

Biophysikpraktikum

Versuch:

Bestimmung der Enzymkinetik durch Absorptionsmessungen

I Ziel des Versuches:

Der Versuch gibt eine Einführung in die grundlegenden Prozesse und Parameter der Enzymkinetik und deren experimenteller Untersuchung.

II Aufgabenstellung

1. An einem ausgewählten Enzym-Substrat-System sind für mindestens vier verschiedene Substratkonzentrationen die Produktbildungsgeschwindigkeiten zu messen.
2. Die Ergebnisse aus 1 sind in einem „Lineweaver-Burk“-Diagramm bzw. einem „Eadie-Hofstee“-Diagramm darzustellen und daraus die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit und die „Michaelis-Menten“-Konstante zu bestimmen.
3. Die Aufgaben 1 und 2 sind unter Zugabe einer reaktionshemmenden Substanz mindestens einer Konzentration zu bestimmen. Aus dem Vergleich der Ergebnisse ist auf die Art der Hemmung zu schließen und die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitors abzuschätzen.

III Literatur

- [1] Lehninger, A. L. : „Biochemistry“, Worth Publishers, Inc., New York 1975
- [2] Kleber, H.-P.; Schlee, D.; Schöpp, W. : „Biochemisches Praktikum“, Gustav Fischer Verlag, Jena 1997

IV Notwendige Vorkenntnisse zur Durchführung des Versuchs

- Beschreiben Sie die wesentlichen Eigenschaften und Parameter einer Enzym-Substrat-Reaktion!
- Welche Möglichkeiten der Reaktionshemmung gibt es und wann kann die Michaelis-Menten-Beschreibung auch auf Systeme mit Inhibitor angewendet werden?

V Grundlagen des Versuchs

Enzymgesteuerte Reaktionen bilden die Grundlage für den Stoffwechsel in lebenden Zellen. Sie produzieren sowohl die zelleigenen Substanzen als auch die notwendige Energie. Um die Reaktionsrate auf den notwendigen Wert einstellen zu können, ist die Wirkung der Enzyme durch den pH - Wert, der Konzentration von Ionen, Koenzymen, Inhibitoren etc. beeinflussbar. Da in der lebenden Zelle eine große Vielzahl von Enzymen gleichzeitig wirken und die Reaktionen sich gegenseitig beeinflussen, kann ein einzelnes Enzym in der Regel nur außerhalb der Zelle untersucht werden. Ziel der Untersuchung ist die Gewinnung

von Reaktionsparametern, aus denen Schlüsse auf die Vorgänge innerhalb der lebenden Zelle gezogen werden können.

Enzymreaktionen gehören zur mikroheterogenen positiven Katalyse, d.h. die Enzyme wirken als reaktionsfördernde Katalysatoren und sind als hochmolekulare Stoffe kolloid gelöst. Die einfachste Reaktionsform lässt sich durch die Bilanzgleichungen



und



beschreiben, wobei $[E]$ die Konzentration des freien Enzyms, $[S]$ die des Substrats, also der umzusetzenden Substanz, $[ES]$ die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes und $[P]$ die des Produkts der Reaktion ist. Die Größen $k_{(-)n}$ geben die spezifischen Reaktionsraten oder „Ratenkonstanten“ für die jeweilige Elementarreaktion mit der Reaktionsordnung n an. Das Minus vor dem Index steht für eine Rückreaktion. Diese kann prinzipiell auch in Schritt zwei erfolgen, ist aber wegen einer meist zu hohen Aktivierungsenergie i. a. vernachlässigbar. Durch den Zwischenschritt der Komplexbildung wird die Aktivierungsenergie gegenüber einer direkten Umsetzung von S zu P reduziert. Wegen der Aktivierbarkeit der Reaktionen sind die spezifischen Reaktionsraten stets temperaturabhängig. Für den Versuch wird vorausgesetzt, dass die Temperatur und damit die spezifischen Reaktionsraten hinreichend konstant gehalten werden können.

Für die Bildung des ES -Komplexes kann die Ratengleichung zweiter Ordnung, also

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_2([E_0] - [ES])[S] \quad (3)$$

und für den Zerfall die Summe aus zwei Ratengleichungen erster Ordnung, also

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_{-1}[ES] - k_1[ES] \quad (4)$$

angesetzt werden. $[E_0]$ ist die Gesamtkonzentration des freien und des gebundenen Enzyms.

