

**Enzymkinetik**


Klassenstufe	Oberthemen	Unterthemen	Anforderungs- niveau	Durchführungs- niveau	Vorlauf Vorbereitung Durchführung
SII	Reaktionen	Kinetik Michaelis-Menten	● ● ●	■ ■	60 Min

*Autor: Dr. Evi Derouet-Hümbert*

Sie können die her vorgestellten Experimente mit unserem Kit 109.3146 durchführen oder selbst zusammenstellen.

**Inhalt des Kits**

- A Catalase solution Freezer / Katalase-Lösung, gekühlt lagern
- B Hydrogen peroxide (stabilized) / Wasserstoffperoxid, gekühlt lagern
- C Phosphate buffer, pH 7.2 (conc.) / konzentrierter Phosphatpuffer, Kühlschrank
- D Assay reagent, potassium iodide (conc.) / Kaliumiodid. Konzentriert, Kühlschrank
- E Acidification solution 0.1M HCl / 0.1M Salzsäure
- F Color enhancer (conc.) / Farbverstärker, konzentriert, gekühlt lagern
- G Color developer (conc.) / Entwicklerlösung, konzentriert, gekühlt lagern

**Benötigt (nicht im Kit enthalten):**

- Spektrometer für sichtbare Wellenlängen
- Teströhrchen
- Laborstoppuhr oder Timer
- Wasserfeste Stifte zum Beschriften
- Teströhrchen, 10ml
- Bechergläser
- Destilliertes Wasser
- 5/10ml Pipetten
- Pipettenpumpen oder Peleusbälle
- Milimeterpapier
- Vollautomatische Pipetten, 1-20ml mit Spitzen
- Eis

**Enzyme als biologische Katalysatoren**

Ein biologischer Katalysator dient bereits in Spuren dazu die Umsatzrate einer biochemischen Reaktion zu beschleunigen, ohne dabei verbraucht oder verändert zu werden. Die Gleichgewichtskonstanten werden durch Katalysatoren nicht verändert, lediglich die Annäherungsrate variiert leicht. In lebenden Zellen können Katalysatoren die Reaktionsrate um das 1000fache verändern – diese Zell-Katalysatoren sind besser bekannt als Enzyme. Enzyme benötigen ein ideales Milieu um bestimmte Reaktionen katalysieren zu können. Dieses wird im Allgemeinen durch die Temperatur und den pH-Wert bestimmt. Die Zunahme oder Abnahme der Enzymaktivität wird häufig durch die physiologischen Anforderungen einer Zelle zu gegebener Zeit reguliert.

Enzyme lassen sich anhand ihres Aufbaus unterscheiden. Während viele Enzyme aus nur einer Proteinkette bestehen, so genannte Monomere, bestehen andere Enzyme, die Oligomere, aus mehreren Untereinheiten/Proteinketten. Einige Enzyme lagern sich mit weiteren Enzymen zu sogenannten Multienzymkomplexen zusammen und kooperieren miteinander oder regulieren sich gegenseitig. Umgekehrt gibt es auch einzelne Proteinketten, welche mehrere Enzymaktivitäten enthalten (multifunktionelle Enzyme). Eine weitere mögliche Einteilung hinsichtlich ihres Aufbaus berücksichtigt das Vorhandensein von Kofaktoren:

\* Reine Protein-Enzyme bestehen ausschließlich aus Protein, das aktive Zentrum wird nur aus Aminosäureresten und dem Peptidrückgrat gebildet. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise das Verdauungsenzym Chymotrypsin und die Triosephosphatisomerase (TIM) der Glycolyse.

