

Πείραμα 4^ο: Κινητική μελέτη ενός ενζύμου - Τυροσινάση - Στοιχεία θεωρίας

I. ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ

Τα ένζυμα καταλύουν μια συγκεκριμένη αντίδραση και αυτό που μας ενδιαφέρει είναι το ποσό του προϊόντος που σχηματίζεται στη μονάδα του χρόνου. Αυτό ορίζεται ως **ενεργότητα (activity)**.

$$\text{Ενεργότητα} = \text{προϊόν που παράγεται} / \text{χρόνος}$$

Συνήθως η ενζυμική ενεργότητα εκφράζεται ως micromoles προϊόντος που σχηματίζονται ανά λεπτό (min). Αυτή είναι μια **μονάδα ενεργότητας (unit of activity)**.

$$1 \text{ μονάδα ενεργότητας (U)} = 1 \text{ } \mu\text{mole/min}$$

Παρόλα αυτά μπορούμε να ορίσουμε τη μονάδα ενεργότητας όπως μας εξυπηρετεί και πάντα σε συνδυασμό με τη δοκιμασία προσδιορισμού που χρησιμοποιούμε. Εάν π.χ. μελετούσαμε ένα ένζυμο με εξαιρετικά χαμηλή ενεργότητα στο κύτταρο, πιθανόν να ήταν άβολο να γράφουμε 0,003 units οπότε θα μπορούσαμε να ορίσουμε το 1 unit ως 1 nmole/min οπότε θα είχαμε 3 units. Επομένως, όταν μετράμε την ενεργότητα ενός ενζύμου, δεν προσδιορίζουμε τον αριθμό των μορίων του ενζύμου αλλά τι κάνουν αυτά τα μόρια. Η ενεργότητα εξαρτάται από τις συνθήκες της αντίδρασης, όπως το pH, την ιονική ισχύ, τη θερμοκρασία και την παρουσία παρεμποδιστών ή ενεργοποιητών.

Εάν θέλουμε να ξέρουμε πόσο συγκεντρωμένο είναι το ένζυμό μας στο συγκεκριμένο δείγμα, τότε πρέπει να υπολογίσουμε πόσες μονάδες ενεργότητας (units of activity) έχουμε σε συγκεκριμένο όγκο. Αυτό ορίζεται ως **σχετική ενεργότητα (relative activity)** και συνήθως εκφράζεται σε **U/mL**.

$$\text{Σχετική ενεργότητα} = \text{units/mL} = \text{U/mL}$$

Επομένως, αν χρησιμοποιώντας τον παραπάνω ορισμό των units και προσθέτοντας 0,10 ml ενζύμου διαπιστώνουμε ότι η αντίδρασή μας προχωρά κατά 10 $\mu\text{mole/min}$, τότε η σχετική ενεργότητα του ενζύμου είναι:

$$\frac{10 \mu\text{mole}/\text{min}}{0,1 \text{ mL}} = \frac{100 \mu\text{mole}/\text{min}}{\text{mL}} = \frac{100 \text{ U}}{\text{mL}}$$

Ο αριθμός των units ανά ml μας δίνει πληροφορίες για το πόσο πυκνό είναι το ένζυμο αλλά όχι για το πόσο καθαρό είναι. Το ιδανικό είναι να έχουμε μεγάλη τιμή ενζυμικής ενεργότητας χωρίς προσμίξεις από άλλες πρωτεΐνες. Αυτό ορίζεται ως **ειδική ενζυμική ενεργότητα (specific activity)**.

$$\text{Ειδική ενζυμική ενεργότητα} = \text{U/mg πρωτεΐνης}$$

Όπως φαίνεται και παραπάνω, αυτή η ενεργότητα ορίζεται ως ο αριθμός των units προς τα mg της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος. Πρέπει να λάβουμε υπόψη μας, ότι μπορεί να έχουμε π.χ. δυο παρασκευές ενζύμων με την ίδια ειδική ενεργότητα που όμως μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικές. Αυτό συμβαίνει επειδή η ειδική ενεργότητα ορίζεται ως λόγος δυο παραγόντων. Οτιδήποτε αυξάνει τον αριθμό των units ή ελαττώνει τον αριθμό των mg της πρωτεΐνης αυξάνει την ειδική ενεργότητα. Ο αριθμός των mg αναφέρεται στη συνολική πρωτεΐνη που υπάρχει στο διάλυμα, είτε πρόκειται για ένζυμο είτε όχι. Ο αριθμός των units εκφράζει μόνο την ενεργή μορφή του ενζύμου που μας ενδιαφέρει. Σε γενικές γραμμές, το δείγμα του ενζύμου με τη μεγαλύτερη τιμή ειδικής ενεργότητας είναι και το πιο καθαρό.

II. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΜΙΑΣ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Όποτε κάνουμε μια ενζυμική αντίδραση, πρέπει να είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε την αρχική ταχύτητα. Αυτή είναι η ταχύτητα ή ο αριθμός των units στην αρχή της αντίδρασης. Η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Όταν πρόκειται να μελετήσουμε ένα ένζυμο προσπαθούμε να κρατήσουμε τους υπόλοιπους παράγοντες σταθερούς, γι' αυτό και χρησιμοποιούμε μεγάλες ποσότητες υποστρώματος. Όταν το ένζυμο έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα, το μετατρέπει σε προϊόντα. Η ταχύτητα της αντίδρασης από κάποιο χρονικό σημείο κι έπειτα θα ελαττωθεί λόγω κατανάλωσης του υποστρώματος και συσσώρευσης του προϊόντος. Ο ευκολότερος τρόπος για να μετρήσουμε την αρχική ταχύτητα είναι να παραστήσουμε γραφικά την απορρόφηση προς το χρόνο της

αντίδρασης. Εάν μετράμε την ταχύτητα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, πιθανόν να πάρουμε τιμές παρόμοιες μ' αυτές στον Πίνακα 1:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Απορρόφηση προς χρόνο

Χρόνος (sec)	Απορρόφηση
0	0
15	0,05
30	0,10
45	0,15
60	0,20
75	0,24
90	0,27
105	0,30
120	0,32

Εάν παραστήσουμε γραφικά τα δεδομένα αυτά θα έχουμε τη γραφική παράσταση που φαίνεται στην Εικόνα 1. Μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται γραμμικά το πρώτο λεπτό, αλλά στη συνέχεια ελαττώνεται. Κάποιοι από μας ίσως έκαναν το λάθος να υπολογίσουν την αρχική ταχύτητα της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης παίρνοντας την απορρόφηση στα 2 λεπτά, αφαιρώντας την απορρόφηση στα 0 λεπτά και στη συνέχεια διαιρώντας με το 2 (min). Έτσι θα είχαμε την αλλαγή της απορρόφησης ανά λεπτό, όχι όμως και την αρχική ταχύτητα γιατί στον υπολογισμό μας έχουμε συμπεριλάβει και τιμές απορρόφησης εκτός του γραμμικού τμήματος. Κάνοντας τους υπολογισμούς μ' αυτό τον τρόπο παίρνουμε μεταβολή απορρόφησης $0,32/2=0,16$ ανά λεπτό ενώ η πραγματική αρχική ταχύτητα είναι 0,2 ανά λεπτό.

