

Versuch 1: Enzymkinetik

Namen	Martin Thunemann Natalie Leiprecht Thorsten Barth	Versuch durchgeführt am:	14.10.2003
Platznummer	26	(Protokoll abgegeben am) 1.Abgabe: 2.Abgabe:	
Assistent		Testiert am:	

1. Substratabhängigkeit

Substratkonzentration		Chemische Hydrolyse		Enzymatische Hydrolyse (korr.)	
Ansatz (mM)	Küvette (μM)	$\Delta\text{E}/\text{min}$ (mOD/min)	n/min (nmol/min)	$\Delta\text{E}/\text{min}$ (mOD/min)	n/min (nmol/min)
0,5	6,25	0,307	0,034	12,1	1,309
1	12,5	0,433	0,048	15,4	1,650
2	25	-0,370	-0,041	19,8	2,069
5	62,5	3,12	0,347	22,3	2,154
10	125	5,65	0,628	25,4	2,172
20	250	11,6	1,293	29,4	1,972

2. Enzymabhängigkeit

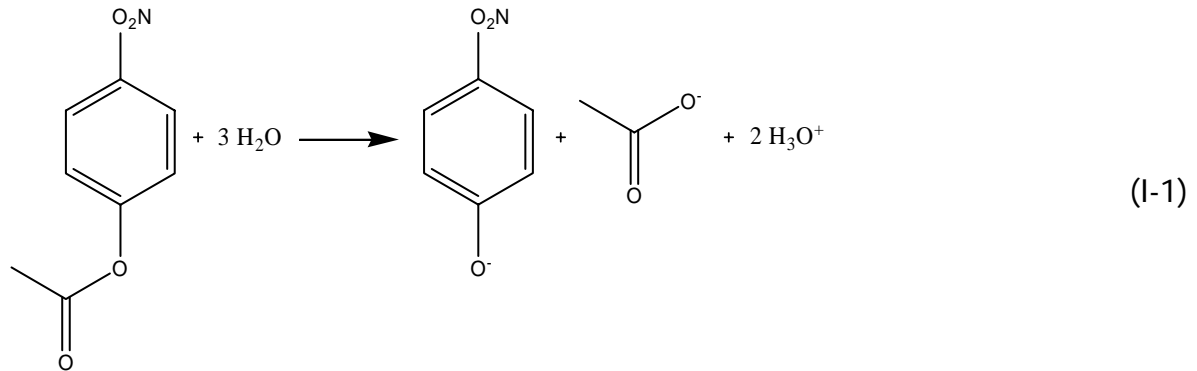
	Chymotrypsin	Hydrolyse (unkorr.)		Enzymatische Hydrolyse (korr.)	
Ansatz #	Küvette (nM)	$\Delta\text{E}/\text{min}$ (mOD/min)	n/min (nmol/min)	$\Delta\text{E}/\text{min}$ (mOD/min)	n/min (nmol/min)
1	0	9,835	1,188	---	---
2	6049,798	40,475	4,891	30,64	3,702
3	12099,595	10,24	1,237	0,405	0,049
4	18149,393	61,835	7,472	52	6,283
5	24199,191	77	9,304	67,165	8,116
6	30248,988	112,81	13,631	102,975	12,443

Proteinkonzentration der Chymotrypsinlösung (Chymo-Kinetik) (mg/ml)	5,483	K_M (μM)	4241,490
Proteinkonzentration in der Küvette (Substratabhängigkeit) (mg/ml)	0,069	V_{max} (nmol/min)	2,224
Spezifische Aktivität (U/mg)	0,016	Wechselzahl (1/s)	0,0068

I. VERSUCHSBESCHREIBUNG

A. Versuchsinhalt / Versuchsziel

Im Versuch wird folgende Reaktion untersucht:



Die Reaktion verläuft entweder spontan oder durch Chymotrypsin enzymatisch katalysiert, sie kann photometrisch verfolgt werden, da das entstehende p-Nitrophenolat-Anion eine charakteristische Absorption bei 405 nm besitzt ($\epsilon_{405} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Der Proteingehalt der verwendeten Enzymlösung wird nach Bradford mit Hilfe einer Eichlösung bestimmt, der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ändert sein Absorptionsmaximum von 495 zu 595 nm, wenn er in saurer Lösung an Proteine bindet.

Ziel des Versuchs ist, die kinetischen Parameter der oben dargestellten Reaktion und des Enzyms Chymotrypsin zu bestimmen. Dabei lassen sich mit Hilfe des Michaelis-Menten-Modells der enzymatischen Katalyse die maximale Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion und die Michaelis-Menten-Konstante ermitteln, für das Enzym lassen sich die spezifische Aktivität sowie die Wechselzahl angeben.

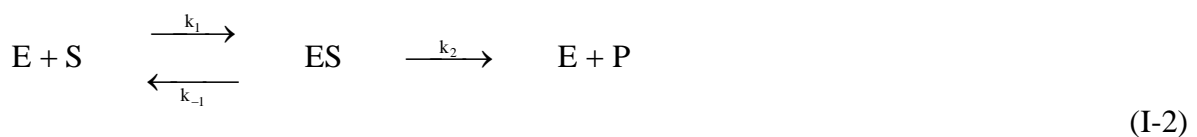
Durchgeführte Versuche:

- Verfolgung der spontanen Hydrolyse von p-NPA
- Verfolgung der enzymatischen Katalyse bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen
- Verfolgung der enzymatischen Katalyse bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen
- Proteinbestimmung nach Bradford

B. Theoretischer Hintergrund

1. Reaktionsgeschwindigkeit von enzymkatalysierten Reaktionen

Enzyme können als Biokatalysatoren bezeichnet werden, da sie die zur Reaktion erforderliche Aktivierungsenergie herabsetzen und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen können. Zur Beschreibung wird häufig die Michaelis-Menten-Kinetik verwendet, die auf folgendem Reaktionsmechanismus basiert:



mit $\frac{d[\text{ES}]}{dt} = 0 = k_1 [\text{S}][\text{E}] - k_{-1} [\text{ES}] - k_2 [\text{ES}]$

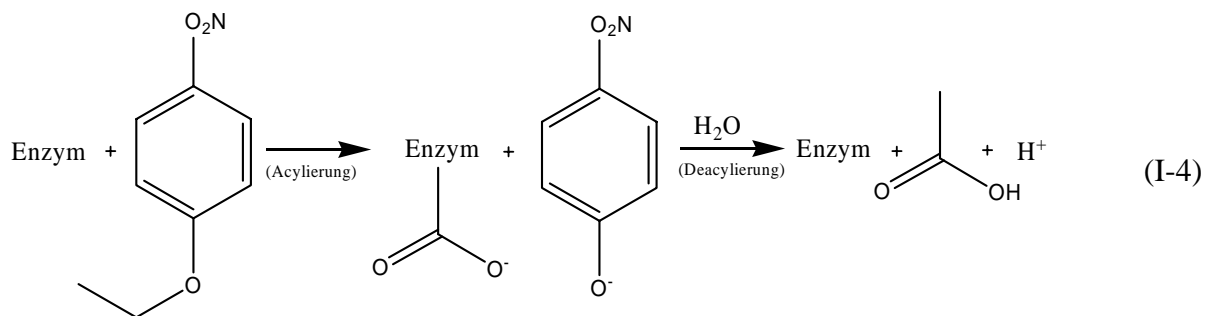
Unter bestimmten Annahmen (der Enzymsubstratkomplex (ES) befindet sich im Fließgleichgewicht, die Substratkonzentration ist im Vergleich zur Enzymkonzentration sehr groß und die Zerfallsreaktion des ES-Komplexes ist geschwindigkeitsbestimmend) lässt sich für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion (unter Vernachlässigung der Rückreaktion) die Michaelis-Menten-Gleichung mit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} und der Michaelis-Menten-Konstante K_M bei gegebener Enzymkonzentration als reaktionsspezifischen Konstanten aufstellen:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{I-3})$$

2. Katalyse der Ester-Hydrolyse mit Chymotrypsin

Chymotrypsin gehört als Verdauungsenzym zu den Serinproteasen, es hydrolysiert Proteine im Dünndarm und spaltet dabei selektiv Peptidbindungen an der Carboxylseite der aromatischen Seitenketten von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin sowie an großen hydrophoben Resten. Es hat ein Molekulargewicht von 25 kD, die Bindung des Substrats an das Enzym erfolgt kovalent, für die Substratbindung sind drei unpolare Reste an der sonst polaren Oberfläche des Proteins von Bedeutung.

Im Versuch beobachten wir die ebenfalls von Chymotrypsin katalysierte, jedoch physiologisch unwichtige Esterspaltung, deren Untersuchung dessen ungeachtet einen großen Beitrag zur Aufklärung des Katalyse-Mechanismus von Chymotrypsin geleistet hat:



Nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes wird das p-Nitrophenolat-Anion abgespalten, während das Acetat-Ion kovalent am Enzym gebunden bleibt. Durch Angriff von Wasser am Enzym-Acetat-Komplex wird der Komplex hydrolysiert und das Enzym regeneriert. Der erste Schritt verläuft schnell, der zweite Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt diesen als „Ping-Pong“-Mechanismus bezeichneten, kinetisch komplizierteren Reaktionsmechanismus nur unter bestimmten Randbedingungen zutreffend: Die Anfangsgeschwindigkeiten werden unter Vernachlässigung der Rückreaktion bestimmt, darüber hinaus darf Wasser als zweites Substrat des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts nicht als limitierender Faktor für den Ablauf der Reaktion vorliegen.¹

¹ Katalytischer Mechanismus von Chymotrypsin: vgl Stryer, S. 233 ff.