\* Holoenzyme bestehen aus einem Proteinanteil, dem Apoenzym, sowie aus einem Kofaktor, einem niedermolekularen Molekül (kein Protein). Beide zusammen sind für die Funktion des Enzyms wichtig. Organische Moleküle als Kofaktoren werden Koenzyme genannt. Sind sie kovalent an das Apoenzym gebunden, nennt man sie prosthetische Gruppen, andernfalls auch zutreffender als Kosubstrat, da sie in äquivalenten Mengen bei

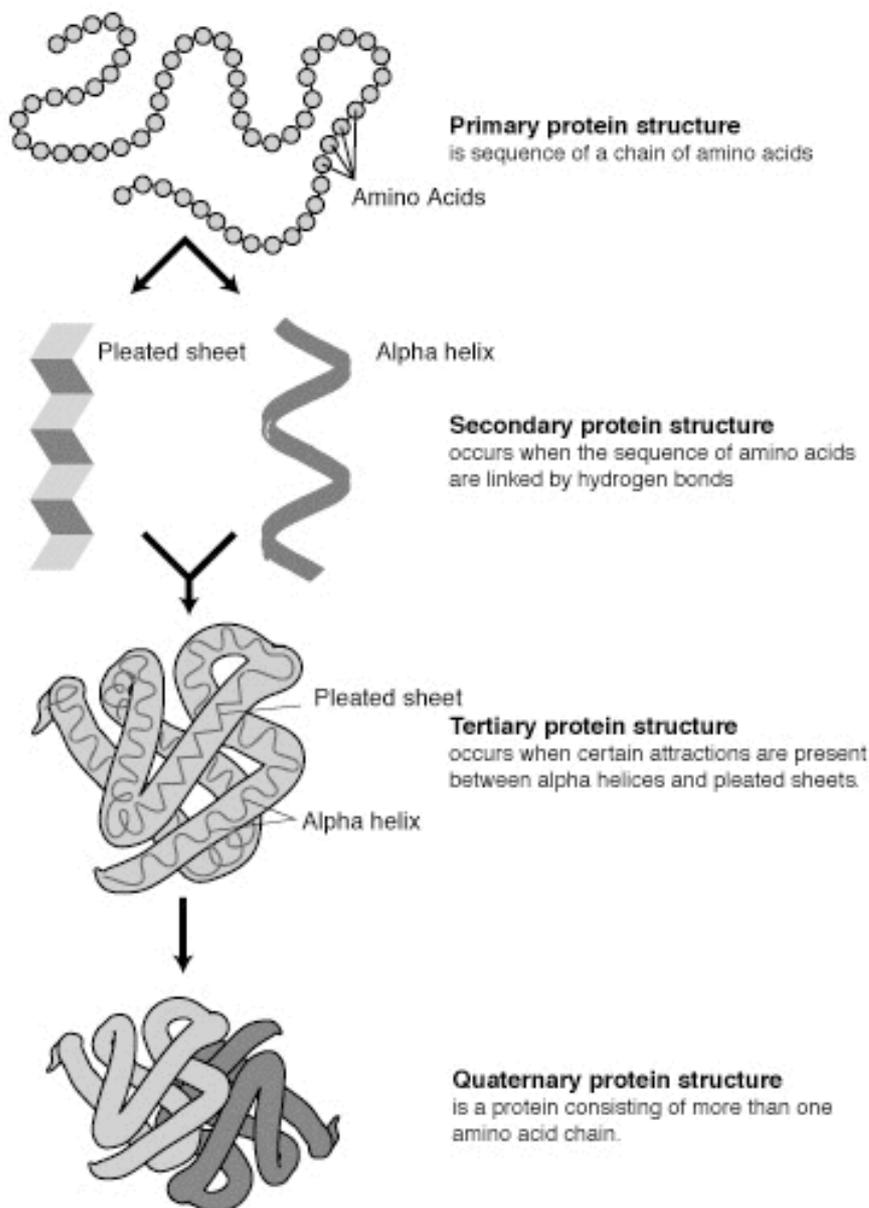
der enzymatischen Reaktion mit dem Substrat umgesetzt werden. Kosubstrate sind zum Beispiel Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamidadenindinukleotid (NAD). ATP wird oft als Energiequelle für die Reaktion genutzt, z. B. von Proteinkinasen. NAD wird von Enzymen, z. B. die Alkoholdehydrogenase, als Elektronenakzeptor verwendet. Benötigt ein Enzym Metallionen (z. B. Eisen-, Zink- oder Kupferionen), spricht man von einem Metalloenzym. Die Lipoxygenase zum Beispiel enthält Eisen und die Carboanhydrase enthält Zink.