Επομένως, ο ασφαλέστερος τρόπος είναι να παραστήσουμε γραφικά τα δεδομένα και να πάρουμε την αρχική κλίση της καμπύλης. Ένας άλλος τρόπος είναι να παρατηρήσουμε προσεκτικά τα δεδομένα του πίνακα. Θα διαπιστώσουμε ότι η απορρόφηση αυξάνεται κατά 0,05 κάθε 15 δευτερόλεπτα κι ότι η μεταβολή αυτή είναι σταθερή για το πρώτο λεπτό οπότε η αρχική ταχύτητα είναι 0,2/min.

Μετατροπή της απορρόφησης σε Units

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της τυροσινάσης στις μετρήσεις κινητικής χρησιμοποιούμε το συντελεστή απορρόφησης του προϊόντος, dopachrome ($3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) για να μετατρέψουμε τη μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό, σε units. Η αντίδρασή μας έχει σταθερό όγκο 3 mL ή 0,003 L. Τα units εκφράζονται σε micromoles προϊόντος ανά λεπτό. Χρησιμοποιώντας το νόμο του Beer στη μορφή

$$C = A/E \cdot l$$

και με διαδοχικές τροποποιήσεις παίρνουμε:

$$\text{Units} = \frac{(\Delta \text{absorbance} / \Delta \text{min}) \times 10^6 \mu\text{M} \times 0,003 \text{L}}{3600 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} (\text{cm}) \quad \text{M}} = \mu\text{mol/min}$$

Ταχύτητα ενζυμικών αντιδράσεων

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων είναι ουσιαστικά η μελέτη της ταχύτητας μιας συγκεκριμένης αντίδρασης και πώς αυτή επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του ενζύμου, των υποστρωμάτων και τυχόν παρεμποδιστών ή ενεργοποιητών. Η ταχύτητα της αντίδρασης εκφράζεται ως μεταβολή της συγκέντρωσης των αντιδρώντων ή των προϊόντων σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Συγκεκριμένα, αν έχουμε την αντίδραση



η ταχύτητά της μπορεί να εκφραστεί είτε σε συνάρτηση με την εμφάνιση του προϊόντος P, ή σε συνάρτηση με την εξαφάνιση των αντιδρώντων A ή B. Με άλλα λόγια,

$$\text{ταχύτητα} = \Delta [P] / \Delta t = -\Delta [A] / \Delta t = -\Delta [B] / \Delta t$$

Σύμφωνα με μια διαφορετική διατύπωση, η ταχύτητα της αντίδρασης σε μια δεδομένη στιγμή είναι ανάλογη με το γινόμενο των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων, υψωμένων στην κατάλληλα δύναμη:

$$\text{Ταχύτητα} \propto [A]^a [B]^b \quad \text{ή} \quad V = k[A]^a [B]^b$$

όπου k είναι η σταθερά ταχύτητας και a, b σταθερές που προσδιορίζονται πειραματικά.

Τάξη των αντιδράσεων

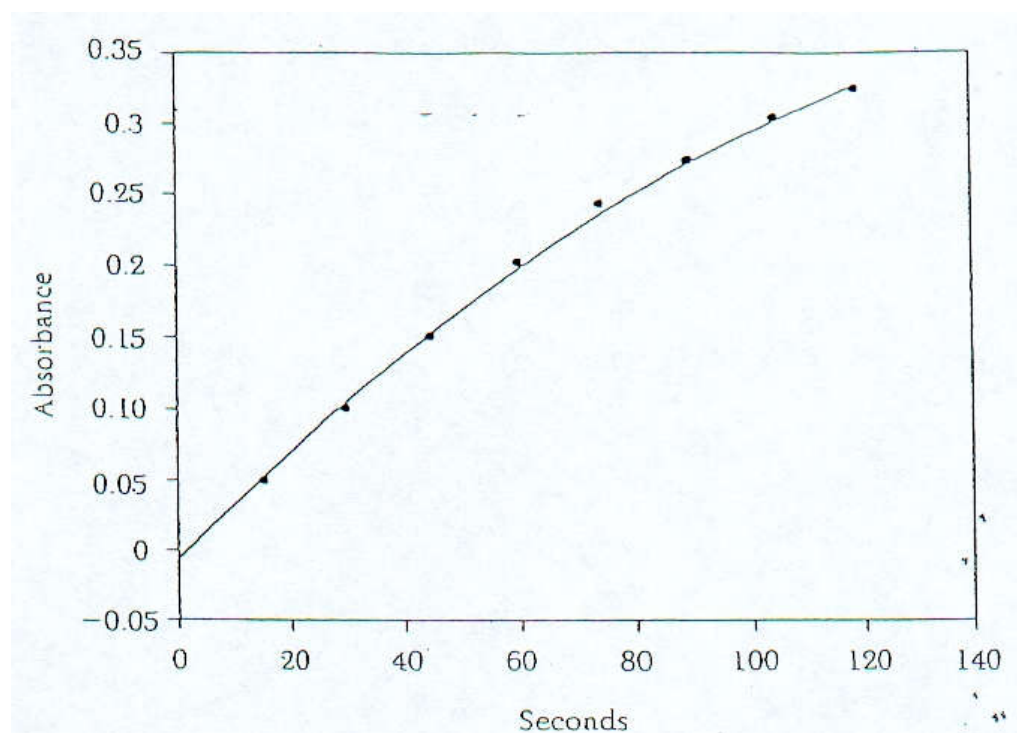
Οι εκθέτες στην εξίσωση της ταχύτητας είναι συνήθως μικροί, ακέραιοι αριθμοί όπως 0, 1 ή 2. Οι τιμές αυτές εξαρτώνται από τον αριθμό των μορίων των αντιδρώντων και

των προϊόντων. Συνήθως προκύπτουν κατευθείαν από την εξίσωση, κάποιες φορές όμως είναι περίπλοκος ο υπολογισμός τους.

