

Enzyme

Einführung

In jeder Zelle laufen Hunderte chemischer Reaktionen ab, die (mit wenigen Ausnahmen) alle von hochwirksamen Biokatalysatoren (Enzymen) beschleunigt und gesteuert werden. Enzyme wirken spezifisch in Bezug auf die katalysierte Reaktion (Wirkungsspezifität) und die Art der umgesetzten Verbindungen (Substratspezifität). Ein wichtiger Faktor für die katalytische Wirkung eines Enzyms (seine Aktivität), ist die Konzentration des oder der Substrate, die über die Umsatzgeschwindigkeit mitentscheidet. Bis zu einem gewissen Grade (Sättigung des Enzyms) lässt sich die Umsatzrate durch Steigerung der Substratkonzentration beschleunigen. Die Enzymaktivität kann weiterhin von verschiedenen Effektoren (Hemmstoffen und Aktivatoren) stark beeinflusst werden. Durch irreversible Hemmstoffe wird (meistens) die verfügbare Menge des unveränderten Enzyms, also die maximale Kapazität des Substratumsatzes herabgesetzt. Im Gegensatz dazu verändern reversible Hemmstoffe entweder die maximale Kapazität des Umsatzes oder seine Abhängigkeit von der Substratkonzentration oder beides.

Im vorliegenden Versuch sollen sich die PraktikumssteilnehmerInnen mit der nichtlinearen Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Substratkonzentration bei enzymkatalysierten Reaktionen auseinandersetzen. Die Bedeutung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} (bzw. k_{cat}) für ein Enzym/Substrat-Paar soll eingehend diskutiert werden. Ferner soll der Versuch exemplarisch zeigen, wie fehlerbehaftete Meßdaten mit Hilfe von Computerprogrammen durch Anpassung nichtlinearer Beziehungen schnell und objektiv ausgewertet werden können.

Vorbereitung zum Thema Enzyme, Thermodynamik und Kinetik enzymatischer Reaktionen: Struktur von Enzymen (Proteinen). Grundlagen der Thermodynamik der Reaktionen, freie Energie, Enthalpie, Entropie. Chemische Gleichgewichte. Offene Systeme und Fließgleichgewicht. Gekoppelte Reaktionen (Beispiel Hexokinase-Reaktion). Gruppenübertragungspotential. Grundlagen der chemischen und enzymatischen Kinetik. Reaktionsordnung. Michaelis-Menten-Kinetik: Hyperbolische Kinetik und Abhängigkeit der graphischen Form von definierten K_m und V_{max} Werten. (Üben Sie durch Zeichnen der hyperbolischen Abhängigkeiten für verschiedene K_m Werte bei gleicher V_{max} und umgekehrt.) Definition der Einheiten. Betrachtung der Geschwindigkeitsveränderungen in unterschiedlichen Bereichen der relativen Substratkonzentration in Bezug zu K_M . Linearisierung der Abhängigkeit nach Lineweaver und Burk. Kompetitive und nichtkompetitive Hemmtypen: Unterschiede der beiden Hemmmechanismen, charakteristische Veränderungen in der doppelreziproken graphischen Analyse nach Lineweaver und Burk. Irreversible Hemmung. Nicht-hyperbolische (sigmoidale) Kinetik allosterischer Enzyme, deren Beeinflussung durch Effektoren und deren Bedeutung für die Feinregulation des Stoffwechsels (Beispiel: Phosphofruktokinase). Regulation enzymatischer Aktivität durch Transcription und Interkonversion. Isoenzyme. Ribozyme. Nomenklatur der Enzyme: die sechs Enzymklassen. Aktives Zentrum. Coenzyme (Beispiele: ATP, NAD^+ , FAD, CoA und Biotin) und prosthetische Gruppen. Reaktionsmechanismen. (Beispiele: Triosephosphatisomerase, Aldolase, Chymotrypsin, Pyruvat-Dehydrogenase).

