

Arbeitsmodul 1

Enzymkinetik

Gruppe 11:

Nadja Lenkova	(01607637)
Oliver Maier	(01609135)
David Raese	(01628909)
Benjamin Schmidbauer	(01616152)
Markus Seling	(01629211)
Florian Steiner	(01610962)

Datum: 25.11.18

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Durchführung	4
3	Datenauswertung	5
3.1	Daten	5
3.2	Konzentrations-Zeit-Diagramm	6
3.3	Reaktionsgeschwindigkeiten	8
3.4	Michaelis-Menten Diagramm	8
3.5	Lineweaver-Burk Diagramm	9
3.5.1	Ermittlung des Inhibitor Typs	10
3.6	Dixon-Plot, Bestimmung der Inhibitorkonstante	10
3.7	Bestimmung der turnover number (k_{cat}), der katalytischen Effizienz (k_1) und der spezifischen Aktivität	10
3.7.1	turnover number (k_{cat})	10
3.7.2	katalytische Effizienz	11
3.7.3	spezifische Aktivität	11
4	Diskussion	11
	Literatur	12

1 Einleitung

Die Aufgabe dieses Moduls bestand darin, eine enzymkinetische Studie durchzuführen. Solche Studien geben über mehrere Parameter (K_M , K_{cat} , v_{max}) Aufschluss, welche dann z.B. für die Suche nach neuen Arzneimitteln oder die mechanistische Aufklärung von Enzymen genutzt werden können. Bei enzymkatalysierten Reaktionen geht man davon aus, dass ein Enzym mit einem Substrat reagiert, dabei bildet sich ein Enzymsubstratkomplex, welcher dann das Substrat zum Produkt umsetzt. Diese Reaktionen sind in jedem Schritt reversibel.



Zu Vereinfachung wird die Reaktionsgeschwindigkeit nahe dem Zeitpunkt Null (v_0) betrachtet, da hier angenommen werden kann, dass die Rückreaktion von Enzym und Produkt zum Enzymsubstratkomplex noch nicht in nennenswertem Umfang stattfindet.



Daher wird im ersten Versuch v_0 für mehrere Substratkonzentrationen in der Anfangsphase, wenn sich noch kaum Produkt gebildet hat, gemessen.

Dafür wird eine APase (Phosphatase) mit einem Modellsubstrat (*para*-Nitrophenylphosphat) zu einem bei 405nm photometrisch detektierbaren Produkt (*para*-Nitrophenol) umgesetzt (Abbildung 1). Bei drei weiteren Versuchen wird noch anionisches Phosphat zur Inhibierung mit verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Durch diese Messungen kann mit dem Michaelis-Menten Diagramm und weiteren Berechnungen dann auf die Geschwindigkeit v der Reaktion, den K_M -Wert, welcher ein Maß für die Stabilität des Enzymsubstratkomplexes ist, den Inhibitortypen, die turnover number (k_{cat}) und weitere Parameter geschlossen werden.

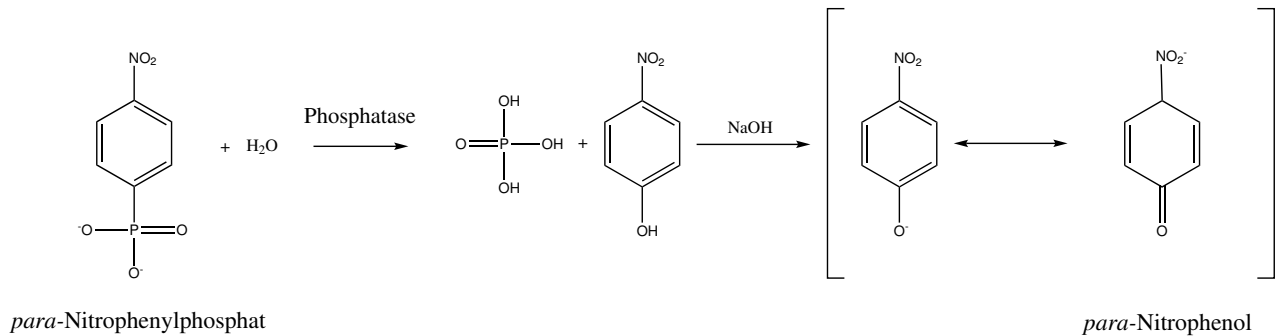


Abbildung 1: Diese Abbildung zeigt, welche Reaktionen hauptsächlich stattfinden

2 Durchführung

Zur Durchführung wurden alle Teilnehmer in zwei Gruppen eingeteilt und Anschließend wurden die enzymkinetischen Bestimmungen wie im Script (*Enzymkinetik der Sauren Phosphatase*, 2018) angegeben, durchgeführt.