Εάν μια αντίδραση έχει την παρακάτω εξίσωση



τότε η ταχύτητα $U = k[A]^1[B]^1$ θεωρείται πρώτης τάξης όσον αφορά το αντιδρών A, καθώς επίσης και ως προς το αντιδρών B αλλά δευτέρας τάξης όσον αφορά το σύνολό της. Η αντίδραση θα προχωρήσει γρηγορότερα εάν αυξηθεί η συγκέντρωση του A ή/και του B.

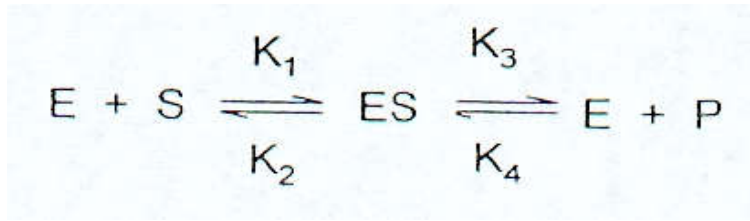


ΕΙΚΟΝΑ 1. Απορρόφηση προς χρόνο για ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις

III. ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ Michaelis-Menten

Το πιο συχνά απαντώμενο μοντέλο βάσει του οποίου πραγματοποιούνται οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις προτάθηκε το 1913 από τους Michaelis και Menten. Παρόλο που πολλά στοιχεία του έχουν τροποποιηθεί από τότε, εξακολουθεί να εφαρμόζεται για όλα τα μη αλλοστερικά ένζυμα.

Οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου ES, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:



όπου E = ελεύθερο ένζυμο

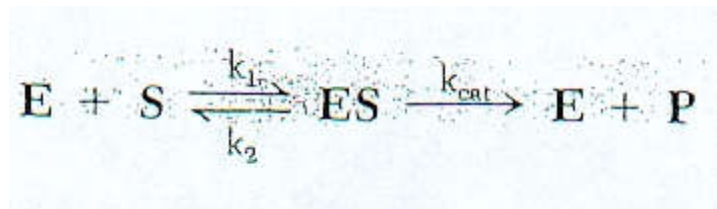
S = ελεύθερο υποστρώμα

ES = σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P = προϊόν

K_n = σταθερές ταχύτητας

Συνήθως, τα πειράματα πραγματοποιούνται σε μικρά χρονικά διαστήματα ώστε να αποφεύγεται συσσώρευση του προϊόντος P και πρακτικά να μην πραγματοποιείται η αντίστροφη αντίδραση, k_4 . Έτσι, η αντίδραση γράφεται:

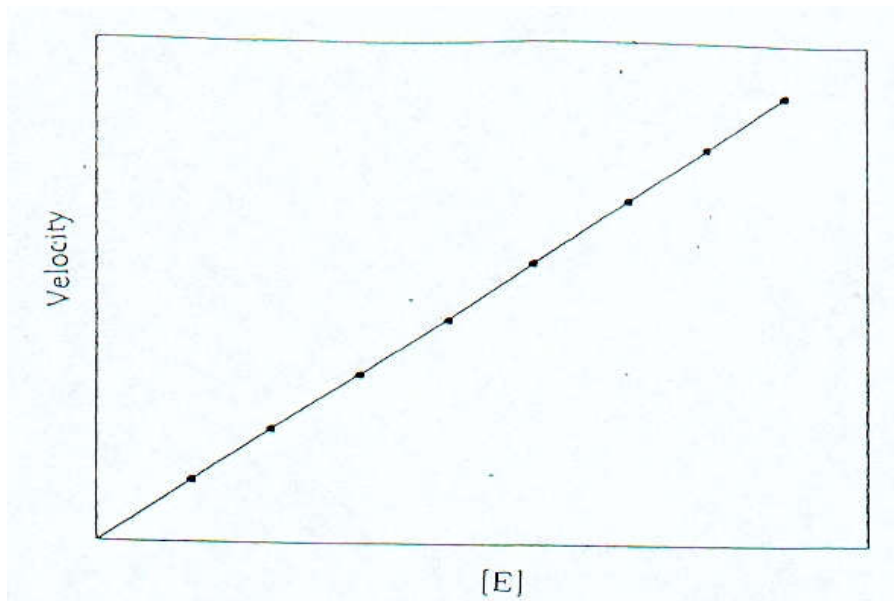


όπου k_{cat} είναι η καταλυτική σταθερά ταχύτητας για τη διάσπαση σε προϊόντα.

Η ταχύτητα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος, αλλά οι σχέσεις δεν είναι ίδιες για τους δύο αυτούς παράγοντες. Εάν κατασκευάσουμε το διάγραμμα της ταχύτητας, v , προς την συγκέντρωση του ενζύμου [E] τότε παίρνουμε την καμπύλη που φαίνεται στην Εικόνα 2. Πρόκειται για μια ευθεία γραμμή. Αυτό είναι σημαντικό όταν πρόκειται να μελετήσουμε πειραματικά την κινητική ενός ενζύμου. **Οποιαδήποτε αλλαγή στην ποσότητα του ενζύμου θα μεταβάλλει ανάλογα και την ταχύτητα την οποία μετράμε. Επομένως, πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί με τη χρήση της πιπέτας όταν προσθέτουμε το ένζυμο στην αντίδραση.**

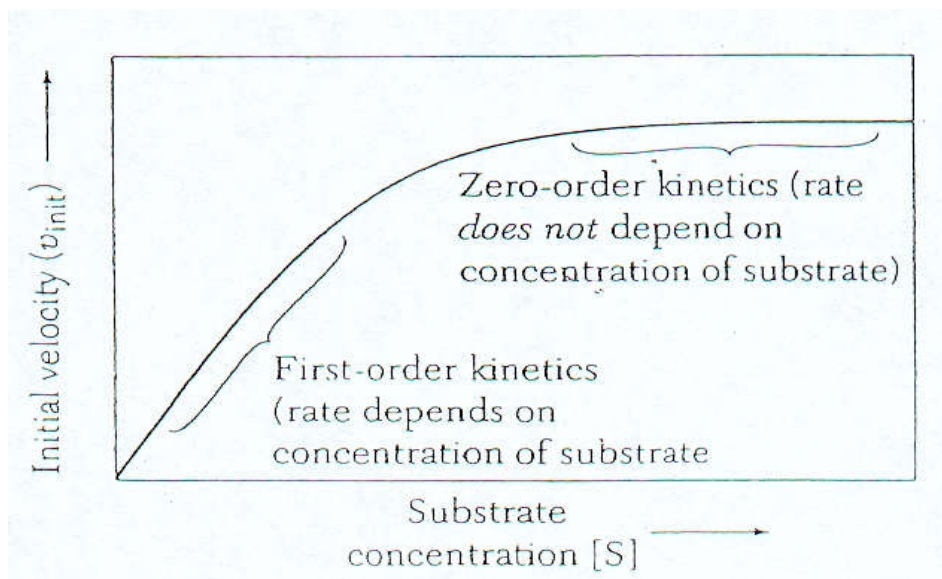
Αν τώρα κάνουμε το διάγραμμα v προς [S], παίρνουμε μια διαφορετική καμπύλη (Εικόνα 3). Παρόλο που υπάρχει εξάρτηση μεταξύ ταχύτητας και ποσότητας υποστρώματος η καμπύλη δεν είναι ευθεία. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η εξάρτηση είναι γραμμική και η εξίσωση της ταχύτητας είναι