Theoretische Grundlagen

Betrachten wir die einfachste chemische Reaktion, eine sogenannte Reaktion 1. Ordnung,

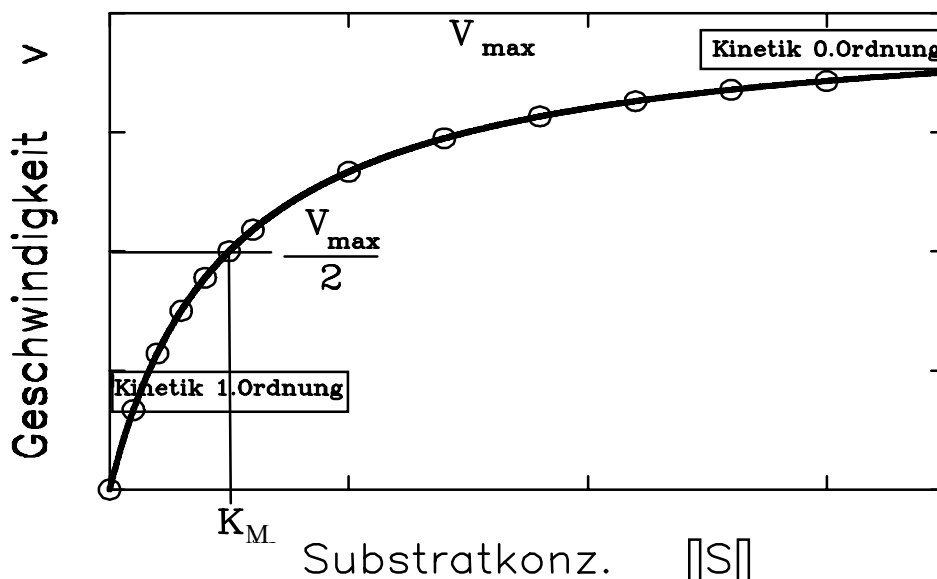


dann gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit v in *Abwesenheit* eines Enzyms:

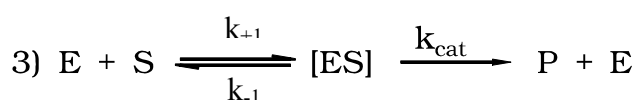
$$2) \quad v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [S]$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt hier also nur von der Konzentration des Reaktions-
teilnehmers S ab, daher spricht man hier von einer Reaktion 1. Ordnung. Die Beziehung
zwischen Geschwindigkeit und Konzentration von S ist in diesem Fall linear. Der Proportionalitätsfaktor k heißt Geschwindigkeitskonstante. Diese Größe ändert sich nur mit den
äußeren Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur etc.

In *Gegenwart* eines Enzyms sind Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentration nicht mehr
proportional zueinander. Bei sehr kleinen Substratkonzentrationen [S] erhöht sich zunächst
die Geschwindigkeit v annähernd linear mit der Substratkonzentration; mit steigendem [S]
verlangsamt sich jedoch die Zunahme von v , bis sich schließlich bei sehr hohem [S] ein
konstanter Wert, die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}), einstellt: Eine Kinetik 1. Ordnung
(v proportional zu [S]) geht hier also kontinuierlich über in eine Kinetik 0. Ordnung
(v unabhängig von [S]). Die Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Substratkonzentration
hat die Form einer rechtwinkligen Hyperbel.



Die erste zutreffende Erklärung für dieses Verhalten enzymkatalysierter Reaktionen
stammt von Michaelis und Menten (1913). Sie nahmen an, daß S in einem schnellen,
reversiblen Gleichgewicht zunächst an das Enzym gebunden wird: Bildung des [ES]-
Komplexes.



Die Gleichgewichtskonstante K der ersten Reaktionsteils lässt sich als ein Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Bildung und der Dissoziation des Komplexes ES berechnen: $K = k_{-1}/k_{+1}$. Die eigentliche katalytische Reaktion findet dann (meist erheblich langsamer als die Komplexbildung) innerhalb dieses [ES]-Komplexes statt. Ihre Geschwindigkeit hängt ab von der Konzentration des ES-Komplexes und der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat}

$$4) \quad v = k_{cat} \cdot [ES]$$

wobei die Proportionalitätskonstante k_{cat} die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Bildung von P ist.

Die Konzentration [ES] des Enzym-Substrat-Komplexes macht dem Sättigungsgrad des Enzyms entsprechend nur einen Teil seiner Gesamtkonzentration aus. Sie hängt von der Konzentration des Substrates hyperbolisch ab. Michaelis und Menten und später andere, haben gezeigt, dass diese Abhängigkeit durch Gleichung 5) definiert werden kann:

$$5) \quad [ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 5) kann man in 4) einsetzen, um die Geschwindigkeit v zu berechnen:

$$6) \quad v = \frac{k_{cat} \cdot [E_t] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Die in den Gleichungen 5) und 6) vorliegende Konstante K_M wird als die **Michaelis-Konstante** bezeichnet. Sie entspricht einer Substratkonzentration, bei der das Enzym zur Hälfte gesättigt ist (s. weiter unten) und ihre Grundeinheit ist M (mol/L). Die Michaelis-Konstante (K_M) unterscheidet sich von der Dissoziationskonstante: $K_M = (k_{cat} + k_{-1})/k_{+1}$, während $K = k_{-1}/k_{+1}$. Man beobachtet, daß bei der Mehrzahl aller Enzyme die K_M Konstante der echten Dissoziationskonstanten zahlenmäßig nahe steht. Dies kommt daher, dass häufig $k_{cat} \ll k_{-1}$ ist.