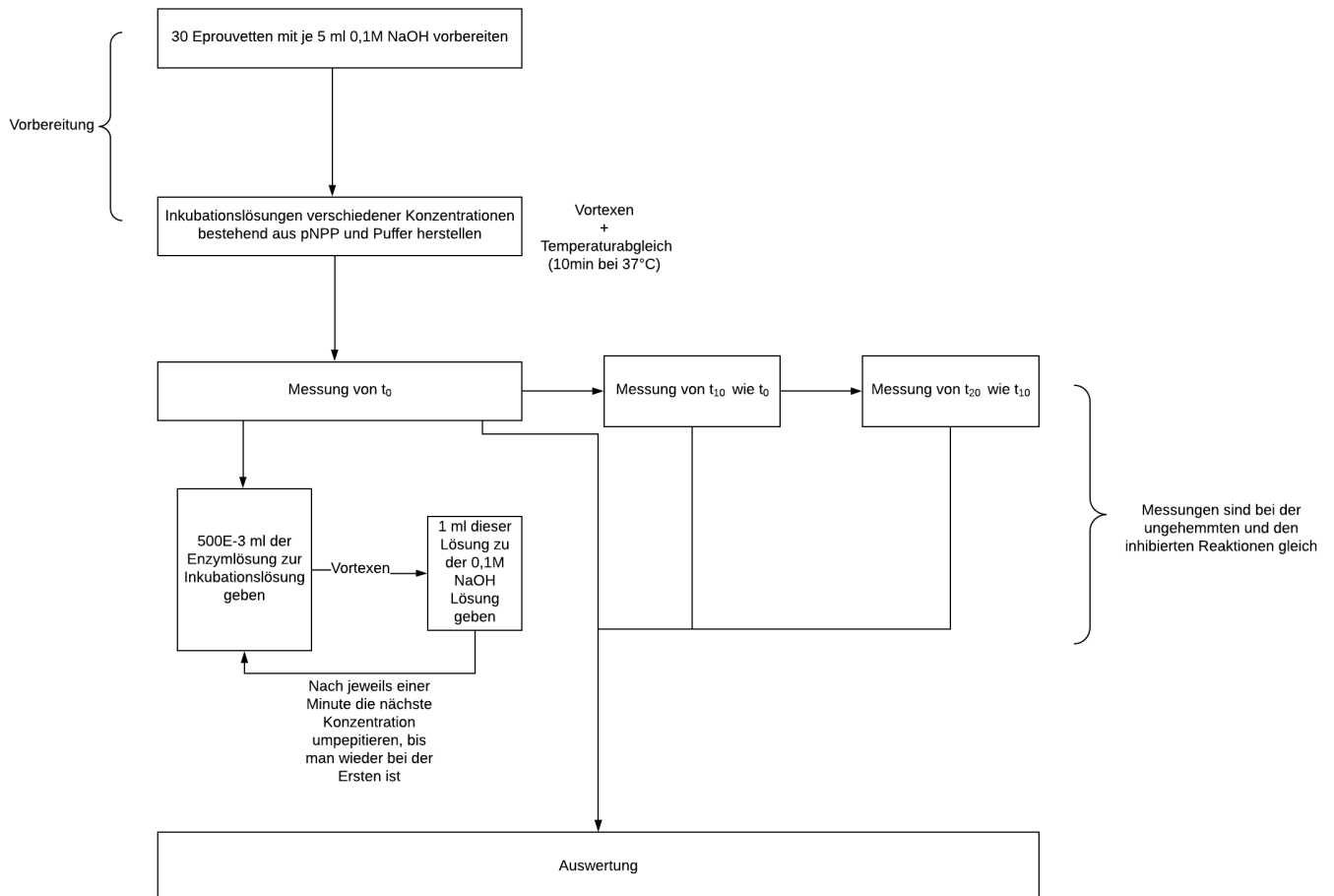


Abbildung 2: Flowchart zur Veranschaulichung der einzelnen Arbeitsschritte

3 Datenauswertung

3.1 Daten

In diesem Unterabschnitt sind alle erhaltenen Messungen abgebildet.

Tabelle 1: Ungehemmt

$V_{pNPP}[\mu l]$	$V_{Puffer}[ml]$	$Abs_{t=0}$	$Abs_{t=10}$	$Abs_{t=20}$
0	4,5	0	0	0
30	4,47	0,006	0,097	0,156
50	4,45	0,008	0,109	0,173
100	4,4	0,009	0,211	0,37
200	4,3	0,017	0,257	0,474
300	4,2	0,011	0,345	0,611
500	4	0,02	0,375	0,698
700	3,8	0,033	0,451	0,84
1000	3,5	0,026	0,434	0,868
1000	4	0,026	0,028	0,28

Die letzte Lösung ($V_{pNPP} = 1000\mu l$ und $V_{Puffer} = 4ml$) wird gemacht, um zu schauen ob das Substrat nicht von sich aus zerfällt und wird in allen weiteren Berechnungen nicht mehr beachtet

Tabelle 2: 5 mM Inhibiert

$V_{pNPP}[\mu l]$	$V_{Puffer}[ml]$	$V_{Inhibitor}$	$Abs_{t=0}$	$Abs_{t=10}$	$Abs_{t=20}$
0	4,3	200	0	0	0
30	4,27	200	-0,02	0,07	0,112
50	4,25	200	0	0,073	0,151
100	4,2	200	-0,02	0,102	0,291
200	4,1	200	0,008	0,207	0,349
300	4	200	0,016	0,245	0,421
500	3,8	200	0,018	0,285	0,57
700	3,6	200	0,016	0,32	0,629
1000	3,3	200	0,017	0,353	0,688

