ pH na szybkość reakcji przeprowadzanej przez kwaśną fosfatazę

Przygotować pięć probówek. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 1.:

Tab. 1. Badanie wpływu pH.

	<i>Kontrola (pH 5,5) (1)</i>	<i>pH 4 (2)</i>	<i>pH 5,5 (3)</i>	<i>pH 6,5 (4)</i>	<i>pH 8 (5)</i>
<i>bufor Tris-octan o odpowiednim pH</i>	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
<i>woda dejonizowana</i>	250 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
<i>enzym</i>	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
<i>inkubować na stole przez 5 minut</i>					
<i>pNPP</i>	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
<i>inkubować przez 15 minut</i>					
<i>0,1 M NaOH</i>	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l

Zmierzyć absorbancję prób przy długości fali 420 nm, zerując spektrofotometr względem próby kontrolnej, a następnie obliczyć szybkość reakcji (V) w zależności od pH ze wzoru (4) oraz narysować wykres zależności szybkości reakcji od pH środowiska.

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (1)$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l} \quad (2)$$

$$n = \frac{A \times V_{obj}}{\varepsilon \times l} \quad (3)$$

$$V = \frac{n}{t} = \frac{A \times V_{obj}}{\varepsilon \times l \times t} \quad (4)$$

gdzie:

A – absorbancja

ε – molowy współczynnik ekstynkcji p-nitrofenolu wynoszący 18 400 [M⁻¹cm⁻¹]

l – grubość warstwy (kuwety) równy 1 [cm]

V_{obj} – objętość roztworu

t – czas

Aktywność enzymów najlepiej jest wyrazić w jednostce $\mu\text{mol/min}$.

2. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji przeprowadzanej przez kwaśną fosfatazę

Przygotować pięć probówek. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 2.:

Tab. 2. Badanie wpływu stężenia enzymu.

	<i>Kontrola (1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(5)</i>
<i>bufor Tris-octan optymalny dla enzymu</i>	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl
<i>woda dejonizowana</i>	250 μl	200 μl	150 μl	100 μl	50 μl
<i>enzym</i>	-	50 μl	100 μl	150 μl	200 μl
<i>inkubować na stole przez 5 minut</i>					
<i>pNPP</i>	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
<i>inkubować przez 15 minut</i>					
<i>0,1 M NaOH</i>	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl

Po wymieszaniu zmierzyć absorbancję prób przy 420 nm względem kontroli. Wykonać obliczenia prędkości, narysować wykres zależności szybkości reakcji od stężenia enzymu.

3. Badanie wpływu temperatury na szybkość reakcji przeprowadzanej przez kwaśną fosfatazę

Przygotować 6 probówek. Przeprowadzić reakcję zgodnie z Tabelą 3. Do pięciu probówek odmierzyć po 150 μl buforu o pH optymalnym dla działania enzymu, 150 μl wody dejonizowanej oraz 100 μl ekstraktu enzymatycznego. Do próby kontrolnej dodać 150 μl buforu i 250 μl wody. Następnie każdą z probówek inkubować przez 5 minut w następujących lokalizacjach:

- 1) 4°C w lodówce
- 2) 25°C na stole
- 3) 50°C w cieplarni
- 4) 70°C w bloku grzewczym
- 5) 100°C w zlewce w łaźni wodnej

Po inkubacji, nie wyjmując probówek z miejsc o wyznaczonej temperaturze, do każdej z nich dodać po 100 μl substratu (pNPP), dokładnie wymieszać i inkubować przez 15 minut (do kontroli również!). Po tym czasie nie wyjmując probówek do wszystkich, łącznie z kontrolą dodać 500 μl 0,1M NaOH.

Tab. 3. Badanie wpływu temperatury.

	<i>kontrola (25°C) (1)</i>	<i>4°C (2)</i>	<i>25°C (3)</i>	<i>37°C (4)</i>	<i>70°C (5)</i>	<i>100°C (6)</i>
<i>bufor Tris-octan optymalny dla enzymu</i>	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl
<i>woda dejonizowana</i>	250 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl
<i>enzym</i>	-	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
<i>inkubować przez 5 minut w odpowiedniej temperaturze</i>						
<i>pNPP</i>	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
<i>inkubować przez 15 minut</i>						
<i>0,1 M NaOH</i>	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl

Po wymieszaniu zmierzyć absorbancję prób przy 420 nm względem kontroli. Wykonać obliczenia prędkości, narysować wykres wpływu temperatury na szybkość reakcji.