πρώτης τάξης όσον αφορά το S. Στη συνέχεια, η καμπύλη γίνεται υπερβολή. Επομένως, σε υψηλές [S], η ταχύτητα είναι ανεξάρτητη από την ποσότητα του υποστρώματος που έχουμε προσθέσει στην αντίδραση.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Ταχύτητα αντίδρασης προς συγκέντρωση ενζύμου

Η τιμή της v (αξονας y) από την οποία διέρχεται η ευθεία που προσεγγίζει το πλατώ της υπερβολής αντιστοιχεί σ' αυτό που ονομάζουμε V_{max} . Πρόκειται για τη θεωρητική μέγιστη ταχύτητα, η οποία αντιστοιχεί σε άπειρη [S]. Συμπερασματικά, σε υψηλή [S], η ταχύτητα αυξάνεται λιγότερο με κάθε αύξηση του S.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Ταχύτητα προς υπόστρωμα για το μοντέλο Michaelis-Menten

Οι παραπάνω κινητικές ιδιότητες εκφράζονται με την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Όπου:

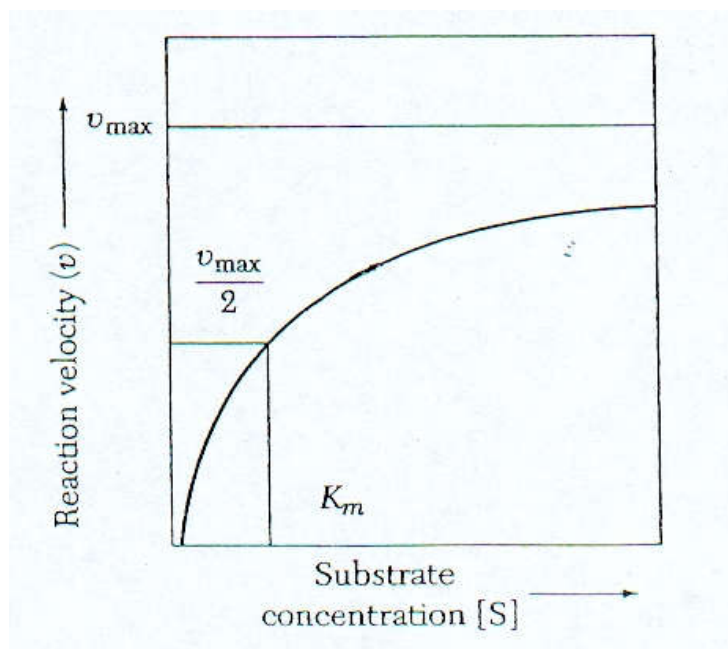
v = αρχική ταχύτητα

V_{\max} = μέγιστη ταχύτητα

$[S]$ = συγκέντρωση υποστρώματος

K_m = σταθερά Michaelis = $(k_2 + k_{\text{cat}})/k_1$

Η v είναι η αρχική ταχύτητα και πρέπει να μετρηθεί στην αρχή της αντίδρασης πριν αρχίσει να συσσωρεύεται το προϊόν. Η V_{\max} είναι η ταχύτητα που μετράμε όταν όλα τα ενεργά κέντρα του ενζύμου έχουν καταληφθεί από το υπόστρωμα. Αυτό είναι θεωρητικό και ποτέ δε συμβαίνει στην πραγματικότητα. Πάντα θα υπάρχει μια ποσότητα ελεύθερου ενζύμου στην αντίδραση. Η σταθερά Michaelis, K_m , είναι αριθμητικά ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος που δίνει ταχύτητα αντίδρασης ίση με το μισό της μέγιστης (Εικόνα 4). Υπολογίζοντας πειραματικά το V_{\max} , βρίσκουμε το $V_{\max}/2$ και από την καμπύλη βρίσκουμε σε ποιο $[S]$ αντιστοιχεί. Αυτό είναι το K_m .



ΕΙΚΟΝΑ 4. Διάγραμμα Michaelis-Menten

Οι V_{\max} και K_m συχνά αναφέρονται ως σταθερές και είναι τα πρώτα δυο στοιχεία που μελετάμε σε μια ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση. Πρέπει να τονιστεί όμως, ότι στην περίπτωση της μέγιστης ταχύτητας δεν έχουμε να κάνουμε με σταθερά. Η τιμή της εξαρτάται από την συνολική $[E]$, οπότε μπορεί να θεωρηθεί σταθερά μόνο για το συγκεκριμένο πείραμα. Η K_m είναι σταθερά τουλάχιστον κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες pH, ιονικής ισχύος κ.τ.λ. Εάν στο πείραμά μας αυξήσουμε την $[E]$ η ταχύτητα θα αυξηθεί σε οποιαδήποτε $[S]$, αλλά η τιμή της $[S]$ που δίνει το V_{\max} δεν θα αλλάξει.

Σημασία των σταθερών K_m , V_{\max}

Η σταθερά K_m είναι σημαντική για αρκετούς λόγους. Καταρχήν προσδιορίζει την $[S]$ που απαιτείται ώστε $v = V_{\max}/2$. Αυτό, εκ πρώτης όψεως, μπορεί να μη φαίνεται σπουδαίο, μας επιτρέπει όμως καλύτερο σχεδιασμό των πειραμάτων μας. Εάν θέλουμε να ελέγξουμε την επίδραση του $[S]$ στην v , τότε θα επιλέξουμε μια συγκέντρωση του S κοντά στην K_m , έτσι ώστε μια μικρή αλλαγή να επηρεάσει την ταχύτητα (βλ. Εικόνα 3 ή 4).

Εάν τώρα θέλουμε να μετρήσουμε την ποσότητα του ενζύμου στο σύστημα, τότε η $[E]$ πρέπει να είναι η μόνη μεταβλητή που επηρεάζει την ταχύτητα. Επιλέγουμε επομένως μια $[S]$ αρκετά υψηλή, 5 ή 10 φορές υψηλότερη από την τιμή της K_m , ώστε να μην υπάρχει καμιά επίδραση της $[S]$ στην v .