II. ANMERKUNGEN ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die Versuche wurden anhand der Versuchsanleitung im BGK-Skript durchgeführt. Im Folgenden ist eine Zusammenfassung des Handzettels sowie eine Übersicht über die Herstellung der verdünnten Ansätze aufgeführt.

Der Nullabgleich des Spektrometers wurde mit einer leeren Küvette durchgeführt.

A. Chemikalien

Beschriftung / Abkürzung	Inhalt
Chymo-Standard	200 µg / ml Chymotrypsin in 20 mM NaAc-Puffer pH 5.0
Chymo-Kinetik	ca. 6 mg / ml Chymotrypsin in 20 mM NaAc-Puffer pH 5.0
p-NPA	0,75 mol / l p-Nitrophenylacetat (Essigsäure-4-nitrophenylester) in Dioxan
NaAc	20 mM Natriumacetatpuffer pH 5.0
KP _i	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.5
Dioxan	Dioxan
Bradford-Reagenz	nach Bradford (1976): Coomassie Brilliant Blue G-250 (0.01 % [w/v]) in Phosphorsäure (8.5 % [w/v]) / Ethanol (4.7 % [w/v]) / Wasser

B. Hergestellte Lösungen

1. Verdünnung der Substratstammlösung nach 1.4.1

Ansatz	Konzentration p-NPA (mM)	Volumen (µl)	Zusammensetzung	
1	0,5	200	195 µl Dioxan	5 µl 20 mM p-NPA
2	1	200	190 µl Dioxan	10 µl 20 mM p-NPA
3	2	200	180 µl Dioxan	20 µl 20 mM p-NPA
4	5	200	150 µl Dioxan	50 µl 20 mM p-NPA
5	10	200	100 µl Dioxan	100 µl 20 mM p-NPA
6	20	750	730 µl Dioxan	20 µl 0,75 M p-NPA

2. Verdünnung von Chymo-Kinetik nach 1.4.6 zur Proteinbestimmung

Verdünnung der Lösung Chymo-Kinetik 1 : 30 mit NaAc-Puffer (Lösemittel des Proteins), Ansatz von 7 µl Chymo-Kinetik und 203 µl NaAc-Puffer.

$$c_{\text{Standard}} = 200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}, \quad c_{\text{Kinetik}} \approx 6 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \Rightarrow \frac{c_{\text{Standard}}}{c_{\text{Kinetik}}} \approx \frac{1}{30} \quad (\text{II-1})$$

Nach der Verdünnung besitzt die Chymo-Kinetik-Lösung eine mit der Chymo-Standard-Lösung vergleichbare Konzentration; die genaue Konzentration von Chymo-Kinetik kann dann mit Hilfe einer Eichgeraden (aus Chymo-Standard) bestimmt werden.

III. VERSUCHSAUSWERTUNG

A. unaufbereitete Messergebnisse

Tabelle III-1: Spontane Hydrolyse

Zeit (s)	Konzentration p-NPA					
	0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
15	0,032	0,035	-0,009	-0,015	-0,012	-0,009
30	0,033	0,034	-0,01	-0,015	-0,012	-0,007
45	0,035	0,034	-0,01	-0,015	-0,011	-0,005
60	0,032	0,034	-0,01	-0,014	-0,01	-0,003
75	0,032	0,034	-0,01	-0,014	-0,009	0
90	0,032	0,034	-0,011	-0,013	-0,007	0,002
105	0,032	0,034	-0,01	-0,012	-0,006	0,004
120	0,032	0,034	-0,01	-0,011	-0,005	0,007
135	0,032	0,034	-0,009	-0,011	-0,004	0,009
150	0,032	0,034	-0,01	-0,01	-0,002	0,012
165	0,033	0,034	-0,01	-0,009	0	0,016
180	0,033	0,035	-0,011	-0,008	0,001	0,018
195	0,033	0,035	-0,011	-0,008	0,002	0,022
210	0,033	0,035	-0,011	-0,007	0,004	0,025
225	0,033	0,035	-0,011	-0,006	0,006	0,028
240	0,033	0,035	-0,012	-0,005	0,007	0,032
255	0,034	0,036	-0,011	-0,004	0,009	0,035
270	0,034	0,036	-0,011	-0,003	0,01	0,039
285	0,034	0,036	-0,011	-0,002	0,012	0,042
300	0,034	0,036	-0,011	0	0,014	0,046

Tabelle III-2: Enzymatische Katalyse (Substratabhängigkeit)

Zeit (s)	0,5 mM (1)	0,5 mM (2)	0,5 mM (3)	1 mM (1)	1 mM (2)	2 mM (1)	2 mM (2)
15	-0,092	-0,056	-0,053	-0,053	-0,051	-0,048	-0,084
30	-0,091	-0,053	-0,048	-0,048	-0,042	-0,035	-0,076
45	-0,088	-0,049	-0,048	-0,043	-0,036	-0,027	-0,069
60	-0,086	-0,046	-0,041	-0,039	-0,032	-0,022	-0,064
75	-0,082	-0,043	-0,038	-0,035	-0,027	-0,017	-0,059
90	-0,077	-0,04	-0,035	-0,032	-0,024	-0,013	-0,055
105	-0,073	-0,038	-0,033	-0,029	-0,02	-0,008	-0,05
120	-0,031	-0,035	-0,031	-0,026	-0,017	-0,005	-0,045
Zeit (s)	5 mM (1)	5 mM (2)	10 mM (1)	10 mM (2)	20 mM (1)	20 mM (2)	
15	-0,079	-0,082	-0,072	-0,08	-0,068	-0,071	
30	-0,067	-0,071	-0,064	-0,072	-0,062	-0,066	
45	-0,059	-0,064	-0,058	-0,067	-0,055	-0,06	
60	-0,057	-0,059	-0,052	-0,061	-0,047	-0,054	
75	-0,052	-0,053	-0,045	-0,055	-0,038	-0,047	
90	-0,046	-0,047	-0,039	-0,049	-0,031	-0,04	
105	-0,04	-0,042	-0,032	-0,042	-0,022	-0,033	
120	-0,034	-0,035	-0,025	-0,035	-0,014	-0,027	

Tabelle III-3: Enzymatische Katalyse (Enzymabhängigkeit)

Zeit (s)	Ansatz					
	1 (1)	1 (2)	2 (1)	2 (2)	3 (1)	3 (2)
15	-0,047	-0,051	0,006	0,004	-0,045	-0,045
30	-0,045	-0,05	0,015	0,014	-0,043	-0,044
45	-0,042	-0,048	0,024	0,024	-0,041	-0,042
60	-0,04	-0,046	0,034	0,033	-0,038	-0,04
75	-0,037	-0,044	0,044	0,044	-0,035	-0,036
90	-0,034	-0,041	0,054	0,054	-0,033	-0,034
105	-0,031	-0,039	0,065	0,065	-0,03	-0,031
120	-0,027	-0,037	0,076	0,076	-0,027	-0,028

Zeit (s)	Ansatz					
	1 (1)	1 (2)	2 (1)	2 (2)	3 (1)	3 (2)
15	0,067	0,047	0,083	0,09	0,156	0,145
30	0,083	0,062	0,101	0,107	0,186	0,174
45	0,098	0,077	0,118	0,126	0,213	0,2
60	0,114	0,09	0,136	0,145	0,24	0,228
75	0,131	0,104	0,154	0,165	0,267	0,255
90	0,147	0,118	0,174	0,185	0,298	0,284
105	0,164	0,135	0,196	0,207	0,327	0,314
120	0,182	0,15	0,214	0,227	0,357	0,34

Tabelle III-4: Proteinbestimmung nach Bradford

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ansatz	Leerwert	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Probe	Probe	Probe	Probe
E_{595}	0,372	0,433	0,488	0,543	0,398	0,852	0,493	0,554	0,566	0,554

B. Auswertung 1 (Eichdiagramm für Proteinbestimmung nach Bradford)

Mit Hilfe der Extinktionen bei 595 nm (durch den proteingebundenen Farbstoff) der unterschiedlich konzentrierten Standardlösungen „Chymo-Standard“ lässt sich eine Eichgerade ermitteln, worin die Extinktion gegen die berechnete Proteinkonzentration des Standards aufgetragen wird. Die Extinktionen der Probelösungen lassen sich mit Hilfe der Eichgeraden in die Proteinkonzentration der Probelösung „Chymo-Kinetik“ umrechnen, dabei ist zu berücksichtigen, dass die Chymo-Kinetik-Lösung zur Bestimmung 30fach verdünnt wurde. Die Proteinkonzentration der Probelösung wird wie folgt bestimmt:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{Protein}\{\text{Standard}\}} &= \frac{m_{\text{Protein}\{\text{Standard}\}}}{V_{\{\text{Standard}\}}} \\
 n_{\text{Protein}\{\text{Standard}\}} &= \frac{m_{\text{Protein}\{\text{Standard}\}}}{M_{\text{Protein}}} = \frac{c_{\text{Protein}\{\text{Standard}\}} \cdot V_{\text{Standard}}}{M_{\text{Protein}}} \\
 n_{\text{Protein}}(V_{\text{Standard}}) &= \frac{200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{25000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} V_{\text{Standard}} = \frac{0,2 \cdot 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}}}{25000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \cdot V_{\text{Standard}} \\
 &= 0,008 \text{ nmol} \cdot \frac{V_{\text{Standard}}}{\mu\text{l}}
 \end{aligned} \tag{III-1}$$