Der Term $k_{cat} \cdot [E_t]$ in 6) entspricht der **Maximalgeschwindigkeit** V_{max} . Bei sehr hohen Substratkonzentrationen ist nämlich $[ES] = [E_t]$, d.h. $v = k_{cat} \cdot [ES] = k_{cat} \cdot [E_t] = V_{max}$. Es gilt also die Gleichung:

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

Diese Gleichung hat wie die Gleichungen 5) und 6) die Form einer rechtwinkligen Hyperbel, gibt also die experimentell gefundene Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Substratkonzentration enzymkatalysierter Reaktionen richtig wieder.

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat: je *kleiner* sie ist, desto *fester* ist die Bindung zwischen Enzym und Substrat. In der Regel gilt diese Aussage auch für die Michaelis-Konstante.

Setzt man in die Gleichung 7) $[S] = K_M$ ein, sieht man, dass $v = V_{\max} / 2$. K_M gibt also diejenige Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Dann ist die Hälfte aller Enzymmoleküle "beschäftigt" d.h., K_M ist die Halbsättigungskonstante. *Merke: Die Michaelis-Konstante K_M wird gemessen als Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Unter bestimmten Voraussetzungen gleicht ihr Wert dem der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes.*

Graphische und numerische Auswerteverfahren.

Man könnte versuchen, aus der graphischen Darstellung von v gegen $[S]$, also aus der mehr oder weniger unvollständigen Hyperbel K_M und V_{\max} direkt abzulesen. Da sich jedoch v asymptotisch dem Wert V_{\max} annähert, kann man selbst bei hohen Substratkonzentrationen nur näherungsweise $v = V_{\max}$ setzen. Eine präzise Bestimmung von $V_{\max}/2$ und damit K_M ist so nicht möglich. Oft verhindern auch praktische und meßtechnische Gründe die Anwendung hoher Substratkonzentrationen, z.B. eine schlechte Löslichkeit des Substrates. Deshalb wurden verschiedene graphische Verfahren entwickelt, die die Hyperbel in eine Gerade überführen. Das gebräuchlichste ist das sogenannte Lineweaver-Burk Verfahren:

Die Michaelis-Menten-Gleichung läßt sich umformen zu:

$$8) \quad \boxed{\frac{1}{v}} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \boxed{\frac{1}{[S]}} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Trägt man also den Kehrwert der Geschwindigkeit $1/v$ gegen den Kehrwert der Substratkonzentration $1/[S]$ auf, so erhält man eine Gerade, welche die Ordinate bei $1/V_{\max}$ und die Abszisse bei $-1/K_M$ schneidet. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die Wertepaare bei kleinen Substratkonzentrationen in dieser reziproken Darstellung ein viel stärkeres "optisches Gewicht" besitzen als die Wertepaare höherer Substratkonzentrationen. Diese aber gehen gleichsam in der Nähe des Ursprungs unter, obwohl sie meist mit einem geringeren Meßfehler belastet sind.

Seit preiswerte Mikrocomputer verfügbar sind, ist man dazu übergegangen, die kinetischen Parameter mit numerischen Verfahren zu ermitteln. Viele Computerprogrammen sind erhältlich, die vorgegebene Funktionen an experimentelle Daten anpassen ("fitten"). In unserem Fall ermittelt das Programm diejenige rechtwinklige Hyperbel $y = a \cdot x / (b + x)$, deren Parameter a und b (hier V_{\max} und K_M) den gemessenen Wertepaaren am besten gerecht werden, d.h. die die kleinste Fehlerquadratsumme ergeben. Dies geschieht iterativ, d.h. durch mehrfache Verbesserung der anfänglichen Schätzwerte (nichtlineare Regression).

Hemmstoffe.