Επιπλέον η K_m μας δίνει μια ιδέα για τη συγγένεια μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος. Ουσιαστικά πρόκειται για την ταχύτητα αποικοδόμησης του ES διαιρεμένη με την ταχύτητα σχηματισμού του ES :

$$K_m = (k_2 + k_{cat})/k_1$$

Συχνά, η σταθερά κατάλυσης k_{cat} είναι σημαντικά μικρότερη από τις σταθερές ταχύτητας σχηματισμού και αποικοδόμησης k_1 και k_2 . Κάτω από τις συνθήκες αυτές η K_m ταυτίζεται με την K_s που είναι η σταθερά διάσπασης, οπότε χαμηλή τιμή K_m σημαίνει ότι το σύμπλοκο ES σχηματίζεται με μεγάλη ταχύτητα. Αρκετά συχνά τα ένζυμα έχουν παραπάνω από ένα διαφορετικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα με το χαμηλότερο K_m θα προσδεθεί ταχύτερα στο ένζυμο σε σχέση με κάποιο που θα έχει υψηλότερο K_m .

Σε ένα μικροβιολογικό εργαστήριο, αίμα ή άλλα δείγματα συχνά ελέγχονται για διάφορα ένζυμα. Μερικές φορές μετράται το συνολικό επίπεδο του ενζύμου, όπου ασυνήθιστη αύξηση ή ελάττωση φανερώνει ύπαρξη ασθένειας. Άλλες φορές ελέγχεται το K_m επειδή ένα αλλαγμένο K_m φανερώνει ένα κατεστραμμένο ένζυμο ή μια διαφορετική μορφή του ενζύμου που δεν θα έπρεπε να βρίσκεται εκεί.

Η V_{max} είναι επίσης σημαντική, παρόλο που δεν είναι σταθερά. Ο βασικός νόμος της ταχύτητας έχει ως εξής:

$$v = k_{cat}[ES]$$

Η σταθερά, k_{cat} , είναι η σταθερά κατάλυσης, οπότε από την παραπάνω σχέση προκύπτει ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα πρέπει να βρίσκονται στην μορφή ES για να αντιδράσουν. Όπως αναφέρθηκε πριν, η θεωρητική V_{max} προκύπτει όταν όλο το ένζυμο βρίσκεται στη μορφή ES, οπότε

$$V_{max} = k_{cat}[E_{tot}]$$

όπου E_{tot} = συνολική ποσότητα του ενζύμου.

Με αναδιάταξη της παραπάνω σχέσης παίρνουμε

$$k_{cat} = V_{max}/[E_{tot}]$$

Μετρώντας την V_{max} και την ολική συγκέντρωση του ενζύμου μπορούμε να υπολογίσουμε την k_{cat} . Η σταθερά αυτή ονομάζεται επίσης **αριθμός μετατροπής** και υποδηλώνει τον αριθμό των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στη μονάδα του χρόνου, από ένα μόριο ενζύμου όταν αυτό είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Πρόκειται επομένως, για στοιχείο αξιολόγησης της ταχύτητας και της αποτελεσματικότητας του ενζύμου.

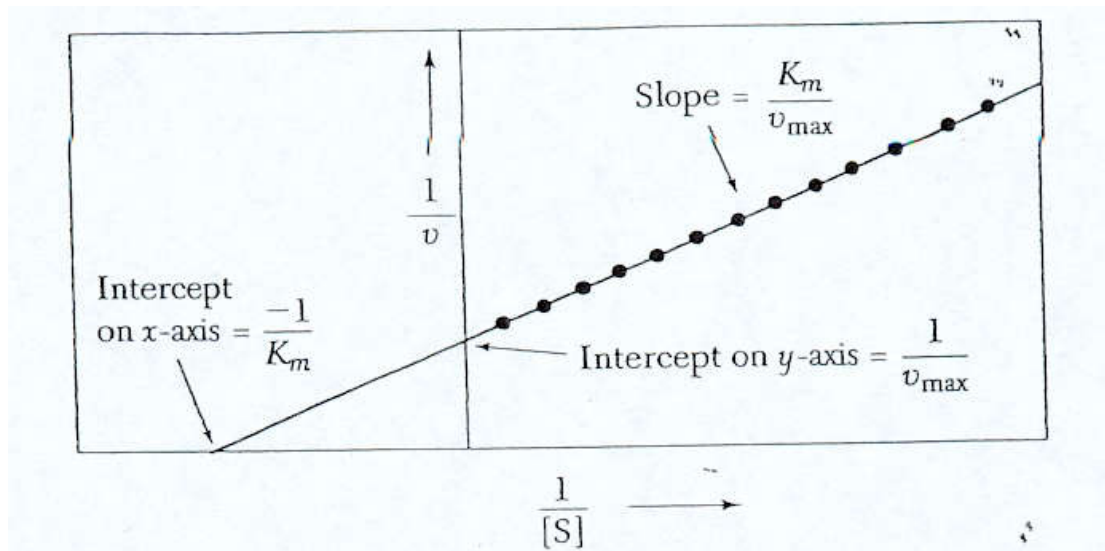
IV. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Lineweaver-Burk

Μπορούμε να υπολογίσουμε τις K_m και V_{max} από διαγράμματα όπως αυτό της Εικόνας 4 αλλά υπάρχουν πρακτικά προβλήματα. Πρώτον, επειδή το v στην πραγματικότητα ποτέ δε φτάνει το V_{max} , δε μπορούμε στ' αλήθεια να το μετρήσουμε. Δεύτερον, επειδή ο ορισμός του K_m ως $V_{max}/2$ είναι επίσης εσφαλμένος. Γι' αυτό το λόγο η εξίσωση Michaelis-Menten έχει μετατραπεί σε διάφορες μορφές των οποίων η