Sobald das Reaktionssystem im Gleichgewicht ist, ist die Summe aus Gl. (3) und (4) null und man erhält

$$\frac{([E_0] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_1}{k_2} = K_M \quad (5)$$

einen neuen Wert K_M , der als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet wird und die Maßeinheit einer Konzentration hat. Dieser Wert ist allerdings für ein Enzym nicht konstant, sondern variiert u. a. mit der Substratstruktur, dem pH-Wert und der Temperatur. Berücksichtigt man nun, dass die Anfangsrate v der Produktbildung sich aus

$$v = k_1[ES] \quad (6a)$$

ergibt und dass diese maximal wird, wenn sehr hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden, weil dann das gesamte Enzym im Komplex gebunden ist, also

$$V_{\max} = k_1[E_0] \quad (6b)$$

gilt, dann erhält man für die Anfangsrate v der Enzymreaktion

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Aus dieser Michaelis-Menten Gleichung kann weiter abgeleitet werden, dass dann, wenn v gerade der halben Maximalrate entspricht

$$K_M = [S] \quad (8)$$

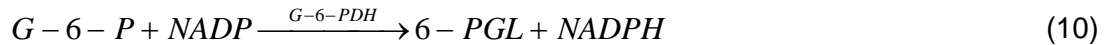
gilt. Damit ist prinzipiell eine Möglichkeit zur experimentellen Bestimmung von K_M gegeben. Allerdings ist die Bestimmung von V_{\max} oft nicht hinreichend genau möglich und $V_{\max}/2$ muss i. a. durch Interpolation gewonnen werden. Andere Umformungen von Gl. (7) liefern oft bessere Möglichkeiten zur Inter- bzw. Extrapolation und lassen ggf. auch Schlüsse auf die Wirkungsweise von Inhibitoren zu. So ist der Kehrwert der Anfangsrate auch bestimmt durch

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9)$$

Ein entsprechendes Lineweaver-Burk Diagramm liefert eine Gerade, die die Abszisse bei $-1/K_M$ und die Ordinate bei $1/V_{\max}$ schneidet.

VI Hinweise zur Versuchsdurchführung

Das Enzym Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PDH) oxidiert Glucose-6-Phosphat (G-6-P) zu 6-Phosphogluconolacton (6-PGL) nach folgender Reaktionsgleichung:



Dabei wirkt Nicotinadeninucleotidphosphat (NADP) als Elektronenakzeptor. Die G-6-PDH aus dem Bakterium *Leuconostoc mesenteroides* kann auch NAD als Elektronenakzeptor verwenden. Die Geschwindigkeit des Enzyms und das Ausmaß der Reaktion können direkt photometrisch durch Bestimmung von NADPH/NADH bei 340 nm gemessen werden.

Machen Sie sich vor Beginn der Versuchsserien mit der Funktionsweise des Photometers vertraut. Die Absorption soll vom Beginn der Enzymzugabe mindestens zwei Minuten lang beobachtet werden.

Stellen Sie sicher, dass folgende Lösungen am Versuchsplatz vorhanden sind:

TRA (Triethanolamin+HCL)- Puffer	(TRA 0,1 M, MgCl ₂ 0,003 M, pH 7,8)	}	Raumtemperatur
Aqua dest.			
NAD	0,2 M	}	in Eiswasser gekühlt
Glucose-6-Phosphat	0,003 M		
KH ₂ PO ₄	2,00 M, pH 7,8		
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase von <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	200 U/ml		

Versuchserie 1: (ohne Hemmstoff):

Pipettieren Sie in eine Quarzglas Küvette folgende Lösungen:

TRA Puffer	2,5 ml
NAD	0,1 ml
G-6-P	0,081 ml
H ₂ O	0,379 ml

Mischen Sie alle Substanzen, warten Sie auf den Temperatúrausgleich mit der Thermostatierung (22°C) und messen Sie die Hintergrundabsorption (Blank). Stellen Sie dann die Startbereitschaft des Photometers her und messen Sie die Basislinie (ca. 20 Sekunden). Geben Sie anschließend 0,005 ml Enzym hinzu, mischen die Lösung rasch und verfolgen Sie die Reaktion im Photometer bei 340 nm (alle 5 Sekunden 1 Messpunkt)

Wiederholen Sie den Versuch mit folgenden Volumina von G-6-P:

0,110 ml,

0,172 ml,

0,4 ml.

Gleichen Sie die Volumenänderungen durch Änderungen der H₂O Menge aus.

Versuchserie 2: (mit Hemmstoff):

Wie Versuchsserie 1 aber zusätzlich werden 0,06 ml KH₂PO₄ zu jedem Ansatz pipettiert. Achten Sie auf Einhaltung des Gesamtvolumens des Versuchsansatzes (3,06 ml).

Auswertung:

Bestimmen Sie die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei den verschiedenen G-6-P Konzentrationen. Tragen Sie die reziproken Werte der Anfangsgeschwindigkeiten (auch in Anwesenheit von Phosphat) gegen die reziproken Werte der Substratkonzentrationen auf (Lineweaver–Burk-Auftragung). Nach welchem Hemmtyp wirkt Phosphat auf das Enzym? Bestimmen Sie die Halbsättigungs-Konstante des Enzyms für G-6-P und die Hemmkonstante für Phosphat.