Tabelle III-5: Proteinmenge und Extinktion der Standardlösung

Ansatz	Proteinhal- tige Lösung (µl)	Puffer (µl)	Wasser (µl)	Reagenz (µl)	Protein- menge (nmol)	Extinktion E ₅₉₅
Leerwert	0	100	800	200	0	0,372
Standardlösung	10	90	800	200	0,08	0,433
Standardlösung	20	80	800	200	0,16	0,488
Standardlösung	30	70	800	200	0,24	0,543
Standardlösung	40	60	800	200	0,32	0,398
Standardlösung	50	50	800	200	0,4	0,852

Die Auftragung der Proteinmenge gegen die Extinktion liefert das folgende Eichdiagramm:

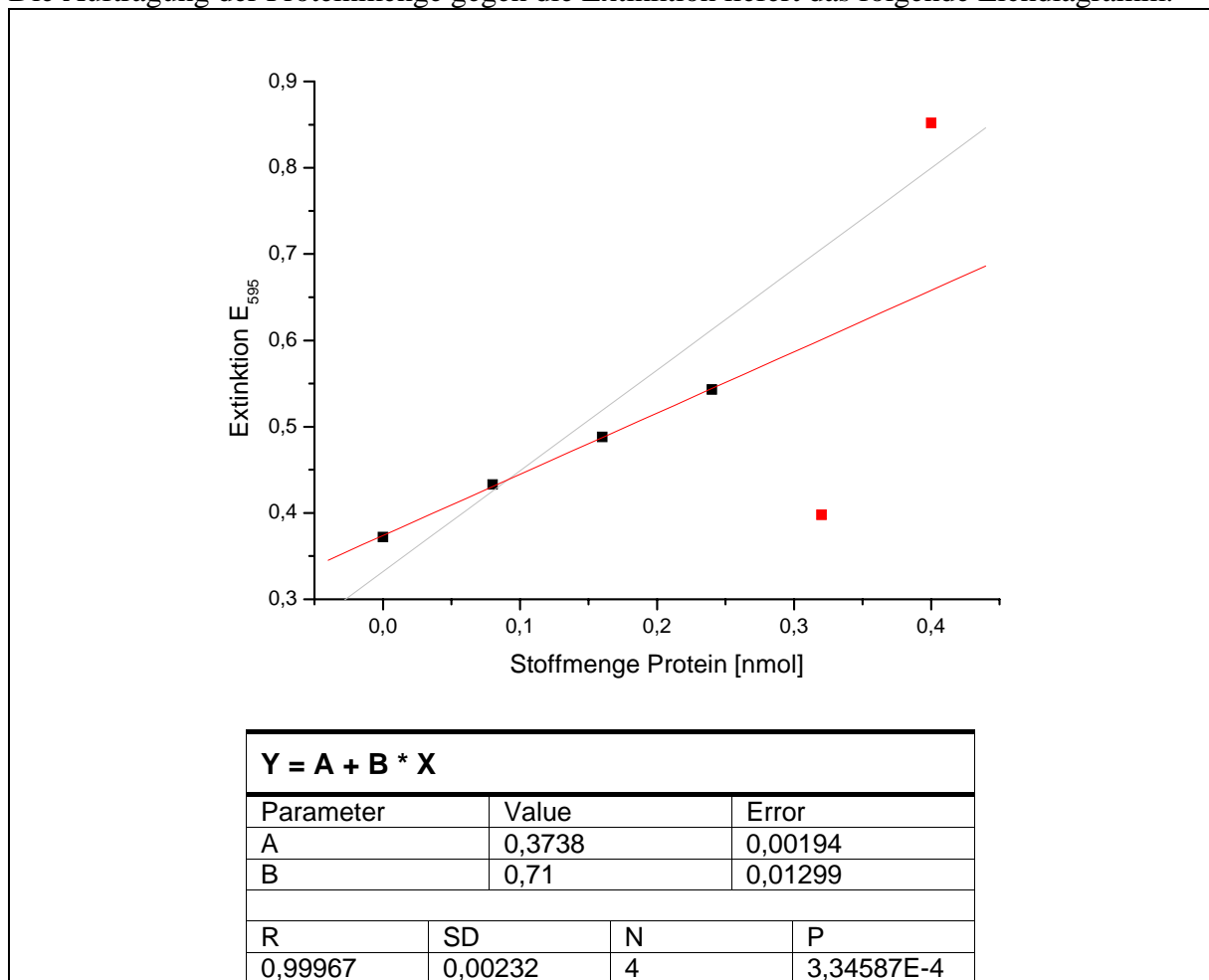


Diagramm III-1: Eichdiagramm

Bei der Messung für den Ansatz mit 40 µl Proteinstandard scheint ein (Pipettier-)Fehler vorzuliegen, bei 50 µl ist die Extinktion sehr hoch, sodass wir die beiden letzten Messwerte bei der linearen Regression nicht berücksichtigten um ein Regressionsergebnis mit geringem Fehler zu erhalten (Berücksichtigung der proteinhaltigen Lösungen von 0 - 30 µl).

Anhand des Eichdiagramms lässt sich aus der Extinktion der Probelösung ihre Proteinmenge bestimmen; aus der linearen Regression des Eichdiagramms erhalten wir folgende Formel für die Stoffmenge des Proteins:

$$Y = A + B * X \hat{=} E = A + B * n_{\text{Protein}} \Rightarrow n_{\text{Protein}} = \frac{E - A}{B} \quad (\text{III-2})$$

Tabelle III-6: Extinktion und Proteinstoffmenge der Probelösungen

	Proteinhaltige Lösung (µl)	Puffer (µl)	Wasser (µl)	Bradford-Reagenz (µl)	Extinktion E ₅₉₅	Stoffmenge Protein (nmol)
Probelösung	20	80	800	200	0,493	0,168
Probelösung	30	70	800	200	0,554	0,254
Probelösung	40	60	800	200	0,566	0,271
Probelösung	50	50	800	200	0,554	0,254

Aus der Stoffmenge des Chymotrypsins (in der Küvette) lässt sich die tatsächliche Proteinkonzentration des Ansatzes ermitteln, unter der Berücksichtigung, dass die Chymo-Kinetik-Lösung zur Bestimmung 30-fach verdünnt wurde:

$$\begin{aligned}
 m_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} &= n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} \cdot M_{\text{Protein}} \\
 m_{\text{Protein}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} &= 30 \cdot m_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} = 30 \cdot n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} \cdot M_{\text{Protein}} \\
 c_{\text{Protein}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} &= 30 \cdot \frac{n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} \cdot M_{\text{Protein}}}{V_{\{\text{Probelösung}\}}} \\
 &= 30 \cdot 25000 \text{ g/mol} \cdot \frac{n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}}}{V_{\{\text{Probelösung}\}}} \\
 &= 30 \cdot 0,025 \text{ mg/nmol} \cdot \frac{n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}}}{V_{\{\text{Probelösung}\}}}
 \end{aligned} \quad (\text{III-3})$$

Tabelle III-7: Proteinmenge der "Enzym-Kinetik"

	Proteinhaltige Lösung (µl)	Extinktion E ₅₉₅	Stoffmenge Protein (nmol)	Masse Protein (Küvette) (µg)	tatsächliche Konzentration (mg/ml)
Probelösung	20	0,493	0,168	4,197	6,296
Probelösung	30	0,554	0,254	6,345	6,345
Probelösung	40	0,566	0,271	6,768	5,076
Probelösung	50	0,554	0,254	6,345	3,807

Die durchschnittliche Konzentration der Enzym-Kinetik-Lösung beträgt **5,483 ± 0,898 mg / ml**. Hierbei wurde der Ansatz mit 50 µl Probelösung nicht berücksichtigt, da der Betrag der Extinktion und damit die berechnete Proteinkonzentration (aufgrund eines Pipettierfehlers?) zu niedrig ist.

C. Auswertungen 2 – 5 (Substratabhängigkeit der Enzymkatalyse)

Es soll die Substratabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit v der spontanen Hydrolyse (Einfachbestimmung) und der enzymkatalysierten Hydrolyse (Doppelbestimmung) ermittelt werden. Um die Umsatzgeschwindigkeit zu erhalten, wird zunächst die (durchschnittliche) Extinktionsänderung im Laufe der Zeit bestimmt und ausgewertet um schließlich aus den Umsatzgeschwindigkeiten der enzymatisch katalysierten Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen die Michaelis-Menten-Parameter abzuleiten. Dies ist einerseits mit Hilfe der nichtlinearen Anpassung an die Substratkonzentrations-Geschwindigkeits-Kurve möglich und andererseits durch die Linearisierung nach Lineweaver-Burk.