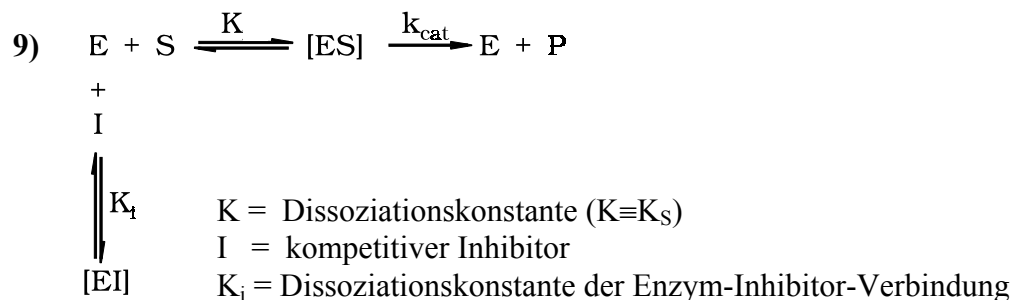
Alle Enzyme lassen sich durch geeignete Verbindungen hemmen. Diese Enzymhemmung spielt bei der Regulation des Intermediärstoffwechsels eine wichtige Rolle; auch die Wirkung von Arzneimitteln beruht in vielen Fällen auf der Hemmung bestimmter Enzyme im Körper.

Die Wirkung eines Hemmstoffs auf ein Enzym, das dem Michaelis-Menten Schema folgt, kann darauf beruhen, daß

- er mit dem Substrat um die gleiche Bindungsstelle konkurriert ohne den katalytischen Prozess zu beeinträchtigen (kompetitiver Inhibitor)
- er direkt in den katalytischen Prozess eingreift ohne die Substratbindung zu beeinflussen (nichtkompetitiver Inhibitor)
- er nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex reagiert (unkompetitiver Inhibitor)

Mischungen der drei genannten Hemmtypen sind ebenfalls denkbar. (Legt man strenge Maßstäbe an, sind ganz reine Hemmtypen, wie oben definiert, eher selten.). Welche der genannten Möglichkeiten am ehesten zutreffen, kann man entscheiden, wenn man den Einfluß des Hemmstoffes auf V_{\max} und K_M untersucht. Die doppelt reziproke Auftragung der Messwerte ist dabei sehr nützlich, da die Abschnitte an den Achsen unmittelbar darauf hinweisen, ob in Anwesenheit eines Hemmstoffes der eine, den anderen oder beide diese Werte verändert werden. Im Folgenden wird auf eine vollständige Herleitung der Gleichungen der verschiedenen Hemmtypen verzichtet.

Kompetitive Hemmung: Der scheinbare K_M -Wert wird größer. Ist ein Hemmstoff den Substraten des Enzyms chemisch so ähnlich, daß er vom Enzym an der selben Stelle wie die Substrate gebunden wird, erhält man neben dem ES-Komplex auch eine Enzym-Inhibitor-Verbindung EI, die jedoch kein Produkt bilden kann.



Kompetitive Inhibitoren sind meist Substratanaloge. Da sie den katalytischen Prozess selbst nicht beeinflussen, bleibt V_{\max} (und damit auch k_{cat}) unverändert. In Gegenwart von I wird jedoch mehr Substrat benötigt, um das Enzym voll zu sättigen, bzw. die halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen.

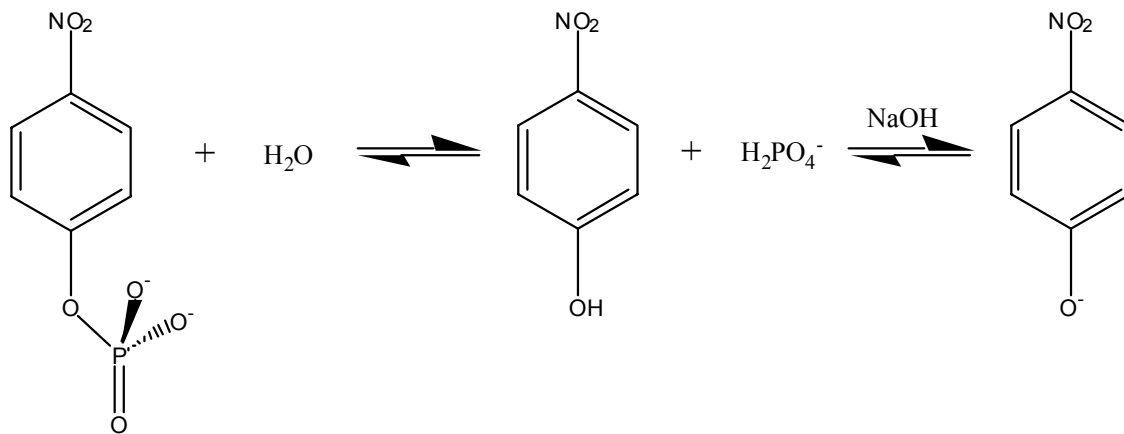
Nicht kompetitive Hemmung. In diesem Fall wird V_{\max} (und damit auch k_{cat}) erniedrigt, K_M bleibt jedoch unverändert. Die Dissoziationskonstante K_i beschreibt in diesem Fall die Wechselwirkung mit einer funktionellen Gruppe des Enzyms, die ausschließlich am katalytischen Prozess, nicht aber an der Substratbindung beteiligt ist (diese Form der nicht kompetitiven Hemmung ist selten). Auch bei irreversibler Inaktivierung des Enzyms durch den Hemmstoff ergibt sich ein nicht kompetitiver Hemmtyp.