1897 zeigte E. Buchner bereits, dass zellfreie Auszüge der Hefe durch Gärung von Zuckers Spiritus produzieren. 1926 belegte J.B. Sumner dass Enzyme Protein sind. Bislang sind über tausend verschiedene Enzymaktivitäten bekannt, die auf unterschiedlichen, teilweise komplizierten Strukturen beruhen. Den verschiedenen Enzymen, die diese Reaktionen katalysieren ist jedoch eine strukturelle Eigenschaft gemein: die Aufeinanderfolge spezifischer Aminosäurereste, welche durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind.

## **Protein-Konformation**

Die Proteinstruktur oder Konformation wird in der Biochemie in verschiedene Strukturebenen eingeteilt. Die Einteilung zu einer Hierarchie in Primärstruktur, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und Quartärstruktur wurde erstmals 1952 von Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang vorgeschlagen.

Unter Primärstruktur versteht man in der Biochemie die unterste Ebene der Strukturinformation eines Biopolymers oder auch synthetischen Polymers (Kunststoff), d. h. die Sequenz der einzelnen Bausteine. Bei Proteinen ist dies die Abfolge der Aminosäuren (Aminosäuresequenz), bei Nukleinsäuren (DNA und RNA) die der Nukleotide (Nukleotidsequenz).



Aus der Primärstruktur eines Proteins leiten sich seine weiteren Strukturen zwingend ab. Zur Zeit existiert jedoch keine verlässliche Methode, aus dieser in der Primärstruktur enthaltenen Information fehlerfrei abzuleiten, wie die resultierende Kette räumlich angeordnet ist. In der Regel lassen sich meist jedoch aus Erfahrungswerten sowohl Voraussagen über wahrscheinliche Strukturelemente als auch über die Funktion des Proteins treffen.

Aus der Basensequenz einer Nukleinsäure kann – da der genetische Code bekannt ist, und jedes Codon für eine Aminosäure codiert – die Primärsequenz des resultierenden

Proteins ermittelt werden. Umgekehrt ist das nicht ohne weiteres möglich, da die meisten Aminosäuren mehr als nur ein Codon haben. Man sagt aus diesem Grund auch, der genetische Code ist degeneriert.

Für die Angabe der Primärstruktur existieren vereinbarte Konventionen

- \* Proteine werden vom aminoterminalen Ende (N-Terminus) zum carboxylterminalen Ende (C-Terminus) geschrieben.

- \* Nukleinsäuren (DNA, RNA) werden vom 5'-Phosphat-Ende zum 3'-Hydroxyl-Ende geschrieben.

Die Sekundärstruktur von Makromolekülen beschreibt die konformationelle Anordnung der Backbonesegmente - wie einer Polypeptidkette eines Proteins - ohne die Konformation der Seitenkette oder ihr Verhältnis zu anderen Segmenten mit zu betrachten. Bei so komplexen Molekülstrukturen wie Proteinen definiert die Sekundärstruktur insbesondere charakteristische lokale Strukturelemente wie Helices oder Faltblätter.

Sie ist bestimmt durch die von Wasserstoffbrücken zwischen einzelnen Elementen definierte Topologie, sowie durch die Primärstruktur. Manchmal – etwa bei Polysacchariden – spielt auch die Form der Polymerisierung eine Rolle.

Die Darstellung der Sekundärstruktur, oder des Polymerrückgrats mit den Sekundärstrukturelementen, bietet einen besseren Überblick als die Darstellung der vollständigen Molekülstruktur. Andererseits gibt sie einen wesentlich genaueren Einblick in die tatsächliche Struktur als die Abbildung durch Pauli-Schreibweise oder Fischer-Projektion.

In der RNA- und Proteinstrukturvorhersage bildet die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente ein wichtiges, und im Vergleich weniger schwieriges Unterproblem.