Tabelle 3: 50 mM Inhibiert

$V_{pNPP}[\mu l]$	$V_{Puffer}[ml]$	$V_{Inhibitor}$	$Abs_{t=0}$	$Abs_{t=10}$	$Abs_{t=20}$
0	4,3	200	0	0	0
30	4,27	200	0,024	0,03	0,074
50	4,25	200	0,011	0,026	0,09
100	4,2	200	0,01	0,04	#
200	4,1	200	0,01	0,077	0,137
300	4	200	0,017	0,138	0,293
500	3,8	200	0,023	0,185	0,295
700	3,6	200	0,024	0,136	0,319
1000	3,3	200	0,03	0,199	0,449

Bei der vierten $Abs_{t=20}$ Messung hat die Kolbenhuppipette Flüssigkeit verloren, daher konnte dieser Wert nicht vermessen werden

Tabelle 4: 50 mM Inhibiert

$V_{pNPP}[\mu l]$	$V_{Puffer}[ml]$	$V_{Inhibitor}$	$Abs_{t=0}$	$Abs_{t=10}$	$Abs_{t=20}$
0	4,3	200	0	0	0
30	4,27	200	0,005	0,016	0,014
50	4,25	200	-0,001	0,01	0,015
100	4,2	200	0	0,022	0,033
200	4,1	200	0,001	0,028	0,078
300	4	200	0,005	0,055	0,117
500	3,8	200	0,016	0,112	0,194
700	3,6	200	0,012	0,084	0,119
1000	3,3	200	0,032	0,172	0,277

3.2 Konzentrations-Zeit-Diagramm

Da die Absorptionen des Produktes mit Hilfe eines Photometers gemessen worden sind, wird die Lambert-Beer Gleichung umgeformt, um die einzelnen Konzentrationen zu erhalten. Dabei wird der Verdünnungsfaktor miteinbezogen.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = F \cdot \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (3)$$

A... Absorption

ϵ ... molarer Extinktionskoeffizient [$\epsilon = 1,88 \cdot 10^4 \frac{l}{mol \cdot cm}$]

d... Schichtdicke [1cm]

c... Konzentration [$\frac{nmol}{ml}$]

F... Verdünnungsfaktor [$F = 6$]

Dadurch, dass die Zeit und die Konzentrationen graphisch aufgetragen werden, werden die Reaktionsgeschwindigkeit der jeweiligen Substratkonzentration ermittelt.

