

Određivanje Mihaelisove konstante i maksimalne brzine reakcije enzima peroksidaze iz rena u reakciji sa ABTS-om

U radu su određivani kinetički parametri Mihaelisova konstanta (K_m) i maksimalna brzina reakcije (v_{max}) enzima peroksidaze iz rena, koja katalizuje reakciju oksidacije prvog supstrata – ABTS-a, pomoću drugog supstrata – H_2O_2 . Proizvod ove reakcije je obojen i njegova koncentracija se može spektrofotometrijski odrediti. Na osnovu dobijenih vrednosti koncentracije oksidovanog ABTS-a i dalje obrade podataka izračunate su vrednosti kinetičkih parametara. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se reakcija odvija po ping-pong mehanizmu za bisupstrate reakcije. U pokušajima inhibicije azidnim jonom praćena je promena vrednosti K_m i v_{max} , ali nije dobijena tačna koncentracija koja dovodi do potpune inhibicije. Primećeno je da je inhibicija azidom kompetitivnog tipa, što je u saglasnosti sa sličnim rezultatima dobijenim u drugim radovima.

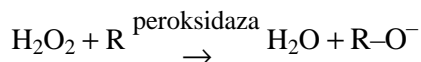
Uvod

Enzimi su makromolekuli koji se na osnovu strukture dele na proste i složene. Prosti enzimi se sastoje od jednog ili više polipeptidnih lanaca, dok složeni enzimi pored proteinskog dela sadrže i prostetične grupe ili kofaktore koji su neophodni za njihovu funkciju. Funkcija enzima je da katalizuju brojne biohemijske transformacije koje bi se u normalnim uslovima odvijale veoma sporo ili se uopšte ne bi odvijale. Reaktanti u enzimskim reakcijama nazivaju se supstratima. Enzim može imati i više od jednog supstrata.

Peroksidaza iz rena je složeni enzim koji pored proteinskog dela sadrži i prostetičnu grupu. Prostetična grupa peroksidaze je hem, porfirinski prsten koji sadrži Fe^{2+} jon. Funkcija peroksidaze jeste regulacija metabolizma toksičnog vodonik-peroksida (H_2O_2), odnosno njegovo uklanjanje. Nastanak vodonik-peroksida je posledica aerobnog načina života. Peroksidaza katalizuje reakciju pretvaranja vodonik peroksida u vodu, a jedan od atoma kiseonika iz H_2O_2 se koristi za oksidaciju nekog organskog jedinjenja koje služi kao drugi supstrat. Na mestu drugog supstrata se mogu naći razni vitamini, fenoli, amini, itd. (Kay *et al.* 1967)

*Voin Petrović (1985),
Beograd, Bulevar
AVNOJ-a 217/15,
učenik 4. razreda IX
beogradske gimnazije*

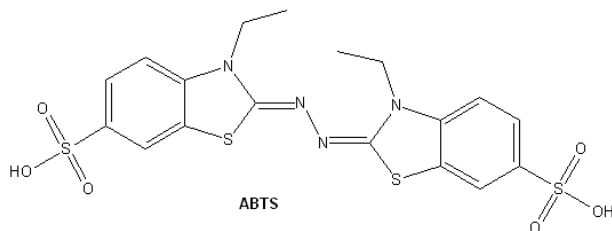
MENTOR:
*Natalija Polović,
Hemijski fakultet
Beograd*



Iz ovoga sledi da je reakcija koju peroksidaza katalizuje bisupstratnog tipa (ibid.).

Poznata su dva mehanizma bisupstratnih reakcija – sekvencijalni i ping-pong mehanizam. U sekvencijalnom mehanizmu oba supstrata moraju da se vežu za enzim pre početka reakcije. Po vezivanju oba supstrata enzim katalizuje simultanu transformaciju supstrata u proizvode reakcije. Kod ping-pong mehanizma za enzim se prvo vezuje prvi supstrat, enzim vrši njegovu promenu u prvi proizvod, u toku čega i sam enzim biva promenjen. Tek po oslobađanju prvog proizvoda, promenjeni enzim vezuje drugi supstat. Posle transformacije, oslobađa se drugi proizvod, a enzim se vraća u prvobitno stanje (Voet i Voet 2002).