Die genaue Anordnung der Atome im dreidimensionalen Raum, welche sämtliche physikalischen Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls und mit seiner Umgebung einbezieht, wird dagegen als Tertiärstruktur bezeichnet. Die Einteilung zu einer Hierarchie in Primärstruktur, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und Quartärstruktur wurde 1952 durch Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang vorgeschlagen.

Bei Proteinen ist die Sekundärstruktur bestimmt durch Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen des Peptidrückgrats. Dafür gibt es zwar unüberschaubar viele Möglichkeiten, jedoch zeigt sich, dass einige Motive, oder Sekundärstrukturelemente, besonders häufig vorkommen:

- \*  $\alpha$ -Helix

- \*  $\pi$ -Helix

- \* 310-Helix
- \*  $\beta$ -Faltblatt
- \*  $\beta$ -Schleife

Bereiche, die keine definierte Sekundärstruktur aufweisen, werden als Random-coil bezeichnet.

Mit Ausnahme der Beta-Schleifen und Random-coils zeichnen sich diese Bereiche dadurch aus, dass in ihnen die beiden einzig möglichen Drehwinkel  $\psi$  und  $\phi$  des Peptidrückgrates festgelegt sind und sich über die Länge des Sekundärstrukturelementes hindurch periodisch wiederholen. Im Ramachandran-Plot sind die möglichen Sekundärstrukturen als Funktion der zugehörigen  $\psi/\phi$  Winkelpaare dargestellt. Durch die H-Brücken innerhalb des Peptidrückgrates werden die Sekundärstrukturelemente energetisch stabilisiert. Je nach Art der Sekundärstruktur können bestimmte Aminosäureseitenketten auf deren Struktur destabilisierend wirken.

In ein und demselben Protein liegt meistens eine Mischung aus den verschiedenen Sekundärstrukturelementen vor. Die vollständige Proteinstruktur (d.h. die Abfolge bzw. Anordnung der Sekundärstrukturelemente) wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Sie ist für jedes Protein charakteristisch und für die biologische Funktion unbedingt notwendig. Während bzw. nach der Herstellung des Proteins durch Translation eines RNA-Moleküls wird das Protein durch Proteinfaltung in die biologisch wirksame Form überführt. Dieser Vorgang wird u.a. durch Chaperone unterstützt.

Unter Tertiärstruktur versteht man in der Biochemie den übergeordneten räumlichen Aufbau (inklusive Konformation) von Proteinen, Nukleinsäuren oder Makromolekülen, die aus einer einzelnen Kette bestehen.[1] Sie ist aus mehreren Sekundärstrukturen zusammengesetzt.

Bei einem globulären Protein wird die energetisch treibende Kraft für die Faltung der einzelnen Sekundärstrukturelemente durch die Kautzman-Regel beschrieben: die hydrophoben Bereiche sind im Inneren, während die hydrophilen und/oder geladenen Bereiche dem wässrigen Milieu zugewandt sind (siehe auch hydrophober Effekt). In die Stabilisierung von Tertiärstrukturen sind Disulfidbrücken (stärkste Bindung), Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen (schwächste Bindung) involviert.

Insbesondere bei Proteinen ist die dreidimensionale Struktur charakteristisch und für die biologische Funktion unbedingt notwendig. Während beziehungsweise nach der Herstellung des Proteins durch Translation einer mRNA wird das Protein durch Proteinfaltung in die biologisch wirksame Form überführt. Dieser Vorgang wird u.a. durch Chaperone unterstützt.

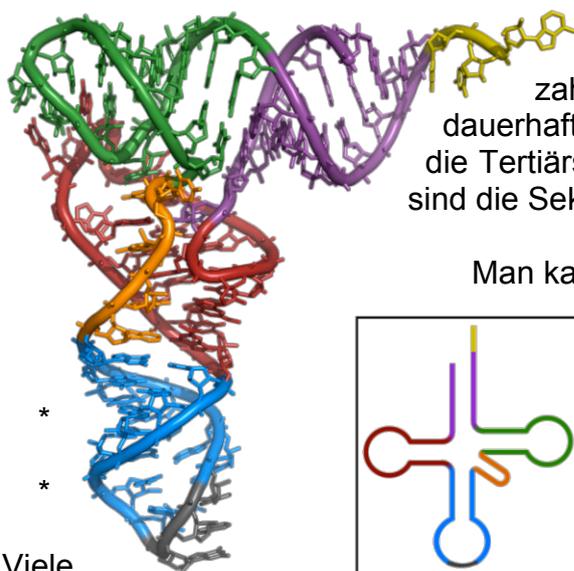
Der Bereich der Biochemie, der sich mit der Aufklärung bzw. den Auswirkungen solcher Strukturen auseinandersetzt, heißt Strukturbiologie. Als Methoden der Strukturaufklärung