γραφική παράσταση είναι ευθεία γραμμή. Η πιο γνωστή από αυτές είναι η σχέση Lineweaver-Burk

$$1/v = K_m/V_{\max}[S] + 1/V_{\max}$$

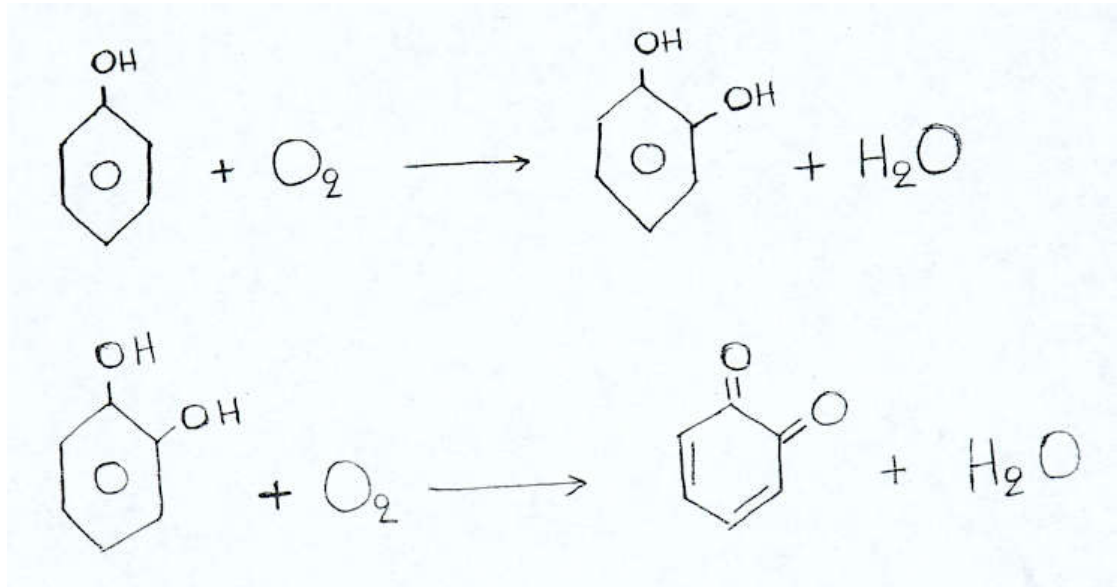
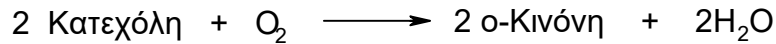
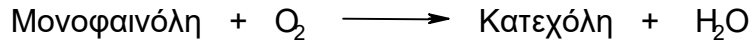
το διάγραμμα της οποίας φαίνεται στην εικόνα 5:



ΕΙΚΟΝΑ 5. Διάγραμμα Lineweaver-Burk

V. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

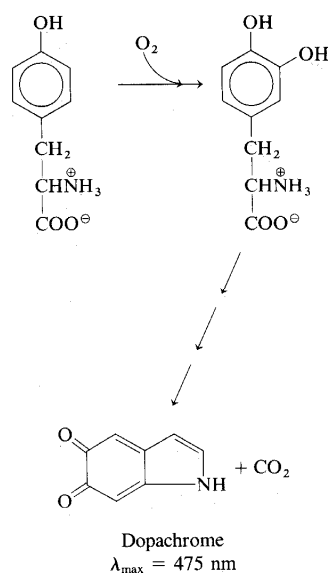
Η τυροσινάση έχει δύο καταλυτικές δράσεις : την ο-υδροξυλίωση των μονοφαινολών και την αεροβική οξείδωση των ο-διφαινολών.



Η τυροσινάση, ή οξειδάση των πολυφαινολών βρίσκεται στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Η βιολογική δράση της στα κύτταρα των φυτών δεν είναι γνωστή, αλλά η παρουσία της γίνεται εύκολα αντιληπτή με το ‘μαύρισμα’ των ξεφλουδισμένων πατατών και των χτυπημένων φρούτων. Στα ζωικά κύτταρα καταλύει (σε δυο στάδια), τη σύνθεση της μελανίνης (χρωστική) από την τυροσίνη. Εντοπίζεται στο δέρμα και ενεργοποιείται από την ηλιακή ακτινοβολία (UV) και εμείς αντιλαμβανόμαστε την όλη διαδικασία ως «μαύρισμα» του δέρματός μας.

Η τυροσινάση από μανιτάρια είναι ένα τετραμερές με μοριακό βάρος 128 kDa που περιέχει τέσσερα άτομα Cu⁺. Στο ένζυμο υπάρχουν δύο τύποι θέσεων δέσμησης, ένας για το φαινολικό υπόστρωμα και ένας για το μόριο του οξυγόνου. Το άτομο του χαλκού συσχετίζεται με τη θέση δέσμησης του οξυγόνου. Έτσι ενώσεις οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα με τον χαλκό είναι αναστολείς της τυροσινάσης. Οι αναστολείς αζίδιο, κυάνιο, φαινυλθειουρία και κυστεΐνη συναγωνίζονται με το οξυγόνο για τη θέση δέσμησης. Επίσης μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις

συναγωνίζονται με τις φαινόλες και τις κατεχόλες για την δέσμευση και την οξείδωση. Ένα από τα φυσικά υποστρώματα της τυροσινάσης είναι η 3,4 - διυδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA). Για τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου θα χρησιμοποιηθεί η παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 6) και θα αξιοποιηθεί το ότι το προϊόν, dopachrome, απορροφά στα 475nm.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Οξείδωση της τυροσίνης και της dopa από την τυροσινάση

Αξίζει τον κόπο τελικά:

Για να κατανοήσουμε τη φύση του μεταβολισμού, πρέπει πρώτα να κατανοήσουμε τη φύση των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις του. Όπως προαναφέρθηκε, η κινητική των ενζύμων είναι η μελέτη των ταχυτήτων των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Μελετώντας πώς επηρεάζεται η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης από αλλαγές στη συγκέντρωση παραγόντων όπως το ένζυμο, το/τα υποστρώμα/τα, οι παρεμποδιστές και οι ενεργοποιητές, μπορούμε να κατανοήσουμε τη φύση της αντίδρασης. Για παράδειγμα, αν δούμε τα K_m για δυο ένζυμα (εξωκινάση και γλυκοκινάση) που καταλύουν το σχηματισμό της 6-φωσφορικής γλυκόζης από γλυκόζη, μπορούμε να καταλήξουμε σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, το K_m για την αντίδραση με εξωκινάση είναι 0,15mM ενώ για την αντίδραση με γλυκοκινάση είναι 20mM. Η γλυκοκινάση βρίσκεται μόνο στο συκώτι, αλλά σχεδόν όλα τα είδη κυττάρων διαθέτουν εξωκινάση. Τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι 5mM, έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι δεν υπάρχει θέμα αδυναμίας

επεξεργασίας υποστρώματος για την εξωκίνηση. Η γλυκοκίνηση επομένως θα έπρεπε να δράσει μόνο αν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι ιδιαίτερα αυξημένα, όπως π.χ. μετά από ένα γεύμα υπερβολικά πλούσιο σε υδατάνθρακες. Με άλλα λόγια, όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι χαμηλά, υπάρχει καλύτερη απορρόφησή της από τους ιστούς. Αντίθετα, όταν είναι υψηλά, το συκώτι καλείται να διαθέσει τη γλυκοκίνηση «του» για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

Πείραμα 4^ο: Κινητική μελέτη ενός ενζύμου-Τυροσινάση

Σχεδιασμός του πειράματος για την κινητική μελέτη της τυροσινάσης

Στο πείραμα αυτό θα εξεταστούν τα κινητικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης από μανιτάρι. Οι συγκεντρώσεις ενζύμου και υποστρώματος θα διαφοροποιηθούν ώστε να διαπιστωθεί η διαφορετική επίδραση που έχουν στην ταχύτητα της αντίδρασης. Επίσης θα μετρηθούν οι κινητικές παράμετροι K_m , V_{max} και k_{cat} .