1. Zeitabhängigkeit der Extinktion bei 405 nm

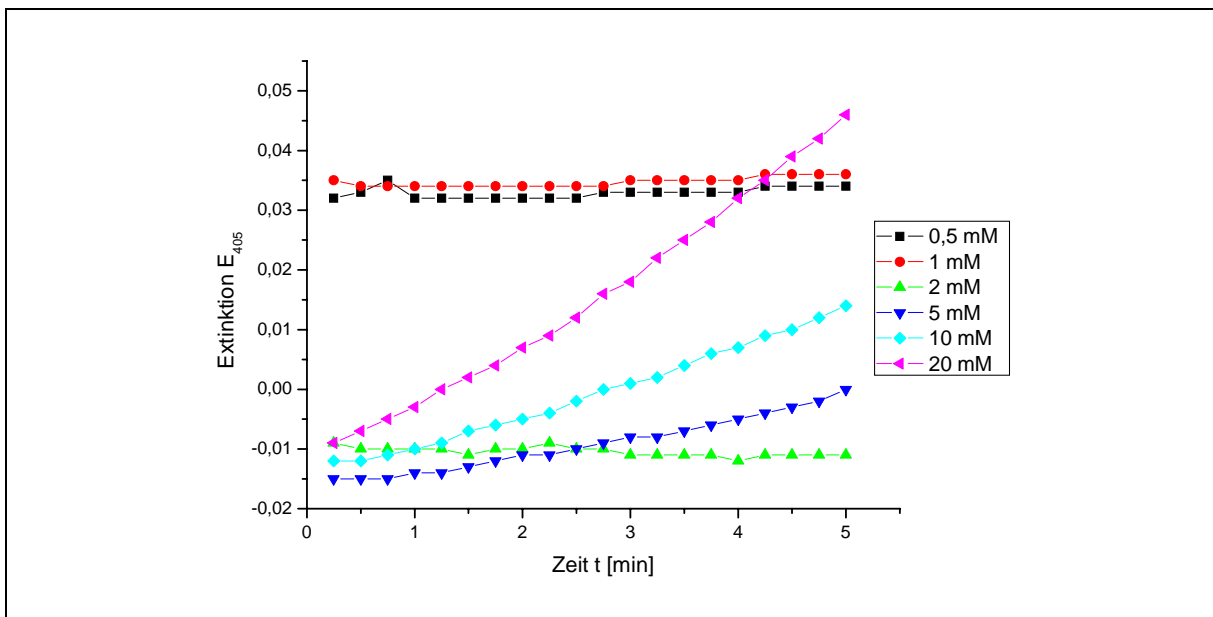


Diagramm III-2: Zeitverlauf der Extinktion (405 nm) bei spontaner Hydrolyse

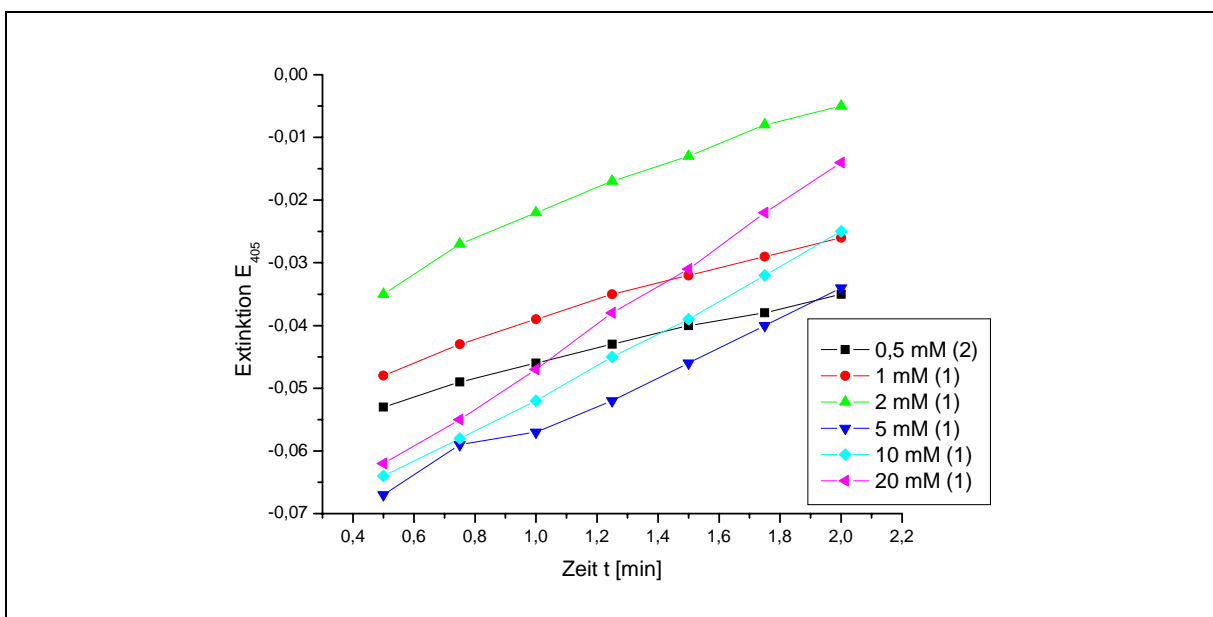


Diagramm III-3: Zeitverlauf der Extinktion (405 nm) bei Enzymkatalyse (Messreihe 1)

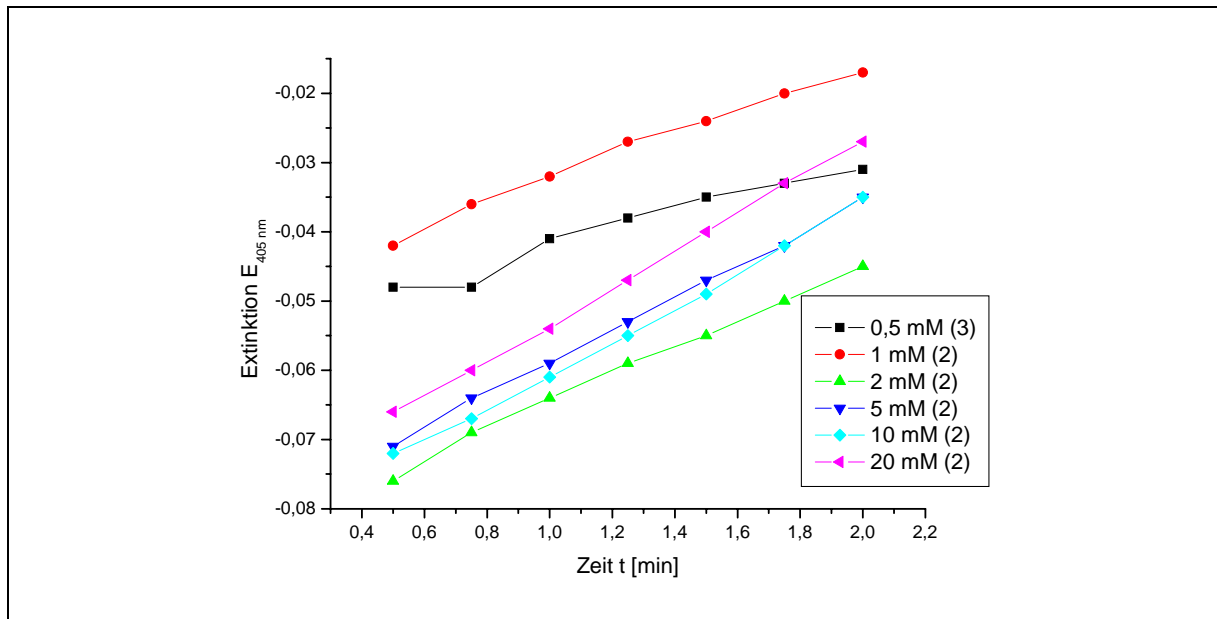


Diagramm III-4: Zeitverlauf der Extinktion (405 nm) bei Enzymkatalyse (Messreihe 2)

2. Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeiten

Unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Umsatzgeschwindigkeit (Reaktionsgeschwindigkeit) der betrachteten Reaktion bestimmen:

$$E_{405} = c \varepsilon_{405} d \Rightarrow c = \frac{E_{405}}{\varepsilon_{405} d}$$

$$\Rightarrow n = \frac{E_{405}}{\varepsilon_{405} d} V \Rightarrow v = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta E_{405}}{\Delta t} \frac{V}{\varepsilon_{405} d} \quad (\text{III-4})$$

$d = 1 \text{ cm}$ (Schichtdicke), $\varepsilon_{405} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, V : Volumen in der Küvette

Mit Hilfe dieser Gleichung ist es möglich, die Zunahme der Stoffmenge des p-Nitrophenyl-Anions (Reaktionsgeschwindigkeit) anzugeben. Die durchschnittliche Extinktionsänderung (pro Minute) $\Delta E_{405}/\text{min}$ während des betrachteten Zeitrahmens von 5 Minuten (spontane Hydrolyse) bzw. 2 Minuten (Enzymkatalyse) wurde durch lineare Regression ermittelt.