Unkompetitive Hemmung: In diesem Fall wird sowohl V_{\max} als auch K_M um denselben Faktor erniedrigt. Auch dieser Hemmtyp ist sehr selten.

Versuch 1:**Bestimmung von V_{\max} und K_M für die saure Phosphatase
Untersuchungen zur Hemmwirkung von Phosphat und Fluorid**

Phosphatatasen (Phosphomonoesterasen) katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern zu einem Alkohol und freiem anorganischem Phosphat. Zur Aktivitätsbestimmung wird hier das chromogene Substrat 4-Nitrophenylphosphat (der Ester von Phosphorsäure mit 4-Nitrophenol) verwendet.

Die der Reaktion zugrundeliegende Gleichung:



4-Nitrophenylphosphat + Wasser

4-Nitrophenol + Dihydrogenphosphat

4-Nitrophenolat-
anion (gelb)

Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N NaOH gestoppt. Dabei entsteht gleichzeitig aus dem farblosen 4-Nitrophenol das gelb gefärbte 4-Nitrophenolat-Anion, dessen Konzentration bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann.

Geräte

Pipetten 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, Mikrotiterplatte

Stammlösungen:

1a 100 mM Citrat, pH 5,4

1b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 100 mM Citrat, pH 5,4

2a 100 mM Citrat, pH 5,4

2b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 100 mM Citrat, pH 5,4

3a 0,5 mM Phosphat, 100 mM Citrat pH 5,4

3b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 0,5 mM Phosphat, 100 mM Citrat pH 5,4

4a 1 mM Phosphat, 100 mM Citrat pH 5,4

4b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 1 mM Phosphat, 100 mM Citrat pH 5,4

5a 0,5 mM Fluorid, 100 mM Citrat pH 5,4

5b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 0,5 mM Fluorid, 100 mM Citrat pH 5,4

6a 1 mM Fluorid, 100 mM Citrat pH 5,4

6b 3 mM 4-Nitrophenylphosphat, 1 mM Fluorid, 100 mM Citrat pH 5,4

E Enzym-Stammlösung in Puffer 1a

Arbeitsanweisung:

Der Versuch wird von kleinen Gruppen in zwei Alternativen, **I** und **II**, durchgeführt.

- 1) In 2,2 mL Reaktionsgefäßen werden jeweils 100 µL Enzym-Stammlösung E mit 2 ml der alternativen Pufferlösungsätze 1a bis 4a bzw. 1a bis 6a verdünnt und mit E1 bis E4 bzw. E6 beschriftet.
- 2) Die enzymatischen Reaktionen werden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen in Abwesenheit und Gegenwart von 2 verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors Phosphat bzw. Fluorid in Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese Platten besitzen 96 Vertiefungen mit einem Volumen von 300 µL in der Anordnung: 12 Spalten (1-12) und 8 Zeilen (A-H).

Die Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen werden wie folgt gefüllt:

I: Hemmung der Phosphatase durch Phosphat

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Leerwert		Ungehemmt		0,5 mM Phosphat		1 mM Phosphat	
A	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
B	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
C	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
D	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
E	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
F	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
G	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a
H	1a	1a	2a	2a	3a	3a	4a	4a

II: Hemmung der Phosphatase durch Fluorid.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Leerwert		Ungehemmt		0,5 mM Fluorid		1 mM Fluorid	
A	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
B	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
C	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
D	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
E	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
F	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
G	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a
H	1a	1a	2a	2a	5a	5a	6a	6a