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για τον υπολογισμό της ενεργότητας της τυροσινάσης. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν χρήση ηλεκτροδίων οξυγόνου, παρακολούθηση της οξείδωσης της τυροσίνης στα 280nm, και της dopa στα 475nm. Η πιο εύκολα εφαρμοζόμενη μέθοδος απαιτεί την παρακολούθηση της οξείδωσης της dopa από το ένζυμο της τυροσινάσης καταγράφοντας τον αρχικό ρυθμό σχηματισμού του dopachrome στα 475nm.

Στην αντίδραση που καταλύει η τυροσινάση είναι απαραίτητη η συμμετοχή δύο υποστρωμάτων, το φαινολικό υπόστρωμα (dopa) και το μοριακό οξυγόνο. Οι συνθήκες που περιγράφονται στο πείραμα αυτό είναι τέτοιες, ώστε το μείγμα της αντίδρασης να είναι κορεσμένο σε διαλυτοποιημένο οξυγόνο. Με τον τρόπο αυτό όταν πραγματοποιούνται μετρήσεις που αφορούν το K_m , μόνο η συγκέντρωση της dopa επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης.

Η μέθοδος που περιλαμβάνει παρακολούθηση του dopachrome είναι ιδιαίτερα εύχρηστη, εφόσον μπορεί να εφαρμοστεί στις περισσότερες μετρήσεις που αφορούν την τυροσινάση. Μελέτες που δεν περιγράφονται εδώ, αλλά είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες, περιλαμβάνουν πειράματα εξέτασης του βέλτιστου pH, μελέτες παρεμπόδισης, και σχηματισμό αποενζύμου μέσω διαπίδυσης και ανασύστασης.

Οι χρόνοι που απαιτούνται για το πείραμα είναι:

Μέρος Α: Υπολογισμός της συγκέντρωσης της τυροσινάσης – 15 λεπτά

Μέρος Β: Υπολογισμός της συγκέντρωσης της τυροσινάσης που θα χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις κινητικής – 1 ώρα

Μέρος Γ: Υπολογισμός K_M - 2 ώρες

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού Na, 0,1M, pH = 7,0

- Τυροσινάση από μανιτάρια 100 units/ml

(1 unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία προκαλεί αλλαγή στην απορρόφηση A_{280} κατά 0,001, όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η τυροσίνη. Παρασκευάστε ένα διάλυμα της τυροσινάσης στο διάλυμα των φωσφορικών. Η απορρόφηση A_{280} πρέπει να είναι περίπου 0,2. Διατηρείτε το διάλυμα αυτό στον πάγο κατά τη διάρκεια του πειράματος).

- L – Dopa 2mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

- Φασματοφωτόμετρο ορατού και κυψελίδες 3-4ml

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Υπολογισμός της συγκέντρωσης της τυροσινάσης

Η μέτρηση της ενεργότητας ενός ενζύμου απαιτεί την γνώση της ακριβούς συγκέντρωσης του ενζύμου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος της τυροσινάσης πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Επιλέγεται ως μήκος κύματος τα 280nm και μεταφέρονται 3ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος σε κυψελίδα quartz.

(Μετά το άνοιγμα του φασματοφωτόμετρου και της λάμπας υπεριώδους απαιτούνται 15 λεπτά για την προθέρμανση της λάμπας).

2. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και μηδενίζεται η απορρόφηση. Αφού στεγνώσει η κυψελίδα μεταφέρεται σε αυτή η αντίστοιχη ποσότητα 3ml του διαλύματος της τυροσινάσης (που έχετε παρασκευάσει σε διάλυμα φωσφορικών).

3. Καταγράψτε την απορρόφηση στα 280nm. Για το συγκεκριμένο σύστημα, ο στόχος σας είναι το αρχικό διάλυμα ενζύμου να έχει A_{280} περίπου 0,2. Υπολογίστε τη συγκέντρωση του ενζύμου.

B. Προσδιορισμός της ποσότητας της τυροσινάσης για τις μετρήσεις κινητικής

Μηδενισμός φασματοφωτομέτρου:

- Μεταφέρουμε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και L-dopa σε γυάλινη κυψελίδα σύμφωνα με τα ποσά που αναγράφονται στον Πίνακα 2 (1^η στήλη).

- Ανακατεύουμε αναποδογυρίζοντας την κυψελίδα αφού την καλύψουμε με parafilm, και την τοποθετούμε στο φασματοφωτόμετρο.

- Καταγράφεται η απορρόφηση στα 475nm κάθε 30 δευτερόλεπτα. Προφανώς οι τιμές πρέπει να είναι κοντά στο μηδέν για το χρονικό διάστημα των τριών λεπτών. Αν ισχύει αυτό δεν επαναλαμβάνουμε το μηδενισμό στο στάδιο αυτό.

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο μέρος αυτό, εκτός της τυροσινάσης, πρέπει να παραμένουν σε σταθερή θερμοκρασία η οποία να βρίσκεται ανάμεσα στους 25-30 °C. Το διάλυμα της τυροσινάσης πρέπει να βρίσκεται συνεχώς σε παγόλυτρο. Το μήκος κύματος του φασματοφωτόμετρου επιλέγεται στα 475nm.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να βρεθεί η σωστή συγκέντρωση ενζύμου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στις μετρήσεις κινητικής. Εάν χρησιμοποιηθεί πολύ μικρή συγκέντρωση, η συνολική απορρόφηση στην χρονική περίοδο της αντίδρασης θα είναι τόσο μικρή που δεν θα μπορούν να ανιχνευτούν διαφοροποιήσεις λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή λόγω της επίδρασης παρεμποδιστών. Από την άλλη πλευρά, αν χρησιμοποιηθεί πολύ μεγάλη συγκέντρωση ενζύμου, η αντίδραση θα ολοκληρωθεί πολύ γρήγορα και το υπόστρωμα θα καταναλωθεί αμέσως. Το καλύτερο είναι να υπάρχει μια κατάσταση ενδιάμεσα στα προαναφερθέντα άκρα. **Για το σκοπό αυτό επιλέγουμε τη συγκέντρωση του ενζύμου που δίνει ταχύτητα, με κορεσμένη ποσότητα L-dopa, από 0,10 ως 0,15 ΔΑ/min.**