Jedinjenje koje može poslužiti peroksidazi kao drugi supstrat je ABTS (skraćenica od 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sulfonska kiselina)) (slika 1). ABTS se u toku reakcije oksiduje dajući zeleno obojeni proizvod, tako da se intenzitet ovog obojenja može meriti optičkim instrumentalnim metodama (Karadžić 2001).



Slika 1.
Hemijska struktura
ABTS-a

Figure 1.
Chemical structure of
ABTS

Afinitet enzima prema određenom supstratu karakteriše se Mihaelisovom konstantom K_m , koja predstavlja konstantu ravnoteže reakcije koja dovodi do stvaranja ili razlaganja prelaznog kompleksa enzim-supstrat. K_m se definiše i kao ona koncentracija supstrata pri kojoj je brzina enzimske reakcije jednaka polovini maksimalne brzine – v_{max} . Maksimalna brzina se postiže u prisustvu viška supstrata u odnosu na enzim. Za ovaj slučaj je karakteristična kinetika nultog reda, odnosno, brzina reakcije ne zavisi od koncentracije supstrata jer su svi molekuli enzima zasićeni supstratom, već od katalitičke moći enzima (Voet i Voet 2002). Recipročna vrednost brzine reakcije je data u obliku:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m(A)}}{v_{max}} \left(\frac{K_A K_{m(B)}}{K_{m(A)} [B]} + 1 \right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{v_{max}} \left(\frac{K_{m(B)}}{K_{m(A)} [B]} + 1 \right) \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m(A)}}{v_{max}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{v_{max}} \left(\frac{K_{m(B)}}{[B]} + 1 \right) \quad (2)$$

gde su: $K_{m(A)}$ – Mihaelisova konstanta za prvi supstrat, $K_{m(B)}$ – Mihaelisova konstanta za drugi supstrat, K_A – konstanta disocijacije za prvi supstrat, v_{max} – maksimalna brzina reakcije, $[A]$ – koncentracija prvog supstrata i $[B]$ – koncentracija drugog supstrata.

Jednačina (1) opisuje sekvencijalni mehanizam bisupstratne reakcije, a jednačina (2) opisuje ping-pong mehanizam bisupstratne reakcije.

U dostupnoj literaturi ne postoji podatak kolika je vrednost K_m peroksidaze prema ABTS-u, kao ni kolika je maksimalna brzina reakcije V_{max} , koja neposredno zavisi i od $K_m(\text{ABTS})$.

Cilj ovog rada je da se utvrde vrednosti $K_m(\text{ABTS})$ i v_{max} peroksidaze prema vodonik peroksidu i ABTS-u kao supstratima, kao i promena vrednosti ovih parametara u prisustvu inhibitora, da bi se optimizovali brojni ELISA, imunoblot i drugi testovi u kojima se koristi peroksidaza.

Materijal i metode

U radu je korišćena peroksidaza koja je dobijena prečišćavanjem iz komercijalno dostupnog proizvoda za kvantitativno određivanje glukoze (Glukoza GOD – PAP; M laboratorija Dialab). Korišćen je enzimski preparat koncentracije enzimске aktivnosti 195 kU/L i rastvori: ABTS (Serva) – 25 mmol/L, vodonik peroksid (analitička čistoća) 20 mmol/L i 0.05 M fosfatni pufer pH 7.5

Metoda određivanja K_m i v_{max} kod bisupstratnih reakcija se zasniva na merenju brzine reakcije pri različitim koncentracijama i jednog i drugog supstrata.

Merenja su podeljena u tri serije gde se u okviru svake serije menja koncentracija ABTS-a, a koncentracija peroksida je konstantna. Serije se međusobno razlikuju u korišćenoj koncentraciji peroksida.