Wie in der Graphik angegeben, werden in jede Vertiefung 100 µL der entsprechenden Stammlösungen 1a – 4a bzw. 1a - 6a pipettiert. Anschließend werden in jede Vertiefung (**ausschliesslich in**) der Zeile A 200 µL der entsprechenden Stammlösungen 1b – 4b bzw. 1b - 6b pipettiert und diese durch mehrmaliges Ansaugen und Ausstoßen aus der Pipette gut gemischt. Aus der Mischung werden dann 200 µL entnommen und in die darunterliegende Vertiefung (Zeile B) gegeben, gemischt und wiederum davon 200 µL in die darunterliegende Vertiefung (Zeile C) pipettiert. Es wird fortgefahren bis auf diese Weise alle Vertiefungen einer Spalte mit absteigender Substratkonzentration gefüllt sind. Die 200 µL aus der Vertiefung in Zeile H werden verworfen. Es empfiehlt sich immer eine Spalte von der obersten bis

zu untersten Zeile zu füllen, da man in diesem Falle die Pipettenspitze nicht wechseln muss. Durch dieses Mischverfahren erfolgt von einer Zeile zur folgenden Zeile eine Verdünnung der Substratkonzentration um das 1,5 fache (nachrechnen!) beginnend mit 1 mM in Zeile A und endet mit 0,06 mM in Zeile H in der Reaktion nach Enzymzusatz.

- 3) In Spalte 1 und 2, welche die Messpunkte für den Leerwert repräsentieren, werden zuerst in jede Vertiefung 100 μL 1N NaOH pipettiert und anschließend jeweils 100 μL der E1 Enzymlösung. Diese Reaktion ist Zeit unabhängig, da zuerst die Abstopplösung und dann das Enzym zugegeben wird.
- 4) Die enzymatischen Reaktionen in den restlichen Vertiefungen ab der Spalte 3 werden durch Zugabe von je 100 μL der entsprechenden Enzymlösung E2 – E4 bzw. E2, E5 und E6 pro Vertiefung im 15 sec Rhythmus gestartet. Bei erstem Pipettieren wird die Laboruhr gestartet.
- 5) Die Reaktion in jeder Vertiefung wird nach genau 13 min durch Zugabe von je 100 μL 1 N NaOH im 15-sec Takt gestoppt.

Achtung: Da innerhalb von 12 min $12 \times 4 = 48$ Vertiefungen gefüllt werden, müssen schon 1 min nach dem Starten der Reaktion in der letzten Vertiefung diese Reaktionen in den gleichen Intervallen ab der Spalte 3 wieder abgestoppt werden.

- 6) Die Auswertung erfolgt im Mikrotiterplattenphotometer mit angeschlossenem Computer. Die Ergebnisse werden als 8×8 - Matrix von Absorptionswerten ausgegeben und in das Programm Excel eingelesen, welches dann aus den Messwerten die Reaktions-geschwindigkeiten automatisch berechnet. Unter dem Datenblatt *Rohdaten* sind die einzelnen Messwerte aufgeführt. Von den Mittelwerten der Doppelbestimmungen der Spalten 3 -12 werden die Mittelwerte der Spalten 1 + 2 (Leerwerte) abgezogen. Zur Berechnung der Geschwindigkeiten aus diesen korrigierten Absorptionswerten wird ein Absorptionskoeffizient $\epsilon = 18\,400$ L/(mol \times cm) für 4-Nitrophenolat zugrunde gelegt. Die Ermittlung der kinetischen Parameter K_M (bzw. K_M') und V_{\max} (bzw. V_{\max}') aus den Datensätzen erfolgt automatisch in diesem Programm, wobei die verschiedenen oben besprochenen Auswerteverfahren unter den jeweiligen Datenblätter eingesehen werden können.

(Bei den linearisierenden Verfahren, wie das von Lineweaver-Burk können Programme zur Berechnung der Parameter intern die einfache Ausgleichsgerade zugrunde legen. Nur bei der Darstellung nach Michaelis-Menten wird eine nichtlineare Regression, wie oben beschrieben durchgeführt.)

Auswertung:

Verändern Sie V_{\max} und K_M dahingehend für die ungehemmte Enzymreaktion, dass die Summe der Fehlerquadrate (Zielzelle) einen möglichst kleinen Wert annimmt und die hyperbolische Kurve so gut wie möglich nahe an den oder durch die Messpunkte verläuft. Anschließend können Sie die Optimierung durch das Programm vornehmen, indem Sie unter *Extras* den Befehl *Solver* aufrufen, die *Zielzelle* in Solverparameter markieren und dann die gewünschte Fehlerquadratzielzelle im Datenblatt markieren. So verfahren Sie auch mit den *Veränderbaren Zellen*, wobei Sie hier die entsprechenden V_{\max} und K_M Zellen des Datenblattes markieren. Anschließend klicken Sie auf *Lösen* unter Solverparameter wodurch die Kurve mit dem kleinsten Fehlerquadrat gefunden wird. Führen Sie diese Prozedur für jede Kinetik durch und notieren Sie die Fehlerquadratsumme. Versuchen Sie anschließend die Fehlerquadratsumme zu minimieren, indem Sie maximal zwei Messpunkte der Rohdaten entfernen.