Tabelle III-8: Ergebnis der linearen Regression (aus Diagramm III-2 - Diagramm III-4)

p-NPA	Y = A + B * X Parameter	Spontane Hydrolyse		Enzymkatalyse (1)		Enzymkatalyse (2)	
		Value	Error	Value	Error	Value	Error
0,5 mM	B	3,07E-04	1,26E-04	0,01171	4,24E-04	0,01243	0,0012
1 mM	B	4,33E-04	7,67E-05	0,01443	6,48E-04	0,01643	7,64E-04
2 mM	B	-3,70E-04	8,39E-05	0,01957	0,0011	0,02	6,26E-04
5 mM	B	3,12E-03	1,08E-04	0,02114	0,00102	0,02343	4,04E-04
10 mM	B	5,65E-03	1,23E-04	0,026	3,38E-04	0,02471	5,68E-04
20 mM	B	1,16E-02	2,57E-04	0,03229	4,24E-04	0,02643	3,56E-04

Die Extinktionsänderung der spontanen Hydrolyse bei 2 mM ist negativ, was keinen Sinn ergibt, sie wird daher in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Anhand der Steigung der Regressionsgeraden lässt sich die Umsatzgeschwindigkeit folgendermaßen berechnen:

$$v = \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta E_{405}}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon_{405} d} = B \frac{2000 \mu l}{18 (\text{mmol/l})^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{cm}} / \text{min}$$

$$= B \frac{2 \cdot 10^{-3}}{18} \text{mmol} / \text{min} = B \frac{2 \cdot 10^3}{18} \text{nmol} / \text{min} \quad (\text{III-5})$$

Tabelle III-9: Umsatzgeschwindigkeit der spontanen Hydrolyse (Substratabhängigkeit)

p-NPA im Ansatz (mM)	p-NPA in Küvette (mM)	$\Delta E/\Delta t$ (1/min)	$\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)
0,5	0,00625	3,07E-04	0,034
1	0,0125	4,33E-04	0,048
2	0,025	-3,70E-04	-0,041
5	0,0625	3,12E-03	0,347
10	0,125	5,65E-03	0,628
20	0,25	1,16E-02	1,293

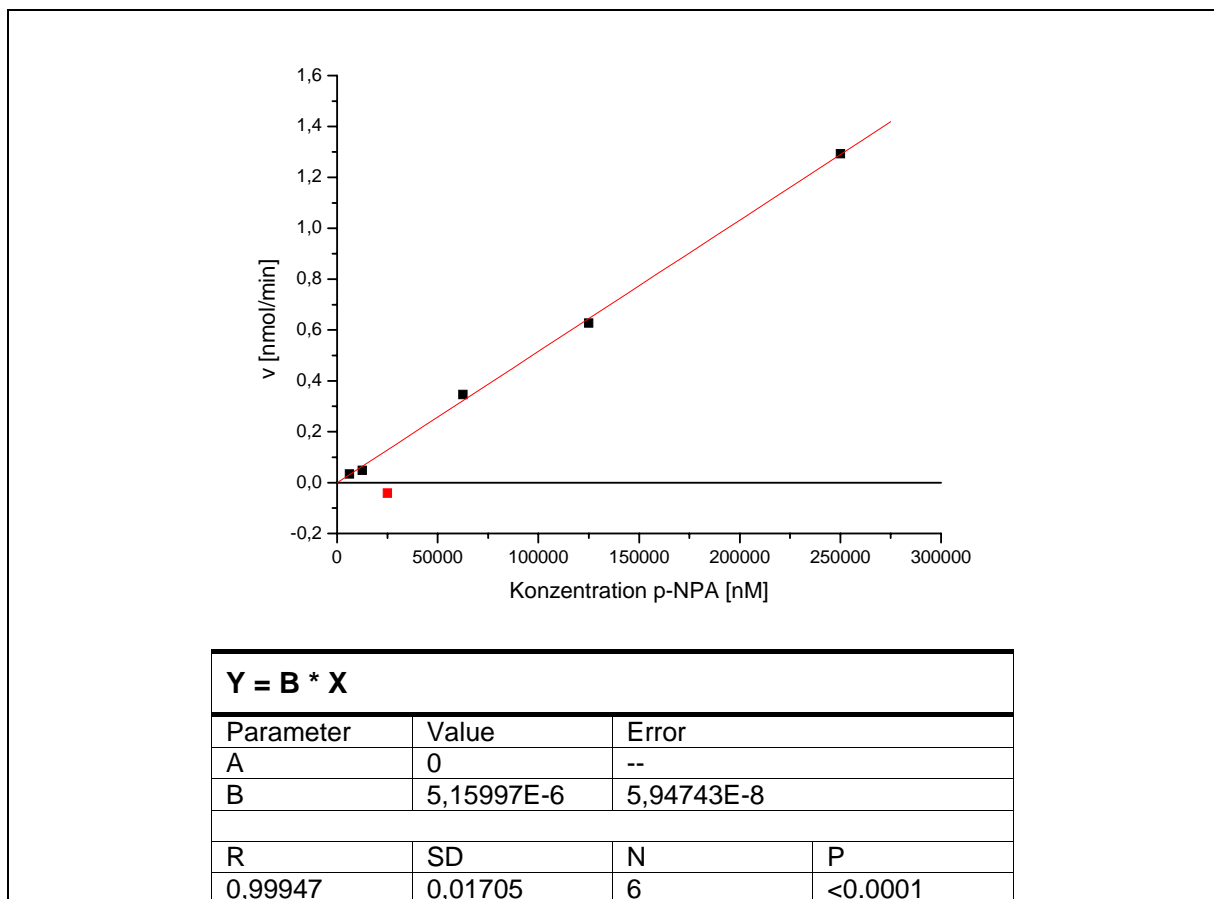


Diagramm III-5: Umsatzgeschwindigkeit der spontanen Hydrolyse (lineare Anpassung)

Bei der enzymkatalysierten Reaktion tritt die spontane Hydrolyse als Konkurrenzreaktion auf; um die tatsächliche Geschwindigkeit der Enzymreaktion zu ermitteln, wird die ermittelte durchschnittliche Geschwindigkeit der spontanen Hydrolyse bei der jeweiligen Substratkon-

zentration von den gemessenen Werten der enzymkatalysierten Reaktion abgezogen (korrigierte Umsatzgeschwindigkeit):

$$v_{\text{kor}} [p\text{-NPA}] = v_{(\text{Hydrolyse} + \text{Katalyse})} [p\text{-NPA}] - v_{\text{Hydrolyse}} [p\text{-NPA}] \quad (\text{III-6})$$

Aus den für beide Messreihen ermittelten Geschwindigkeiten der enzymkatalysierten Reaktion wird der Mittelwert gebildet.

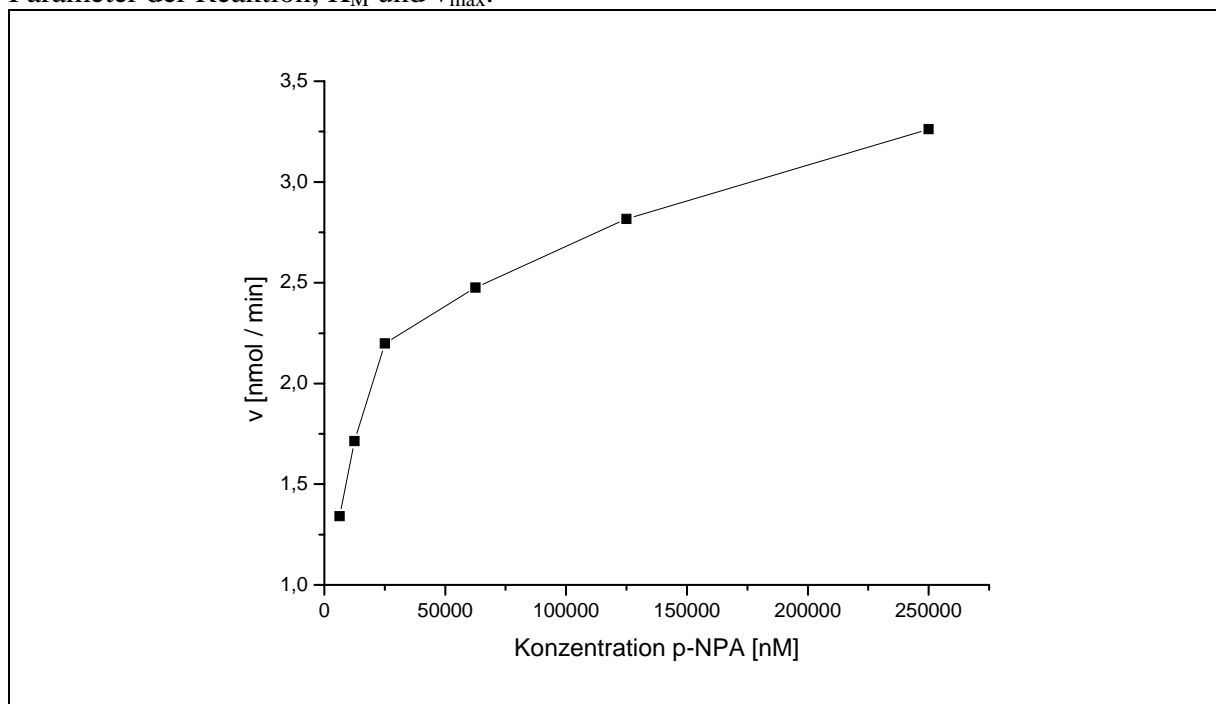
Tabelle III-10: Umsatzgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion

p-NPA im Ansatz (mM)	p-NPA in Küvette (mM)	Messung 1 $\Delta E/\Delta t$ (1/min)	Messung 1 $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	Messung 2 $\Delta E/\Delta t$ (1/min)	Messung 2 $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	korrigiert, gemittelt $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)
0,5	0,00625	0,01171	1,301	0,01243	1,381	1,309
1	0,0125	0,01443	1,603	0,01643	1,826	1,650
2	0,025	0,01957	2,174	0,02	2,222	2,069
5	0,0625	0,02114	2,349	0,02343	2,603	2,154
10	0,125	0,026	2,889	0,02471	2,746	2,172
20	0,25	0,03229	3,588	0,02643	2,937	1,972

Wie in der Theorie beschrieben, lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben; diese hat für den durchgeführten Versuch die Form

$$v = \frac{v_{\text{max}} [p\text{-NPA}]}{K_M + [p\text{-NPA}]} \quad (\text{III-7})$$

Durch Anpassung der Funktion an die gemessenen Werte erhalten wir die charakteristischen Parameter der Reaktion, K_M und v_{max} .