dienen vorwiegend (Röntgen-)Kristallstrukturanalyse und mehrdimensionale NMR. Die Bioinformatik entwickelt Methoden bzw. Algorithmen, mit Hilfe derer man aus der Primärstruktur (d.h. der Abfolge der einzelnen Aminosäuren) die dreidimensionale Struktur des Proteins vorhersagen kann (siehe Artikel zur Proteinstruktur).

Die nächste übergeordnete Ebene ist die Quartärstruktur.

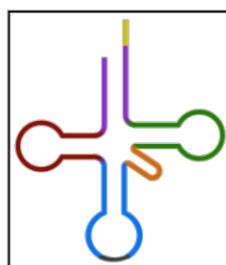
Nukleinsäuren können auch noch komplexere räumliche Strukturen einnehmen: tRNAs müssen für ihre Funktion in der korrekten Tertiärstruktur vorliegen.

Die Quartärstruktur ist die definierte Anordnung von zwei oder mehr Makromolekülen mit Tertiärstruktur, die durch Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und Coulombsche Kräfte zusammengehalten werden. Klassisches Beispiel sind Proteine, die sich zu funktionellen Komplexen zusammen lagern und reversibel trennen lassen. Während der energetische Beitrag der Wechselwirkungen substantiell ist, ist bei der Assoziation von Untereinheiten über hydrophobe Bereiche energetisch weniger der Effekt der schwachen Van-der-Waals-Kräfte ausschlaggebend als vielmehr ein sogenannter hydrophober Effekt.



Aber nicht alle Proteine besitzen eine Quartärstruktur; in der Natur kommen zahlreiche einsträngige Proteine vor, die keine dauerhaften Komplexe bilden. Bei diesen ist hauptsächlich die Tertiärstruktur relevant. Weitere untergeordnete Ebenen sind die Sekundärstruktur und die Primärstruktur.

Man kann Proteine mit Quartärstruktur unterscheiden in:

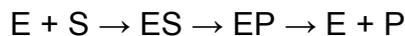


- \* Faserproteine (z. B.: Kollagen, Elastin, Keratin)
- \* Globuläre Proteine (z. B.: Hämoglobin, Myoglobin, Ribosom)
- \* Proteinkomplex

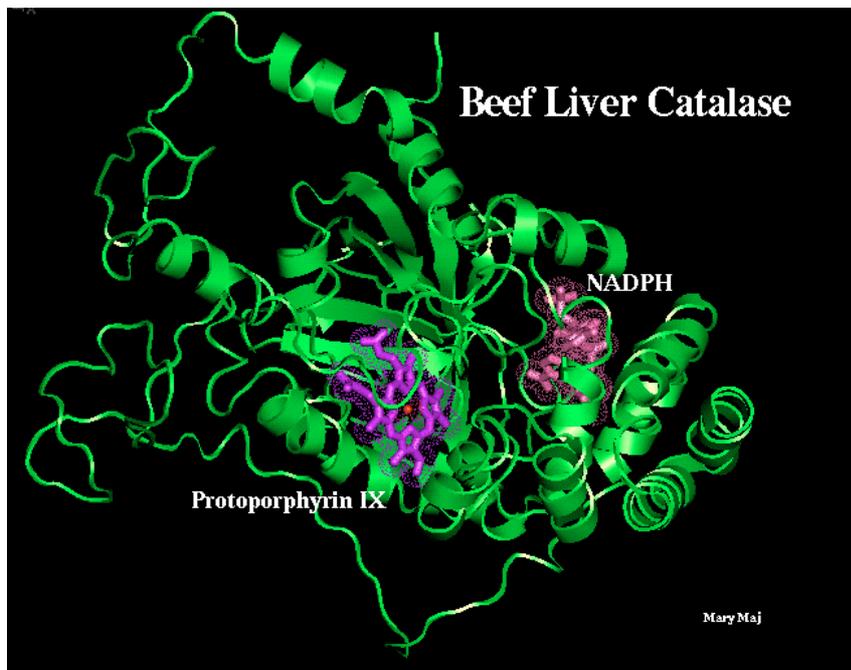
Viele Proteine sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Die Untereinheiten - Polypeptidketten, die jeweils in ihrer Tertiärstruktur vorliegen - lagern sich zu einem noch größeren Molekül zusammen. Ihre Anordnung im Raum nennt man Quartärstruktur. Bekannte Beispiele sind das Hämoglobin, bei dem (bei den meisten Tieren) zwei identische  $\alpha$ -Hämoglobin- und zwei identische  $\beta$ -Hämoglobinstränge jeweils ein Eisenion umschließen - insgesamt also vier Eisenionen, das Ribosom und das Proteasom.