Protokoll:

Jedes Protokoll sollte Datum, kurze Versuchsbeschreibung, Ergebnisse und Diskussion enthalten (ganze Sätze). Heften Sie die Messergebnisse ab und protokollieren Sie die Veränderung der Fehlerquadratsumme durch Eliminierung von Rohdaten. Beschreiben sie in Kürze das Verhalten Ihrer Kinetiken und diskutieren Sie Abweichungen von den zu erwartenden Kinetiken. Analysieren Sie den Hemmtyp des untersuchten Hemmstoffs (Phosphat oder Fluorid) und diskutieren Sie Ihren Befund mit dem der Gruppe, die die Kinetik mit dem anderen Hemmstoff untersucht hatte. Zeichnen Sie die charakteristischen doppelt reziproken Abhängigkeiten für die ideale kompetitive und nicht kompetitive reversible Hemmung.

Versuch :

Datum

Kurze Versuchsbeschreibung:

(Prinzip des Versuchs, keine Pipettierbeschreibung)

Substrat:

Hemmstoff

Ergebnis:

ohne Hemmstoff

$V_{max} =$

$K_m =$

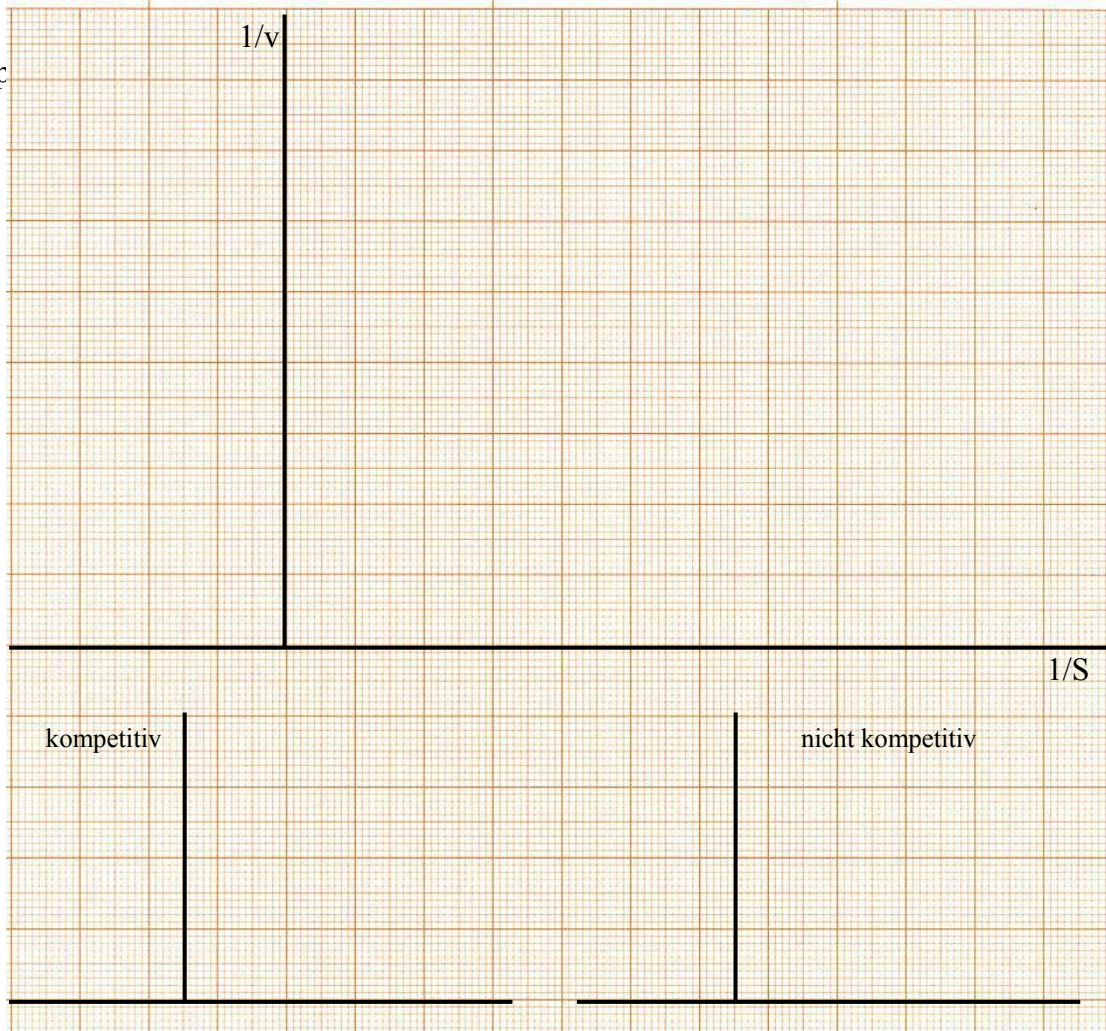
mit Hemmstoff

$V_{max} =$

$K_m =$

Hemmtyp:

(Graph



Tragen Sie Ihre Daten in die Graphik ein und zeichnen Sie darunter die typischen Abhängigkeiten der nicht gehemmten und der mit kompetitiven und nichtkompetitiven Hemmstoffen gehemmten Reaktionen ein.

Stellen Sie fest, ob der von Ihnen untersuchte Hemmstoff einen dieser häufigen Hemmtypen zeigt.

Diskussion (gemeinsame Auswertung der gesamten Gruppe):
(Vergleich der Ergebnisse mit Phosphat und Fluorid als Hemmstoffen)

FRAGEN

1. Was versteht man unter einer Reaktion nullter (erster, zweiter) Ordnung ? Welche Reaktionsordnung liegt vor, wenn $[S] \ll K_M$, $[S] = K_M$ und $[S] \gg K_M$ ist ?.
2. Schreiben Sie die Michaelis-Menten-Gleichung auf (oder ab), und berechnen Sie v unter der vereinfachenden Annahme, dass $[S] = K_M$.
3. Wie verändert sich v in der Abhängigkeit von $[S]$, wenn $[S] \ll K_M$ ist?
4. Wie verändert sich v in der Abhängigkeit von $[S]$, wenn $[S] \gg K_M$ ist?