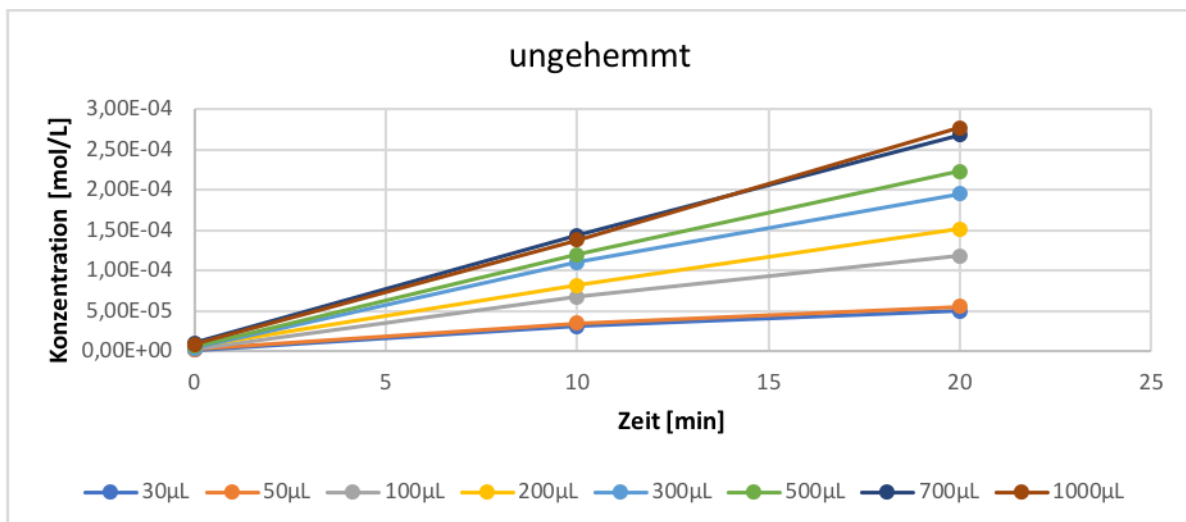


Abbildung 3: ungehemmtes Substrat

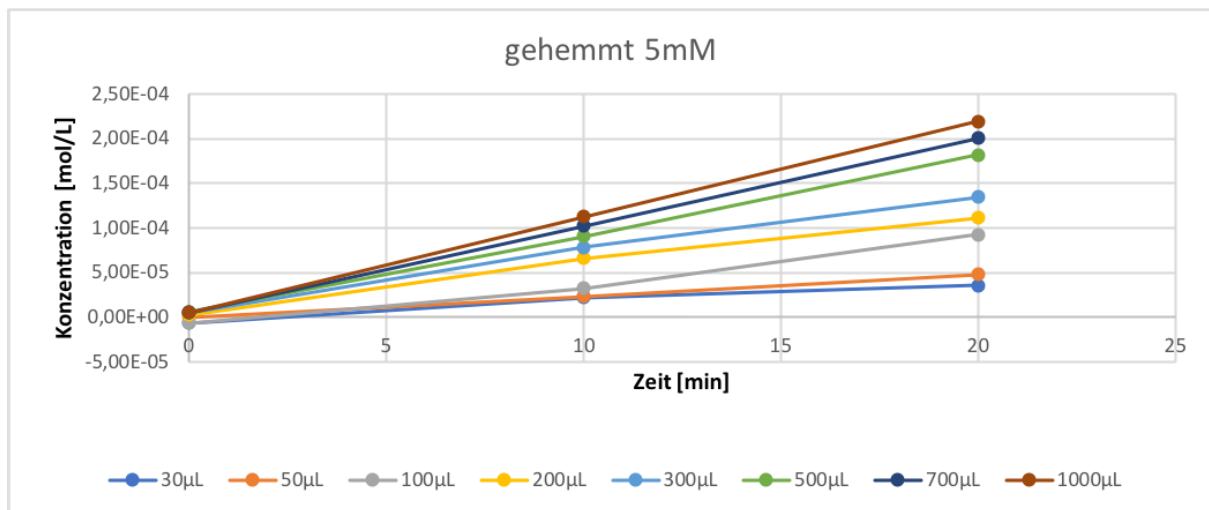


Abbildung 4: Substrat mit 5mM Inhibitorlösung

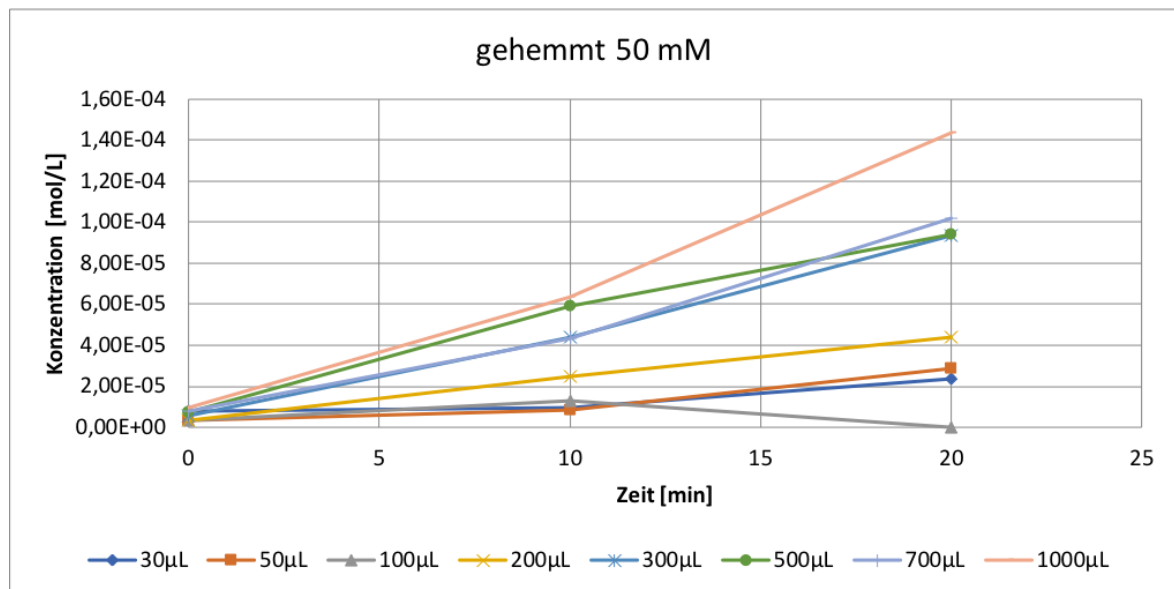


Abbildung 5: Substrat mit 50mM Inhibitorlösung

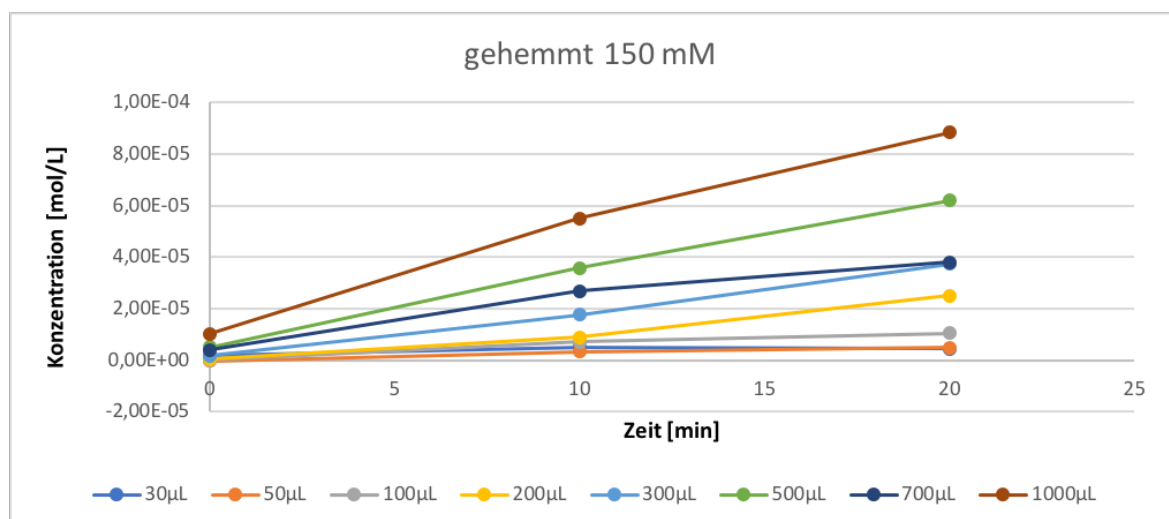


Abbildung 6: Substrat mit 150mM Inhibitorlösung

3.3 Reaktionsgeschwindigkeiten

Um die Anfangsgeschwindigkeiten zu erhalten, ermittelt man die Steigung der Gerade welche die Zunahme der Konzentration über die Zeit widerspiegelt. Für die Reaktionen ungehemmt und gehemmt 150 mM wurden dafür die Werte der Konzentration bei 0 und 10 Minuten, bei gehemmt 50 mM und gehemmt 5 mM die Werte der Konzentration bei 0 und 20 min herangezogen.

Tabelle 5: Anfangsgeschwindigkeiten verschiedener Konz. und Inhibierungen

Substratlösungen	v_{0_1}	v_{0_2}	v_{0_3}	v_{0_4}
30 μ l	2,9E+00	2,9E-06	1,4E+00	-6,4E-02
50 μ l	3,2E+00	3,9E+00	2,0E+00	1,6E-01
100 μ l	6,4E+00	6,0E+00	-	3,5E-01
200 μ l	7,7E+00	6,4E+00	1,9E+00	1,6E+00
300 μ l	1,1E+01	7,3E+00	4,9E+00	2,0E+00
500 μ l	1,1E+01	8,5E+00	3,5E+00	2,6E+00
700 μ l	1,3E+01	9,7E+00	5,8E+00	1,1E+00
1000 μ l	1,3E+01	1,1E+01	8,0E+00	3,4E+00