Seriya I – $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.11 \text{ mmol/L}$

I1: $c = 1.11 \text{ mmol/L ABTS}$

I2: $c = 0.55 \text{ mmol/L ABTS}$

I3: $c = 0.27 \text{ mmol/L ABTS}$

Seriya II – $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.66 \text{ mmol/L}$

II1: $c = 1.11 \text{ mmol/L ABTS}$

II2: $c = 0.55 \text{ mmol/L ABTS}$

II3: $c = 0.27 \text{ mmol/L ABTS}$

Seriya C – $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.44 \text{ mmol/L}$

III1: $c = 1.11 \text{ mmol/L ABTS}$

III2: $c = 0.55 \text{ mmol/L ABTS}$

III3: $c = 0.27 \text{ mmol/L ABTS}$

Da bi reakcija otpočela u rastvore je neposredno pre svakog merenja dodavan enzim. Vremenska promena apsorbancije svih proba je merena na 420 nm u toku 2 minuta, a na svakih 0.2 minuta i apsorbancije su prevedene u koncentracije oksidovanog ABTS-a pomoću molarnog absorpcionog koeficijenta = 38.6 ml/(μ mol cm), a po Lamber-Berovom zakonu:

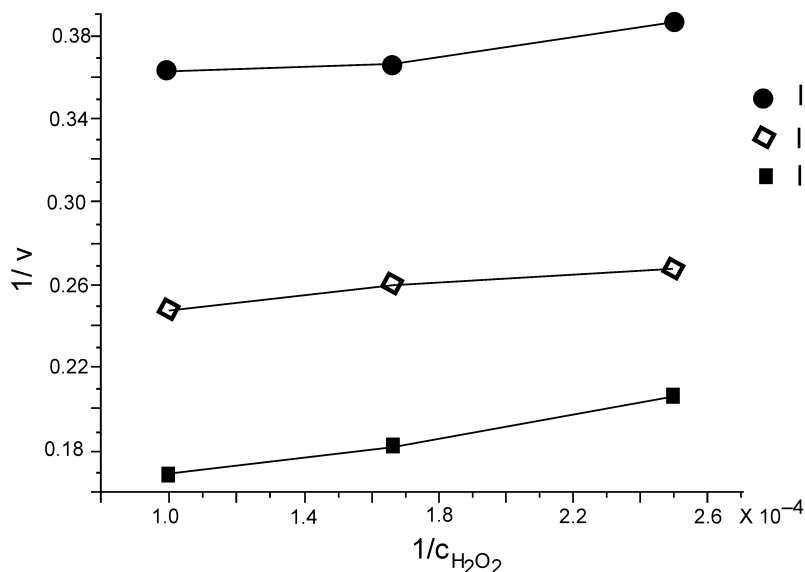
$$A = \epsilon bc$$

gde je A – apsorbanca, ϵ – molarni absorpcioni koeficijent hromofore, b – dužina optičkog puta monohromatskog svetlosnog zraka i c – koncentracija hromofore (Todorović 1993).

Rezultati

Dobijene koncentracije oksidovanog ABTS-a date su u tabeli 1:

početna koncentracija ABTS-a [mmol/L]	vreme [min]	c(ABTS oksidovanog) [mmol/L]		
		serija I	serija II	serija III
1.11	0.4	0.001554	0.001554	0.001295
	0.6	0.002332	0.002591	0.002073
	0.8	0.003109	0.003627	0.003627
	1.0	0.003886	0.004922	0.005181
	1.2	0.005181	0.006218	0.006477
	1.4	0.006477	0.006995	0.007513
	1.6	0.007772	0.008031	0.00829
	1.8	0.008808	0.009067	0.009326
	2.0	0.009845	0.010363	0.010622
0.55	0.4	0.001036	0.001036	0.001295
	0.6	0.001554	0.001295	0.001813
	0.8	0.002332	0.001813	0.002591
	1.0	0.003368	0.002332	0.003627
	1.2	0.004145	0.003109	0.004145
	1.4	0.004663	0.004145	0.005181
	1.6	0.005699	0.005181	0.006218
	1.8	0.006218	0.006218	0.006736
	2.0	0.006736	0.006736	0.007513
0.27	0.4	0.001036	0.000259	0.000777
	0.6	0.001554	0.000518	0.000907
	0.8	0.002073	0.000777	0.001295
	1.0	0.002591	0.001036	0.001554
	1.2	0.003109	0.001554	0.001813
	1.4	0.003627	0.002332	0.00285
	1.6	0.004145	0.003109	0.003627
	1.8	0.004663	0.003627	0.004404
	2.0	0.005181	0.004663	0.004922