5. Was verstehen Sie unter der Halbsättigungskonstanten?
6. Erläutern Sie den Unterschied zwischen der Definition der Michaelis-Konstanten und der der Dissoziationskonstanten des $[ES]$ – Komplexes.
7. Halbsättigungskonstante bedeutet: Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit ($V_{max}/2$) erreicht wird. $V_{max}/2$ ist selbstverständlich wie V_{max} abhängig von der Enzymkonzentration. Ist damit die Michaelis-Konstante auch abhängig von der Enzymkonzentration?
8. Wie verändert sich V_{max} , wenn eine Hälfte des vorhandenen Enzyms denaturiert oder irreversibel gehemmt wird?
9. Wie verändert sich K_M , wenn eine Hälfte des vorhandenen Enzyms denaturiert wird?
10. Gilt es einen Unterschied zwischen der Menge und Anzahl von Einheiten eines Enzyms?
11. Erklären Sie die Wirkung (oder die "Angriffsweise") eines kompetitiven Inhibitors im Vergleich zum nichtkompetitiven.
12. Kompetitiv bedeutet Inhibitor und Substrat konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am Enzym: Wie könnte man in einem einfachen Vorversuch mit wenigen Ansätzen einen ersten Fingerzeig erhalten, ob ein unbekannter Stoff eher als kompetitiver oder als nichtkompetitiver Inhibitor anzusehen ist, ohne, wie im vorliegenden Experiment, eine komplette Kinetik zu messen?
13. Zu welcher Enzymklasse gehören die Phosphatasen? Kennen Sie die anderen 5 Klassen?
14. Erläutern Sie die Begriffe (Enzym-)Aktivität, spezifische Aktivität, Volumen-bezogene Aktivität, Wechselzahl (turnover number).
15. In einer Zelle wird selektiv die Syntheserate und nicht die Abbaurrate eines einzigen Enzyms beschleunigt. Steigt seine V_{max} oder K_M ? Steigt seine spezifische oder seine Volumen-bezogene Aktivität?
16. Erklären Sie am Beispiel der beiden „Enzyme ehrenhalber“, Myoglobin und Hämoglobin, die Grundlagen für den Übergang von einer hyperbolischen in eine sigmoidale Bindungskurve.