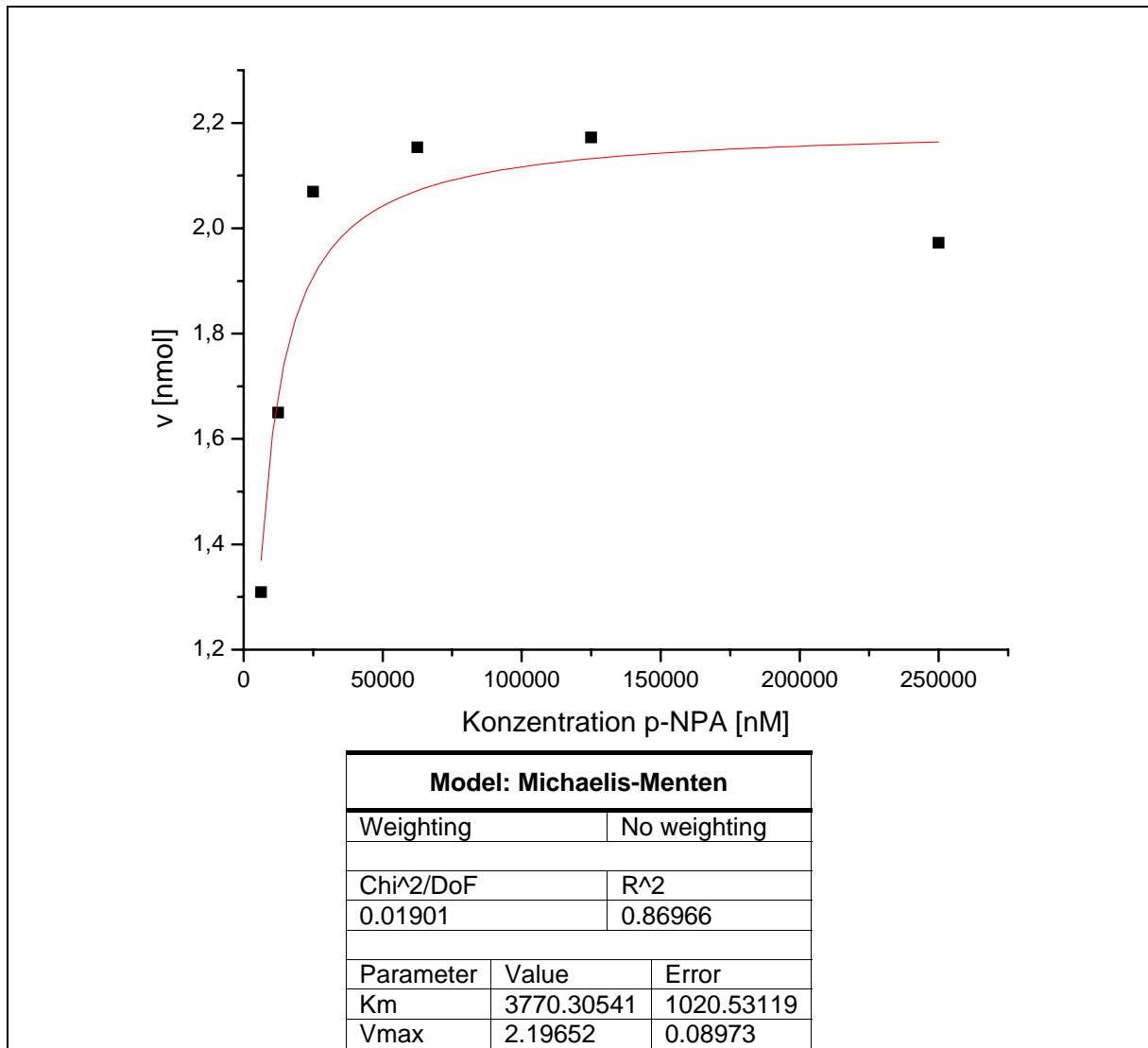


Diagramm III-6 (a/b): Anpassung der Umsatzgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten; a: unkorrigierte Werte; b: korrigierte Daten („wirkliche“ enzymatische Katalyse)

Anhand der Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung erhalten wir folgende Reaktionsparameter:

$$K_M = 3770.30541 \pm 1020,53119 \text{ [nM]}$$

$$v_{\max} = 2.19652 \pm 0,08973 \text{ [mol / min]}$$

3. Lineweaver-Burk-Auftragung

Eine alternative Möglichkeit zur Bestimmung der reaktionsspezifischen Parameter ist die doppelt reziproke Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Lineweaver-Burk. Die Gleichung für diese Auftragungsmethode hat die folgende Form und wir erhalten die folgenden Werte für die Auftragung.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[p-NPA]} \quad (\text{III-8})$$

Tabelle III-11: Transformation für Lineweaver-Burk

Werte der Michaelis-Menten-Auftragung		Werte für Lineweaver-Burk-Auftragung	
p-NPA in der Küvette [nM]	Korrigierte, gemittelte Geschwindigkeit [nmol/min]	1/S [nmol ⁻¹]	1/v [min/nmol]
6250	1,309	0,00016	7,64E-01
12500	1,650	0,00008	6,06E-01
25000	2,069	0,00004	4,83E-01
62500	2,154	0,000016	4,64E-01
125000	2,172	0,000008	4,60E-01
250000	1,972	0,000004	5,07E-01

Durch Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration wird folgendes Diagramm erhalten:

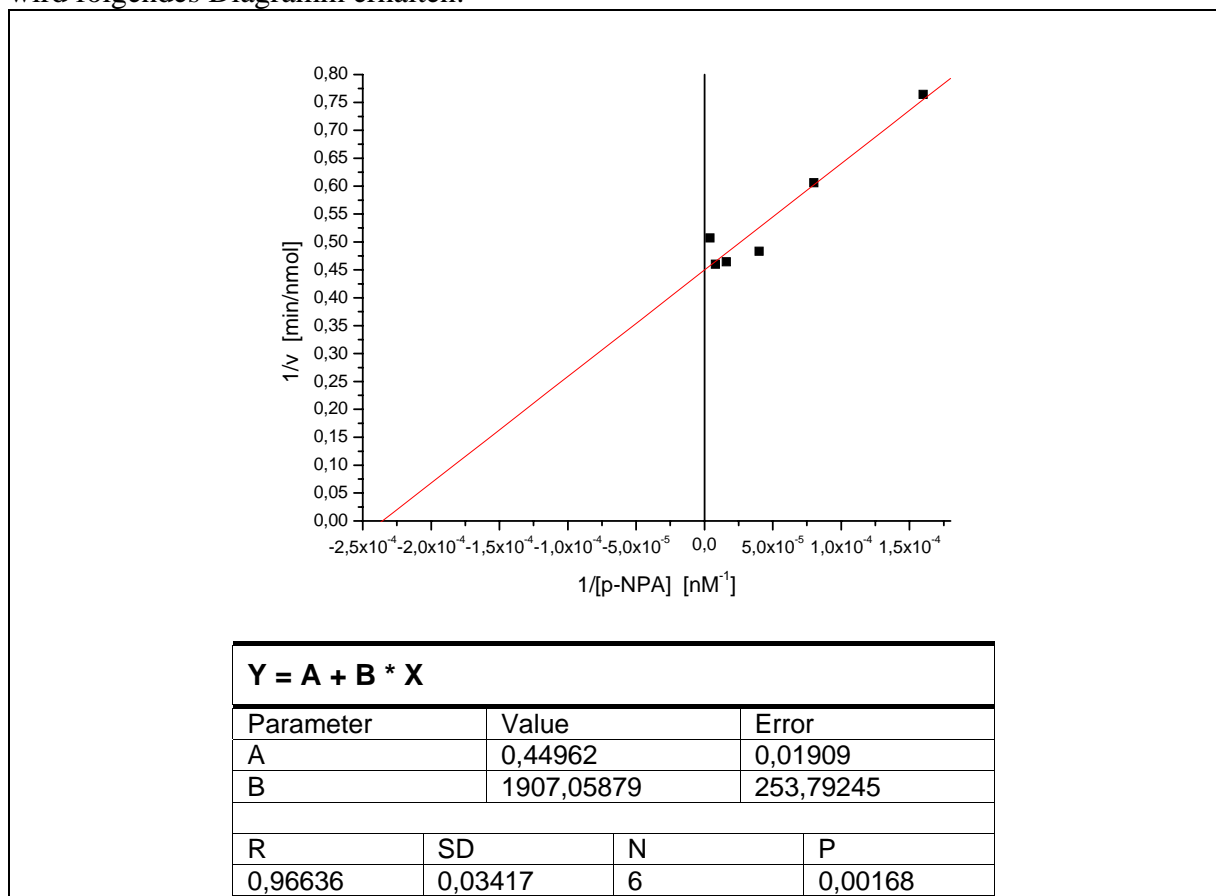


Diagramm III-7: Auftragung nach Lineweaver-Burk

Anhand des Diagramms lassen sich die Reaktionsparameter folgendermaßen berechnen:

$$v_{\max} = \frac{1}{A} \quad K_M = -\left[\frac{-B}{A}\right] \quad \frac{K_M}{v_{\max}} = B \quad (\text{III-9})$$