4. Wyznaczanie prędkości maksymalnej oraz stałej K_m dla kwaśnej fosfatazy

Przygotować 7 probówek. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 4.:

Tab. 4. Wyznaczanie prędkości maksymalnej.

	<i>Kontrola (1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(5)</i>	<i>(6)</i>	<i>(7)</i>
<i>bufor Tris- octan optymalny dla enzymu</i>	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l
<i>woda dejonizowana</i>	1250 μ l	1200 μ l	1150 μ l	1050 μ l	950 μ l	850 μ l	750 μ l
<i>pNPP</i>	-	50 μ l	100 μ l	200 μ l	300 μ l	400 μ l	500 μ l
<i>inkubować przez 5 minut</i>							
<i>enzym</i>	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
<i>inkubować przez 15 minut</i>							
<i>0,1 M NaOH</i>	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Zawartość probówek wymieszać i zmierzyć absorbancję przy 420 nm względem kontroli.

Dla poszczególnych stężeń substratu obliczyć szybkość reakcji i stężenie substratu [S] ze wzoru (5):

$$S = \frac{\text{ml substratu} \times 0,008 \text{ M}}{2,5 \text{ ml}} \quad (5)$$

Dla każdego stężenia obliczyć $1/[S]$ oraz $1/V$.

Narysować wykres zależności prędkości reakcji od stężenia substratu, zaznaczając na osi OY wartości $1/[V]$, a na osi OX wartości $1/[S]$. Przedłużyć linię wykresu do jej przecięcia się z ujemną częścią osi OX i z otrzymanej wartości $-1/K_m$ obliczyć wartość stałej K_m dla reakcji katalizowanej przez kwaśną fosfatazę.

Odczytać z wykresu wartość $1/[V_{\max}]$ (punkt przecięcia prostej z osią OY) i na tej podstawie obliczyć prędkość maksymalną reakcji ($V_{\max}$).

5. Wyznaczanie prędkości maksymalnej oraz stałej K_m dla kwaśnej fosfatazy w obecności inhibitora

Przygotować 7 probówek. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 5.:

Tab. 5. Badanie wpływu inhibitora.

	Kontrola (1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
bufor Tris-octan optymalny dla enzymu	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l
woda dejonizowana	1200 μ l	-	-	-	-	-	-
enzym	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
0,02 M molibdenian amonu	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
inkubować przez 10 minut							
woda dejonizowana	-	1150 μ l	1100 μ l	1000 μ l	900 μ l	800 μ l	700 μ l
pNPP	-	50 μ l	100 μ l	200 μ l	300 μ l	400 μ l	500 μ l
inkubować przez 15 minut							
0,1 M NaOH	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Zawartość probówek wymieszać i zmierzyć absorbancję przy 420 nm względem kontroli. Dokonać obliczeń stężeń, prędkości według wzorów z poprzedniego zadania. Wyznaczyć K_m i V_{max} . Porównać wartości K_m i V_{max} dla reakcji przebiegającej w obecności inhibitora i w warunkach optymalnych, na podstawie wyników opisać typ inhibicji kwaśnej fosfatazy.

6. Wyznaczanie prędkości początkowej (V_0) dla kwaśnej fosfatazy

Przygotować po 1000 μ l rozcieńczenia enzymu: 10x, 25x, 100x i 250x wykorzystując 0,9% NaCl. Dla każdego rozcieńczenia przygotować szereg 7 probówek. Do wszystkich wprowadzić 50 μ l buforu Tris-octan o pH optymalnym dla enzymu oraz 50 μ l substratu (pNPP). Kontrolę odstawić na bok. Dla każdego rozcieńczenia przeprowadzić eksperyment osobno.

Reakcję enzymatyczną rozpocząć dodając w równych odstępach czasu (co 30 sekund) 100 μ l odpowiedniego rozcieńczenia enzymu. Każdą probówkę inkubować przez określony czas – pierwszą 2 minuty, drugą 4 minuty, trzecią 6 minut, itd. - 8, 10 i 12 minut, a następnie zatrzymać reakcję przez dodanie 1 ml 0,1M NaOH. NaOH dodać także do próby kontrolnej

(każde rozcieńczenie ma swoją kontrolę!). Na końcu do kontroli dodać po 100 μ l odpowiedniego rozcieńczenia enzymu. Zmierzyć absorbancję względem próby zerowej przy długości fali 420 nm. Na podstawie otrzymanych wyników wykreślić zależność szybkości hydrolizy substratu (wyrażonej jako wartość absorbancji) od czasu inkubacji dla każdego z rozcieńczeń enzymu.