Dabei steht v_{0_1} für die Geschwindigkeit t_0 bis t_{10} der ungehemmten, v_{0_2} für die Geschwindigkeit t_0 bis t_{10} der 5mM inhibierten, v_{0_3} für die Geschwindigkeit t_{10} bis t_{20} der 50mM inhibierten und v_{0_4} für die Geschwindigkeit t_{10} bis t_{20} der 150mM inhibierte Reaktion. Die Einheit aller Werte ist $[\frac{nm}{ml \cdot min}]$.

Die Anfangsgeschwindigkeiten bilden eine Grundlage für das Michaelis-Menten Diagramm, Lineweaver-Burk Diagramm und den Dixon Plot.

3.4 Michaelis-Menten Diagramm

Für das Michaelis-Menten Diagramm werden die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration graphisch aufgetragen. Dadurch kann man die Maximalgeschwindigkeit v_{max} und die Michaelis-Menten Konstante K_m ermitteln.

Die Maximalgeschwindigkeit entspricht dem Wert der Geschwindigkeit der Asymptote. Um die Michaelis-Menten Konstante K_m zu erhalten, wird die Maximalgeschwindigkeit halbiert und bei dem Wert die Substratkonzentration geschätzt. Sie entspricht der Michaelis-Menten Konstante.

$$K_M = \frac{v_{max}}{2} \quad (4)$$

Maximalgeschwindigkeit als auch die Michaelis-Menten Konstante K_m wurden händisch abgelesen (geschätzt).