Slika 2.
Zavisnost
reciprociteta brzine
od reciprociteta
koncentracije prvog
supstrata

Figure 2.
Dependence of
reciprocal speed upon
reciprocal
concentration of the
first substrate

Brzina reakcije za poznatu početnu koncentraciju supstrata je definirana kao koeficijent pravca prave na grafiku zavisnosti koncentracije oksidovanog ABTS-a od vremena. Zatim su izračunate recipročne vrednosti brzina i te vrednosti su unete na grafik zavisnosti recipročne vrednosti brzine od koncentracije prvog supstrata, tj. H₂O₂. Koeficijenti pravca unesenih prava su jednaki (prave su paralelne), pa se može zaključiti da je reč o ping-pong mehanizmu bisupstratne reakcije. Na grafiku (slika 2) prikazana je zavisnost recipročne vrednosti brzine reakcije od recipročne vrednosti koncentracije H₂O₂ u serijama I, II i III.

Kao što se sa grafika vidi, dobijene prave zavisnosti recipročne vrednosti brzine reakcije od recipročne vrednosti koncentracije H₂O₂ su približno paralelne (imaju isti nagib). Kako je nagib = $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)/v_{max}$ (2), zaključili smo da je peroksidazom katalizovana oksidacija ABTS-a uz pomoć H₂O₂ bisupstratna reakcija koja se odvija po ping-pong mehanizmu. Ovaj nagib smo označili sa b , a odsečke sa a_I , a_{II} i a_{III} .

Ako se nacrtaju grafik zavisnosti odsečaka a_I , a_{II} i a_{III} dobijenih u prethodnoj linearizaciji od recipročnih vrednosti koncentracije ABTS-a kao drugog supstrata (koncentracije I, II i III) i odrede parametri dobijene prave, moguće je izračunati K_m enzima za drugi supstrat i v_{max} .

Tako je $K_m(\text{ABTS}) = 1/m$, gde m predstavlja odsečak na x-osi, odnosno $m = -n/k$, gde je n odsečak, a k nagib dobijene prave.

$$v_{max} = n$$

Vrednost K_m (H₂O₂) je definisana nagibom b sa priloženog grafika (slika 2) i predstavlja proizvod vrednosti b i v_{max} .

Po završetku navedenog obračuna dobijene su sledeće vrednosti:

$$K_m (\text{H}_2\text{O}_2) = 13.15 \text{ mmol/L}$$

$$K_m (\text{ABTS}) = 418.92 \text{ mmol/L}$$

Daljom obradom ovih rezultata može se dobiti i maksimalna brzina reakcije,

$$V_{max} = 7.69 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

Važno je napomenuti da nema smisla govoriti o grešci, zato što je korelacija između dva merenja za korišćenu metodu 99%.

Nakon što su dobijene ove vrednosti za pomenute parametre, posmatrano je kako će se oni menjati kada se u sistem uvede neki inhibitor aktivnosti peroksidaze. U tu svrhu korišćen je poznati inhibitor – azidni jon (N_3^-). Pretpostavlja se, na osnovu analogih modela iz bioneorganske hemije (Maurus *et al.* 1998), da se azid koordinativno vezuje za prelazni metal u metaloenzimima, kao što je Fe^{2+} kod peroksidaze. Kod monosupstratnih enzimskih reakcija se govori o tri tipa enzimskih inhibitora (kompetitivni, antikompetitivni i nekompetitivni inhibitori) (Petrović 1998), pa smo želeli da utvrdimo, ukoliko je moguće i o kojem tipu inhibicije je reč. Obrada rezultata je bila u toliko teža jer nismo imali razrađene teorijske modele izračunavanja konstanti inhibicije za bisupstratne enzime, a koji postoje za proučavanje inhibicije monosupstratnih reakcija.