Ο στόχος επομένως είναι να σχεδιάσουμε ένα πρωτόκολλο που θα μας επιτρέψει να καθορίσουμε την κατάλληλη ποσότητα τυροσινάσης σύμφωνα με τις παραπάνω προϋποθέσεις. Κάθε αντίδραση έχει συνολικό όγκο 3ml και η σύστασή της σε L-DOPA είναι 2mg/ml ενώ η ποσότητα του ενζύμου αυξάνεται σε κάθε αντίδραση. Παρασκευάστε τουλάχιστον 4 αντιδράσεις προσθέτοντας από 0,1 έως 0,4ml τυροσινάσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ποσότητες στον παρακάτω πίνακα είναι ενδεικτικές. Πιθανόν να πρέπει να χρησιμοποιήσετε ποσότητες ενζύμου διαφορετικές από αυτές που προτείνονται για να μετρήσετε ταχύτητα από **0,10 ως 0,15 ΔΑ/min.**

(Ίσως είναι προφανές αλλά ας το αναφέρουμε. Μετράμε κινητική σε ενζυμικές αντιδράσεις άρα οποιοδήποτε λάθος στις ποσότητες που προσθέτουμε στις αντιδράσεις είναι ολέθριο για τις μετρήσεις μας. Χρησιμοποιούμε αναλυτικό ζυγό για τη ζύγιση του υποστρώματος και πιπέτες ακριβείας για την παρασκευή των αντιδράσεων).

- Παρασκευάζουμε κάθε αντίδραση τοποθετώντας τις ανάλογες ποσότητες ρυθμιστικού και L-DOPA απευθείας μέσα στην κυψελίδα.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε την ανάλογη ποσότητα ενζύμου και αναμειγνύουμε αναποδογυρίζοντας 1-2 φορές την κυψελίδα.
- Αμέσως τοποθετούμε στο φασματοφωτόμετρο και καταγράφουμε την απορρόφηση, κάθε 30 δευτερόλεπτα και για 3 λεπτά.
- Ελέγχουμε αν η πορεία της αντίδρασης είναι γραμμική και στα 3 λεπτά.
- Σχεδιάζουμε ένα διάγραμμα της απορρόφησης στα 475nm ως προς τον χρόνο.
- Υπολογίζουμε το $\Delta A/\text{min}$ στην περίοδο που παρουσιάζεται γραμμικότητα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. (ποσά σε ml)

Συστατικά	1	2	3	4	5
Ρυθμιστικό φωσφορικών	1,45	1,40	1,30	1,20	1,10
L-DOPA	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Τυροσινάση	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40

Γ. Υπολογισμός K_m για την L-dopa

Εφόσον υπολογίσαμε τη σωστή ποσότητα/συγκέντρωση τυροσινάσης στο προηγούμενο μέρος της άσκησης, μπορούμε τώρα να πραγματοποιήσουμε τις μετρήσεις κινητικής. Η συγκέντρωση της L-dopa που χρησιμοποιήθηκε στο μέρος Β ήταν αρκετή για να προκαλέσει κορεσμό των θέσεων δέσμευσης στα ενεργά κέντρα της τυροσινάσης, και συνεπώς η ταχύτητα της αντίδρασης περιοριζόταν μόνο από την συγκέντρωση της τυροσινάσης. Στο μέρος Γ η συγκέντρωση της L-dopa θα κυμανθεί σε επίπεδα που δεν επιτυγχάνεται κορεσμός.

- Προετοιμάζουμε ένα πίνακα για έξι μετρήσεις, ομοίως με τον πίνακα του μέρους Β, διαφοροποιώντας τη συγκέντρωση της L-dopa. Ο συνολικός όγκος για κάθε μέτρηση πρέπει να είναι 3 ml. Εφόσον λοιπόν η ποσότητα του ενζύμου που προστίθεται είναι σταθερή θα διαφοροποιείται μόνο ο όγκος του διαλύματος της L-dopa και του ρυθμιστικού διαλύματος. Οι ποσότητες διαλύματος L-dopa που προτείνεται να χρησιμοποιηθούν είναι 0,10, 0,20, 0,40, 0,80, 1,0 και 1,5 ml. Η διαδικασία που πρέπει να ακολουθηθεί είναι όμοια με αυτή στο μέρος Β. Αρχικά πρέπει να μετρηθεί η

«μηδενική ταχύτητα» (δηλαδή πρέπει να μηδενίσετε ξανά το φασματοφωτόμετρο. Ποιο θα είναι το τυφλό σας διάλυμα;) Η προσθήκη του υποστρώματος πραγματοποιείται τελευταία αυτή τη φορά. Εάν με τις συγκεντρώσεις της L-dopa που χρησιμοποιείτε δεν επιτευχθεί κορεσμός, αυξάνεται η ποσότητα.

- Από την κλίση κάθε μέτρησης υπολογίζουμε την αντίστοιχη $\Delta A/\text{min}$ για κάθε τιμή συγκέντρωσης L-dopa.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η βιβλιογραφία από το πείραμα 3 των εργαστηρίων βιοχημείας και επιπλέον:

I. Behbahani, S. Miller, and D. O' Keffe, **Microchem. J.** 47, 251-260 (1993). "A Comparison of Mushroom Tyrosinase Dopachrome to Dopachrome Assays."

R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp. 142-173. An introduction to enzymes and kinetics.

J. Busch, **Biochem. Educ.** 27, 171-173 (1999). "Enzyme Browning in Tomatoes".
R. Dean, **The American Biology Teacher**, 61(7), 523-527 (1999). "A Commentary on Experiments with Tyrosinase."

H. Duckworth and J. Coleman, **J. Biol. Chem.** 245, 1613-1625 (1970). Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase..

R. Garrett and C. Grisham, **Biochemistry**, 2nd ed. (1999), W. B. Saunders (Orlando, FL), pp. 426-459. Introduction to enzyme kinetics.

D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, **Fundamentals of Biochemistry**, (1999), John Wiley & Sons (New York), pp. 281-347. Enzymes and Kinetics.

C. Whiteley, **Biochem. Educ.** 25, 144-146 (1997). Enzyme Kinetics.
W. Wood et al., **Biochemistry, A Problems Approach**, 2nd ed. (1981), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 144-172. Enzyme kinetics with an introduction to the direct linear plot.

C. Worthington, Editor, **Worthington Enzyme Manual** (1998), Worthington Biochemical Corporation (Freehold, N), pp. 288-291. Properties and analysis of tyrosinase. <http://www.worthingtonbiochem.com/manual/P/TY.html>