Wir erhalten daher die folgenden Reaktionsparameter:

$$\begin{aligned} K_M &= 4241,490 \quad \text{nM} \\ v_{\max} &= 2,224 \quad \text{nmol / min} \end{aligned}$$

Tabelle III-12: Vergleich der Auswertungsergebnisse Substratabhängigkeit

Methode	K_M [nM]	V_{max} [nmol / min]
Michaelis-Menten	3770,30541	2,19652
Lineweaver-Burk	4241,490	2,224
Abweichung	11,11 %	1,24 %

D. Auswertung 6 (Enzymabhängigkeit)

Zur Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen der Umsatzgeschwindigkeit und der Enzymkonzentration muss zuerst die Konzentration des in der Küvette vorhandenen Chymotrypsins bestimmt werden. Ausgehend von der in III.B mit Hilfe des Standards bestimmten Konzentration des Enzyms in der Chymo-Kinetik-Lösung (5,48 mg / ml) und dem Volumen der Lösung (2150 μ l) in der Küvette lässt sich die Chymotrypsin-Konzentration wie folgt bestimmen:

$$\begin{aligned}
 n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} &= \frac{m_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}}}{M_{\text{Protein}}} = \frac{c_{\text{Protein}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{M_{\text{Protein}}} \\
 c_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} &= \frac{n_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}}}{V_{\{\text{Küvette}\}}} = \frac{c_{\text{Protein}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{M_{\text{Protein}} V_{\{\text{Küvette}\}}} \\
 c_{\text{Protein}\{\text{Küvette}\}} &= \frac{5,483 \text{ mg/ml} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{25000 \text{ g/mol} \cdot 2175 \mu\text{l}} \quad \text{(III-10)} \\
 &= \frac{5,483 \text{ g/l} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{25000 \cdot 10^{-9} \text{ g/nmol} \cdot 2175 \mu\text{l}} \\
 &= 100,84 \frac{\text{nmol}}{\text{l}} \frac{V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{\mu\text{l}}
 \end{aligned}$$

Tabelle III-13: Chymotrypsin-Konzentration der Ansätze

Ansatz	Volumen „Chymo-Kinetik“ (μ l)	Masse Chymotrypsin (mg)	Stoffmenge Chymotrypsin (nmol)	Konzentration Chymotrypsin (nmol/l)
1	0	0	0	0
2	60	0,329	13,158	6049,798
3	120	0,658	26,317	12099,595
4	180	0,987	39,475	18149,393
5	240	1,316	52,633	24199,191
6	300	1,645	65,792	30248,988

Unter Berücksichtigung dieser Konzentrationen lassen sich für beide Messreihen Extinktions-Zeit-Diagramme zeichnen, welche die Enzymkonzentration als Parameter besitzen.

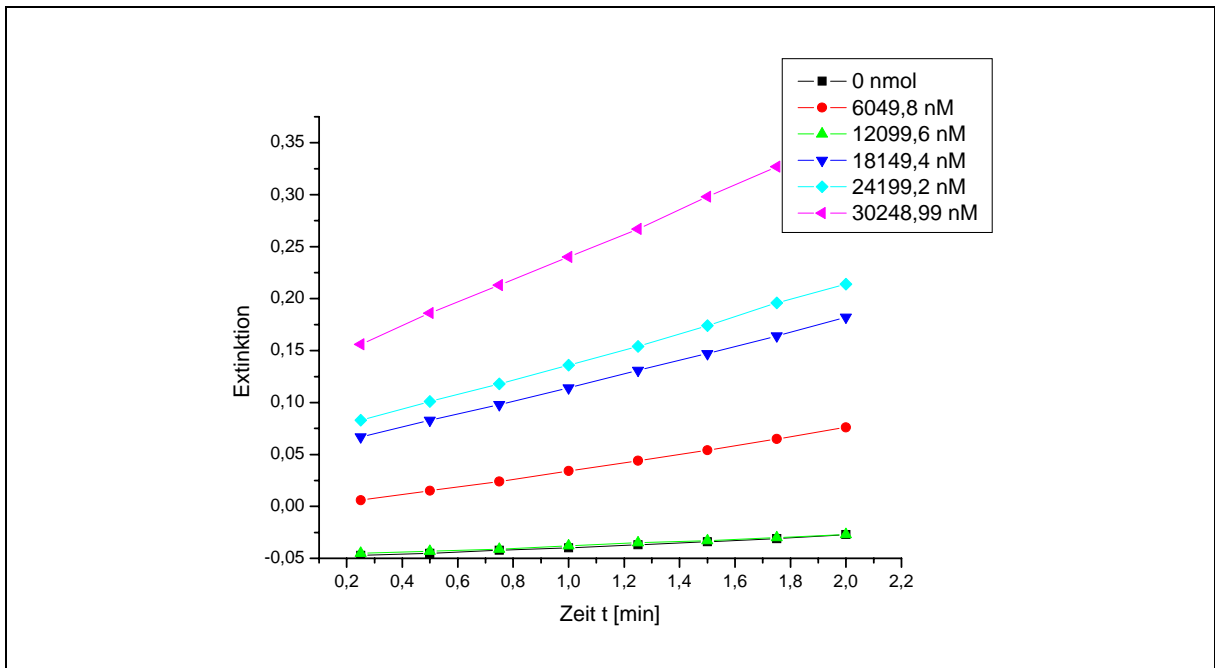


Diagramm III-8: Enzymabhängigkeit (Messreihe 1)

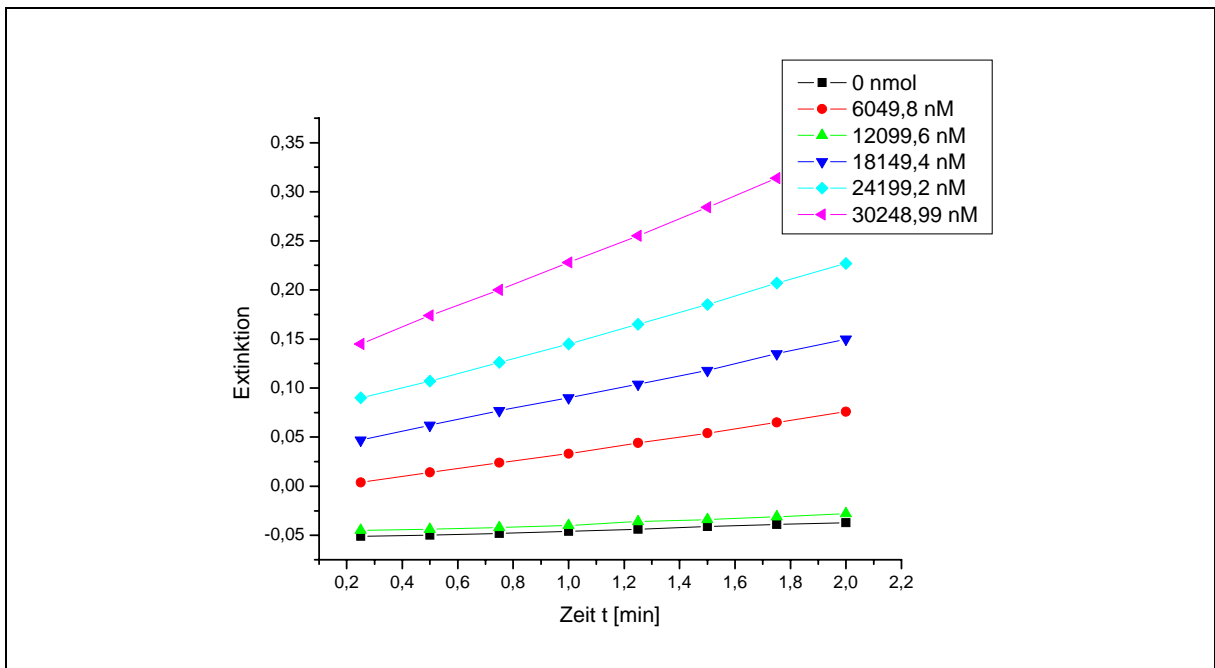


Diagramm III-9: Enzymabhängigkeit (Messreihe 2)

Hier zeigt sich, dass offenbar zu beiden dritten Ansätzen kein Chymotrypsin zugegeben wurde, da die Extinktion(-änderungen) mit Ansatz 1 (Leerwert) vergleichbar sind, sie werden in der Auswertung daher nicht berücksichtigt.