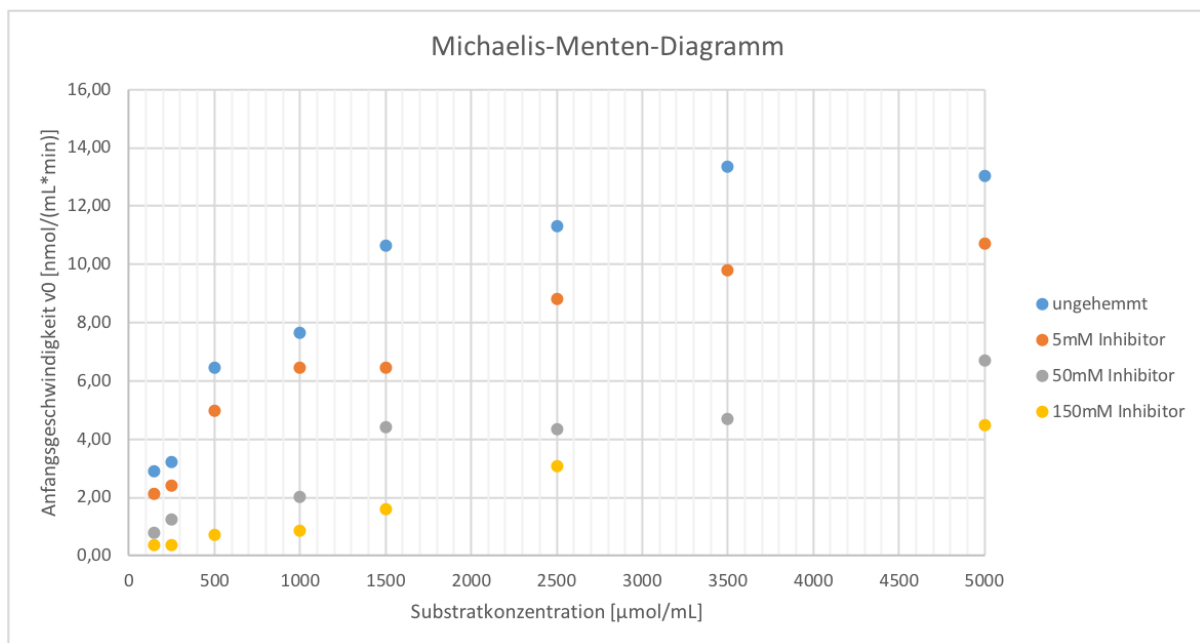


Abbildung 7: Michaelis-Menten-Diagramm

Anmerkung: Entfernt wurden bei dem Diagramm folgende Werte, die als Ausreißer gelten:

100 μl bei 50 mM kein Wert, da die Spitze der Kolbenhuppipette ausgelaufen ist

700 μl bei 150 mM Ausreißer

3.5 Lineweaver-Burk Diagramm

Das Lineweaver-Burk Diagramm ist eine andere Methode, um die Michaelis-Menten Konstante K_M als auch die Maximalgeschwindigkeit v_{max} zu ermitteln. Dabei werden die Anfangsgeschwindigkeit gegen Substratkonzentration jeweils reziprok ($\frac{1}{v}$; $\frac{1}{[S]}$) aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der y-Achse entspricht $\frac{1}{v_{max}}$ und der Schnittpunkt mit der x-Achse ist $\frac{-1}{K_M}$. Die Parameter wurden ebenfalls wie beim Michaelis-Menten Diagramm händisch geschätzt.

Anmerkung: Die gleichen Ausreißer (siehe MM Diagramm) wurden auch in diesem Diagramm nicht berücksichtigt

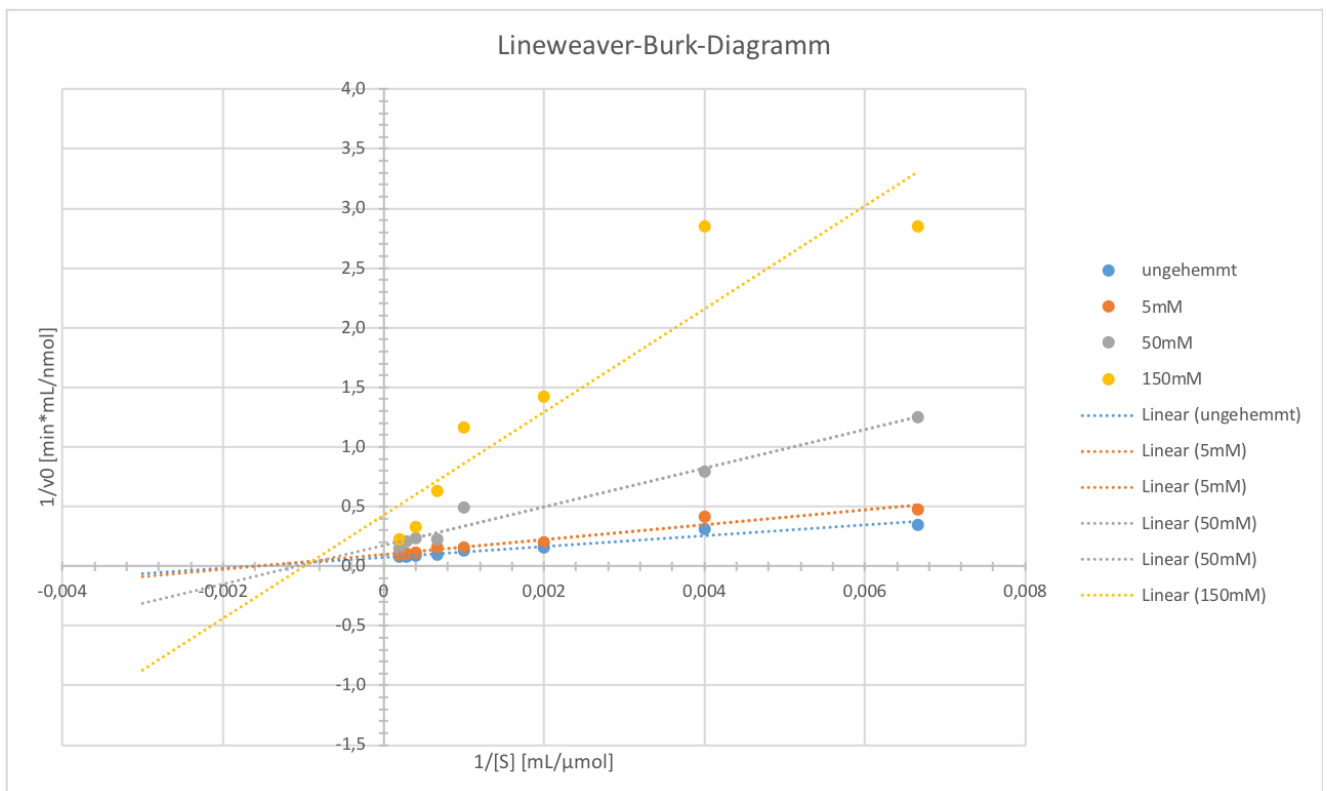


Abbildung 8: Lineweaver-Burk Diagramm

In der folgenden Tabelle werden die Parameter beider Methoden gegenüber gestellt:

Tabelle 6: Michaelis-Menten vs Lineweaver-Burk

	Michaelis-Menten		Lineweaver-Burk	
	v_{max}	K_M	v_{max}	K_M
ungehemmt	13,8	720	11,1	720
5mM	11,1	1400	10	720
50mM	6,8	1250	5,3	910
150mM	4,8	1950	2,8	1000

Vergleich der erhaltenen Werte v_{max} und K_M über die beiden Bestimmungsarten. Links sind die Werte die man mit der Michaelis-Menten Auftragung bekommt und rechts die, die man über das Lineweaver-Burk Diagramm erhält

3.5.1 Ermittlung des Inhibitorstyps

Darüber hinaus gibt das Lineweaver-Burk Diagramm Auskunft über den Inhibitorstyp des Inhibitors. In diesem Fall handelt es sich um eine Mischung aus kompetitivem und nicht-kompetitivem Inhibitor, da weder die Maximalgeschwindigkeit noch die Michaelis-Menten Konstante über die Konzentration konstant bleiben.

3.6 Dixon-Plot, Bestimmung der Inhibitorkonstante

Um die Inhibitorkonstante K_I zu ermitteln, wird die reziproke Anfangsgeschwindigkeit gegen die Inhibitor-konzentration für die Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Inhibitor-konzentration beim Schnittpunkt der Geraden entspricht der Inhibitorkonstante K_I und diese wurde händisch abgeschätzt. Anmerkung: $30\mu\text{l}$ und $50\mu\text{l}$ Geraden wurden aufgrund großer Abweichungen entfernt.

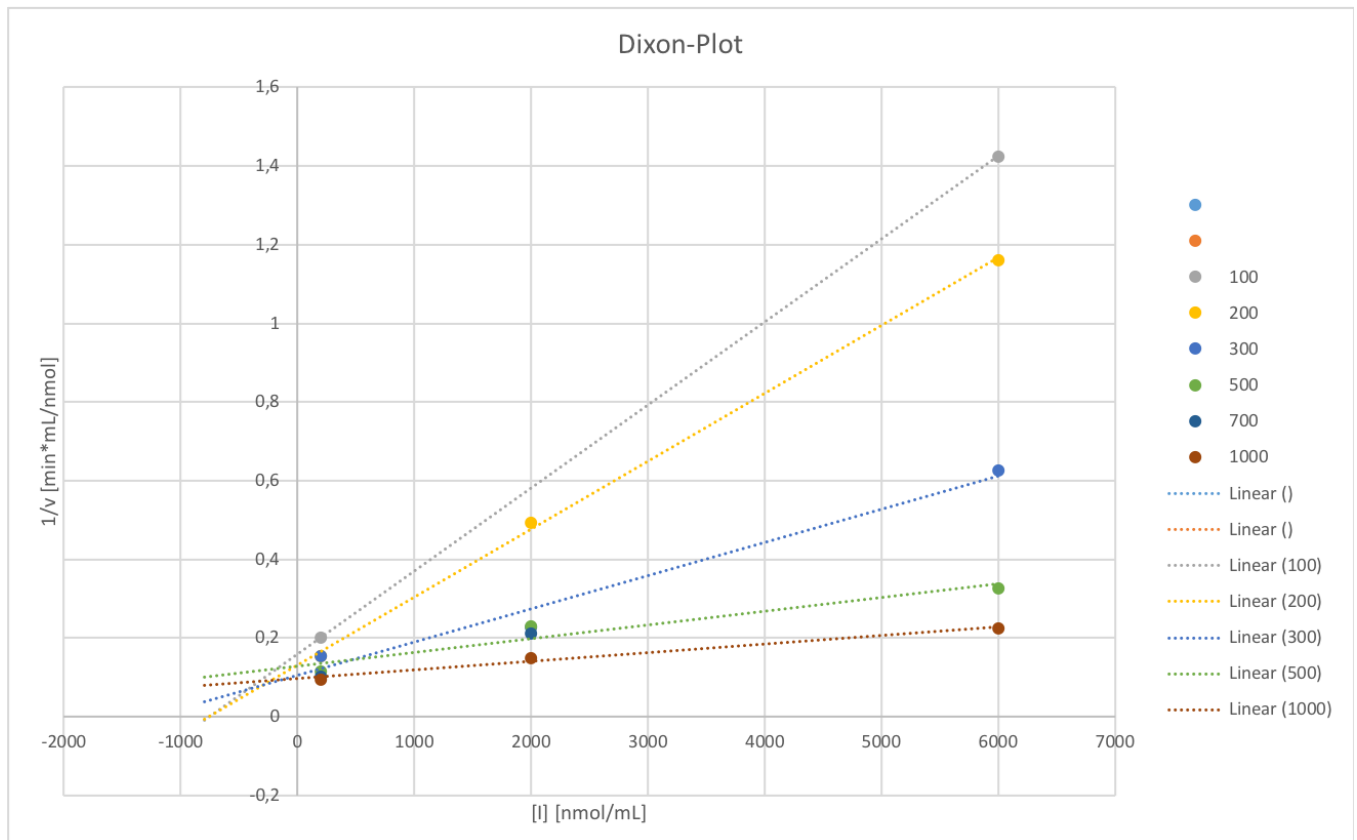


Abbildung 9: Dixon-Plot

Da im Diagramm nicht ein exakter Schnittpunkt auftritt, liegt die Inhibitorkonstante in einem Intervall ($200\text{-}300 \frac{\text{nmol}}{\text{mL}}$).