U uzorak enzima dodat je azid u različitim koncentracijama (10, 15, i 20 mmol/L). Za pravljenje rastvora azida korišćen je NaN_3 (Kemika, Zagreb) analitičke čistoće. Supstrati i enzim ili inhibirani enzim su odmereni u kivete kao u prethodnom eksperimentu. Dobijene su vrednosti na osnovu kojih nije bilo moguće izračunati promene K_m i/ili v_{max} reakcije na osnovu čega smo zaključili da je enzim inhibiran još pre vezivanja supstrata, što ukazuje na kompetitivni tip inhibicije. Ova činjenica je opet u korelaciji sa manje kompleksnim modelima kojima se proučava vezivanje azida za Fe^{2+} jon hem prostetične grupe (Maurus *et al.* 1998).

Zaključak

Utvrđene vrednosti kinetičkih parametara iznose: $K_m(\text{H}_2\text{O}_2) = 13.15$ mmol/L, $K_m(\text{ABTS}) = 418.92$ mmol/L, $v_{max} = 7.69 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$. Poznavanje vrednosti K_m i v_{max} za supstrat ABTS može smanjiti grešku i povećati osetljivost postojećih testova, što je od izuzetnog značaja u analitičkoj praksi kliničkih biohemijskih laboratorija. Još uvek je nepoznato na koji način bi se mereni parametri menjali u prisustvu inhibitora, što nudi prostor za dalja istraživanja.

Literatura

- Chard T. 1990. *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier
- Ganong W. F. 1993. *Pregled medicinske fiziologije*. Beograd: Savremena administracija
- Kay E., Shannon L.M., Lew J.Y. 1967. Peroxidase isozymes from horseradish roots. II. Catalytic properties. *J Biol Chem.*, **242**(10): 2470
- Karadžić I. 2001. *Zbirka zadataka iz enzimologije*. Beograd: Hemijski fakultet univerziteta u Beogradu
- Maurus R., Bogumil R., Nguyen N. T., Mauk A. G., Brayer G. 1998. Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and His-64→Thr variant. *Biochem. J.*, **332**: 67.
- Petrović Đ. 1998. *Osnovi enzimologije*. Beograd: Zavod za udžbenike
- Schuetz A. J., Winklmair M., Weller M. G., Niessner R. 1997. Stabilization of horseradish peroxidase for the use in immunochemical sensors. *SPIE*, **3105**: 332.
- Todorović M. 1993. *Optičke metode instrumentalne analize*. Beograd: Hemijski fakultet univerziteta u Beogradu
- Voet D., Voet J. G. 2002. *Biochemistry*. Pittsburgh: Wiley Publishing
- Vujičić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija*. Beograd: izdanje autora

Voin Petrović

K_m and v_{max} Values of Horse Radish Peroxidase in Reaction with ABTS

Horse radish peroxidase is an enzyme that catalyses the transformation of H_2O_2 to water and nascent oxygen, thus oxidizing another organic compound (vitamins, phenols, etc.). The goal of this project was to determine K_m and v_{max} for both substrates, using ABTS as a secondary substrate, and to determine the changes of these parameters upon inhibition with azide ion (N_3^-). The oxidized form of ABTS is a green colored compound, with a maximum absorption wavelength of 420 nm. Therefore, it is easily quantitatively determined using spectrophotometry.

The measured concentrations are then used to plot a series of linear graphs from which we derived the values for the given parameters. It is possible to conclude, upon inspection of the graphs, that this reaction is driven by a ping-pong bisubstrate reaction mechanism, in accordance with the cited literature (Karadžić 2002). We obtained the following values for the kinetic parameters: $K_m (H_2O_2) = 13.15 \text{ mmol/L}$, $K_m (ABTS) = 418.92 \text{ mmol/L}$, and $v_{max} = 7.69 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. Azide inhibition results were not consistent, but it was possible to conclude that this inhibition functions by means of competitive inhibition.