Analog zu III.C.2 lässt sich die Umsatzgeschwindigkeit aus den (mit Hilfe von linearer Regression bestimmten) durchschnittlichen Extinktionsänderungen berechnen.

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta E_{405}}{\Delta t} \frac{V}{\epsilon_{405} d} = B \frac{2175 \mu\text{l}}{18 (\text{mmol/l})^{-1} \text{cm}^{-1} 1 \text{cm}} / \text{min} \\
 &= B \frac{2,175 \cdot 10^{-3}}{18} \text{mmol} / \text{min} = B \frac{2,175 \cdot 10^3}{18} \text{nmol} / \text{min}
 \end{aligned}
 \tag{III-11}$$

Durch Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse – durch Ansatz 1 (Leerwert) ermittelt – lässt sich abermals die tatsächliche Umsatzgeschwindigkeit der enzymatischen Katalyse analog zu Gleichung (III-6) berechnen („korrigiert“).

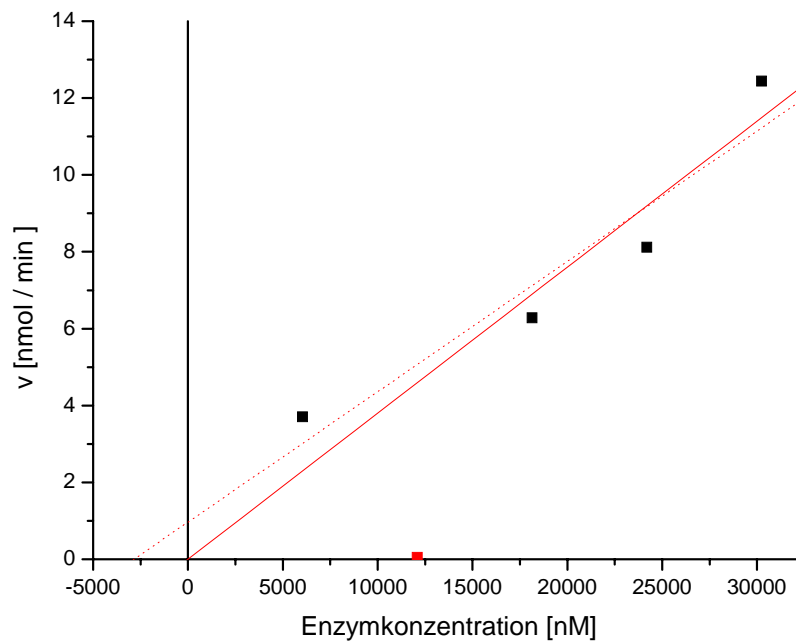
Tabelle III-14: Durchschnittliche zeitabhängige Extinktionsänderung

Ansatz	Konzentration Chymotrypsin (nmol/l)	Messreihe 1 $\Delta E/\text{min}$ (1/min)	Messreihe 2 $\Delta E/\text{min}$ (1/min)
1	0	0,01129	0,00838
2	6049,798	0,04	0,04095
3	12099,595	0,01038	0,0101
4	18149,393	0,06543	0,05824
5	24199,191	0,07514	0,07886
6	30248,988	0,114	0,11162

Tabelle III-15: Umsatzgeschwindigkeit der enzymabhängigen Reaktion (Enzymabhängigkeit)

Konzentration Chymotrypsin (nmol/l)	Messreihe 1 $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	Messreihe 2 $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	Mittelwert $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	korrigierter Mittelwert $\Delta n/\Delta t$ (nmol/min)	Std.-Abw. vom korr. Mittelwert (nmol/min)
0	1,364	1,013	1,188	0	-
6049,798	4,833	4,948	4,891	3,702	0,233
12099,595	1,254	1,220	1,237	0,049	0,159
18149,393	7,906	7,037	7,472	6,283	0,259
24199,191	9,079	9,529	9,304	8,116	0,401
30248,988	13,775	13,487	13,631	12,443	0,032

Die Auftragung der korrigierten Umsatzgeschwindigkeit gegen die Enzymkonzentration liefert das folgende Diagramm, in welchem die Regression mit einer Nullpunktsgerade sinnvoller ist, da aufgrund der Korrektur (Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse) die Umsatzgeschwindigkeit der Reaktion bei nicht vorhandenem Enzym tatsächlich gleich null sein sollte.



Y = A + B * X			
Parameter	Value	Error	
A	0,96496	1,65779	
B	3,39292E-4	7,67422E-5	
R	SD	N	P
0,95246	1,37334	4	0,04754

Y = B * X			
Parameter	Value	Error	
A	0	--	
B	3,79949E-4	2,80666E-5	
R	SD	N	P
0,95246	1,2126	4	0,0157

Diagramm III-10: Enzymabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit

E. Auswertung 6/7 (spezifische Aktivität und Wechselzahl)

1. Aktivität

Die Aktivität eines Enzyms ist im SI definiert mit der Größe "katal" als die Stoffmenge des Enzyms, die 1 mol Substrat pro Sekunde umsetzt; da diese Größe meist einen kleinen Zahlenwert besitzt, kann die Aktivität alternativ auch mit der Einheit "Unit (U)" angegeben werden.

$$1 \text{ kat(katal)} = 1 \text{ mol/s}$$

$$1 \text{ U(Unit)} = 1 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

$$= 16,7 \text{ nkat}$$

(III-12)

Für die Bestimmung der Aktivität benötigen wir die in III.C bestimmte maximale Geschwindigkeit (nach Lineweaver-Burk), woraus sich direkt die Aktivität ableiten lässt:

$$\begin{aligned} v_{\max} &= 2,224 \text{ nmol/min} = 2,224 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol/min} \\ \text{Aktivität} &= 2,224 \cdot 10^{-3} \text{ U} \\ &= 0,037 \text{ nkat} \end{aligned} \quad (\text{III-13})$$

Die spezifische Aktivität ist als Aktivität pro mg Enzym definiert, für 25 μl erhalten wir mit der in III.B bestimmten Konzentration von Chymo-Kinetik eine Enzymmasse von

$$\begin{aligned} m_{\{\text{Enzym}\}} &= c_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}} V_{\{\text{Probeflösung}\}} \\ &= 5,483 \text{ mg/ml} \cdot 25 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \\ &= 0,137 \text{ mg} \end{aligned} \quad (\text{III-14})$$

Damit erhalten wir die folgende spezifische Aktivität:

$$\begin{aligned} \text{spez. Aktivität} &= \frac{0,037 \text{ nkat}}{0,137 \text{ mg}} = 0,27 \text{ nkat/mg} \\ &= \frac{2,224 \cdot 10^{-3} \text{ U}}{0,137 \text{ mg}} = 0,016 \text{ U/mg} \end{aligned} \quad (\text{III-15})$$

2. Wechselzahl

Die Wechselzahl (turnover number) gibt die Anzahl Substratmoleküle an, die bei vollständig gesättigtem Enzym pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden und entspricht der Konstanten k_2 aus Gleichung (I-2). Ist die Gesamtkonzentration des Enzyms bzw. der aktiven Zentren bekannt, so ergibt sich die Wechselzahl aus der Maximalgeschwindigkeit (bestimmt in III.C):

$$k_2 = \frac{v_{\max}}{[E]_0} \quad (\text{III-16})$$

Die Enzymgesamtkonzentration in der substratabhängigen Katalysereaktion lässt sich anhand folgender Gleichung ermitteln:

$$[E]_0 = \frac{n_{\{\text{Enzym}\}\{\text{Küvette}\}}}{V_{\{\text{Küvette}\}}} = \frac{m_{\{\text{Enzym}\}\{\text{Küvette}\}}}{M_{\{\text{Protein}\}} V_{\{\text{Küvette}\}}} = \frac{c_{\{\text{Protein}\}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}}{M_{\{\text{Protein}\}} V_{\{\text{Küvette}\}}} \quad (\text{III-17})$$

Setzen wir diesen Ausdruck in die obige Gleichung (III-16) ein, so erhalten wir die (noch vom Volumen abhängige) Geschwindigkeitskonstante k_2 :

$$\begin{aligned} k_2 &= \frac{v_{\max}}{[E]_0} = v_{\max} \cdot \frac{M_{\{\text{Protein}\}} V_{\{\text{Küvette}\}}}{c_{\{\text{Protein}\}\{\text{Chymo-Kinetik}\}} V_{\{\text{Chymo-Kinetik}\}}} \\ &= \frac{2,224}{60} \text{ nmol/s} \cdot \frac{25000 \text{ mg/mmol} \cdot 2 \text{ ml}}{5,483 \text{ mg/ml} \cdot 25 \cdot 10^{-3} \text{ ml}} = 0,0014 \text{ ml/s} \end{aligned} \quad (\text{III-18})$$

Wird durch das Küvettenvolumen geteilt, finden wir die Wechselzahl:

$$k_2 = \frac{0,0014 \text{ ml}}{V_{\text{Küvette}} \text{ s}} = \frac{0,0014}{2} \text{ s}^{-1} = 0,0007 \text{ s}^{-1} \quad (\text{III-19})$$

Eine alternative Möglichkeit zur Bestimmung der Wechselzahl ist die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Enzymkonzentration analog zu Diagramm III-10, die Wechselzahl ergibt sich dann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden.

Tübingen, am 20.10.2003

(Martin Thunemann)

(Natalie Leiprecht)

(Thorsten Barth)