Anmerkung: Verdünnung wurde berücksichtigt.

3.7 Bestimmung der turnover number (k_{cat}), der katalytischen Effizienz (k_1) und der spezifischen Aktivität

3.7.1 turnover number (k_{cat})

Die Wechselzahl ist ein Maß für die Anzahl von Formelumsätzen in einer gewissen Zeit in einer Katalyse, die ein Katalysator beschleunigen kann. Die turnover number wird ermittelt, indem man die Maximalgeschwindigkeit durch die Enzymkonzentration dividiert wird. Dabei wird die uninhibierte Reaktion aus dem Michaelis-Menten Diagramm für die Berechnung entnommen.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]} = \frac{13,8 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]}{1,8 \cdot 10^{-8} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]} \quad (5)$$

$$k_{cat} = 7,8 \cdot 10^2 \text{ min}^{-1}$$

$k_{cat}...$	turnover number $[min^{-1}]$	
$v_{max}...$	Maximalgeschwindigkeit $[\frac{nmol}{ml \cdot min}]$	$v_{max} = 13,8 \frac{nmol}{ml \cdot min}$
$E...$	Enzymkonzentration $[\frac{mol}{l}]$	$[E] = 1,8 \cdot 10^{-8} \frac{mol}{l}$

3.7.2 katalytische Effizienz

Der K_M -Wert wird wie in 3.6.1 für die uninhibierte Reaktion genommen.

$$k_1 = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

$$k_1 = 5,6 \cdot 10^7 \frac{l}{mol \cdot min} \quad (6)$$

$k_1...$	katalytische Effizienz $[\frac{ml}{mol \cdot min}]$
$K_M...$	Michaelis-Menten Konstante $\frac{nmol}{ml}$

3.7.3 spezifische Aktivität

Die Spezifische Aktivität gibt die Wirksamkeit eines Enzyms an beziehungsweise die Umsetzung der Menge eines Substrats in einem bestimmten Zeitraum.

Die Maximalgeschwindigkeit wird wie in 6.1 für die uninhibierte Reaktion genommen.

$$A_s = \frac{v_{max}}{m_{Protein}}$$

$$A_s = 0,7 \frac{\mu mol}{mg \cdot min} \quad (7)$$

$m_{Protein}...$	Proteinmenge in Reaktionslösung $[0,02 \frac{mg}{ml}]$
$A_s...$	spezifische Aktivität $\frac{\mu mol}{mg \cdot min}$

4 Diskussion

Bei der Auftragung der erhaltenen Anfangsgeschwindigkeiten wurden für die Reaktionen ungehemmt, und gehemmt 150 mM gute Regressionsgeraden erhalten. Bei den Konzentrationen der 50mM gehemnten und 5 mM gehemnten Reaktion sind teils starke Ausreißer vorhanden wodurch wir auf die Konzentrationszunahme von 0-20 min zurückgreifen mussten. Solche Fehler sind auf ungenaues Pipettieren oder unsachgemäße Probenvorbereitung zurückzuführen und könnten durch Mehrfachbestimmungen minimiert werden. Des Weiteren stimmen die Werte von K_M und v_{max} aus den zwei verschiedenen Bestimmungen (Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk) nicht sehr gut überein. Ein Grund dafür ist, dass die Werte aus dem Michaelis-Menten Diagramm nur händisch geschätzt werden konnten und kleine Fehler im Lineweaver-Burk Diagramm durch die reziproke Auftragung verstärkt werden. Dies ist auch der Grund warum wir für weitere Berechnungen die Werte aus dem Michaelis-Menten-Diagramm verwendet haben. Das Lineweaver-Burk Diagramm wurde lediglich zur Bestimmung des Inhibitortyps verwendet (gemischter Inhibitor). Die Inhibitorkonstante konnte ebenfalls nur geschätzt werden da sich kein genauer Schnittpunkt der Geraden ergab. Es wurden verschiedenen Literaturwerte für A_{spez} der APase aus Kartoffeln gefunden. Diese liegen zwischen 0,5-10 units pro mg Feststoff wobei ein unit = 1 μmol pNPP pro Minute bei pH=4,8 und 37°C. Unsere spez. Aktivität liegt bei 0,7 $\frac{\mu mol}{mg \cdot min}$ (*Acid Phosphatase from potato*, 2007) in dieser Reichweite. Um genauer vergleichen zu können, müsste uns jedoch die genaue Enzymbezeichnung bekannt sein.

Literatur

Acid phosphatase from potato. (2007). Zugriff am 2018-10-25 auf <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/p3752dat.pdf>

Enzymkinetik der sauren phosphatase. (2018).