## Enzymaktivität messen

Das Reaktionsmittelmolekül in einer Enzym-katalysierten Reaktion nennt man Substrat. Das Substrat (S) wird zu Produkt (P) umgewandelt. Bevor das Enzym das Substrat umwandeln kann, muss es zuerst binden. Lediglich ein verhältnismäßig kleiner Teil des Enzymmoleküls ist an dieser Substratbindung beteiligt und enthält entweder die für die Bindung spezifischen Aminosäurereste oder die prosthetische Gruppe. Die Initialbindung erfolgt oft langsam, im Gleichgewicht kann das abschließend wieder freiwerdende Enzym erneut mit Substrat reagieren und die Reaktion erfolgt schnell und effizient. Die Gleichung für diese reversible Reaktion sieht wie folgt aus:



Für unsere folgenden Experimente verwenden wir das Enzym Katalase.



*3-D Modelling der Rinder-Leber Katalase mit Darstellung der vier Häm-Gruppen und dreiwertigem Eisen.*

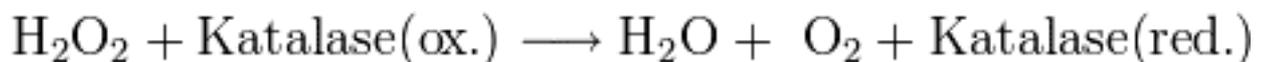
Katalase (Gen-Name: CAT) ist der Name für das Enzym, das Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Wasser (H<sub>2</sub>O) umsetzt. Wasserstoffperoxid entsteht beim Abbau von Hyperoxiden durch die Superoxiddismutase. Es fällt als Nebenprodukt beim Abbau von Purinen und bei der Oxidation von Fettsäuren an und kann zur Schädigung von Genom und Proteinen führen. Katalasen befinden sich daher in fast allen aerob lebenden Lebewesen, beim Menschen vor allem in den Peroxisomen der Leber und Nieren, und

den Erythrozyten. Mutationen im CAT-Gen können zum erblichen Katalasemangel führen, der in Japan gehäuft vorkommt.

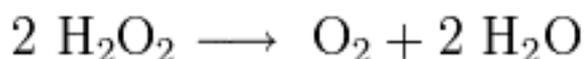
Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird Wasserstoffperoxid reduziert und das Enzym oxidiert, das Produkt Wasser entsteht.



Im zweiten Schritt werden sowohl Wasserstoffperoxid als auch das Enzym reduziert und Sauerstoff oxidiert und damit als Produkt neben einem weiteren Wassermolekül freigesetzt.



Die Summengleichung lautet:



Sowohl Wechselzahl als auch katalytische Effizienz des Enzyms gehören zu den höchsten je bei Enzymen gefundenen Werten. Bei niedrigen Wasserstoffperoxidkonzentrationen kann durch die oxidierte Katalase Methanol und Ethanol über den Aldehyd zur Säure oxidiert werden.

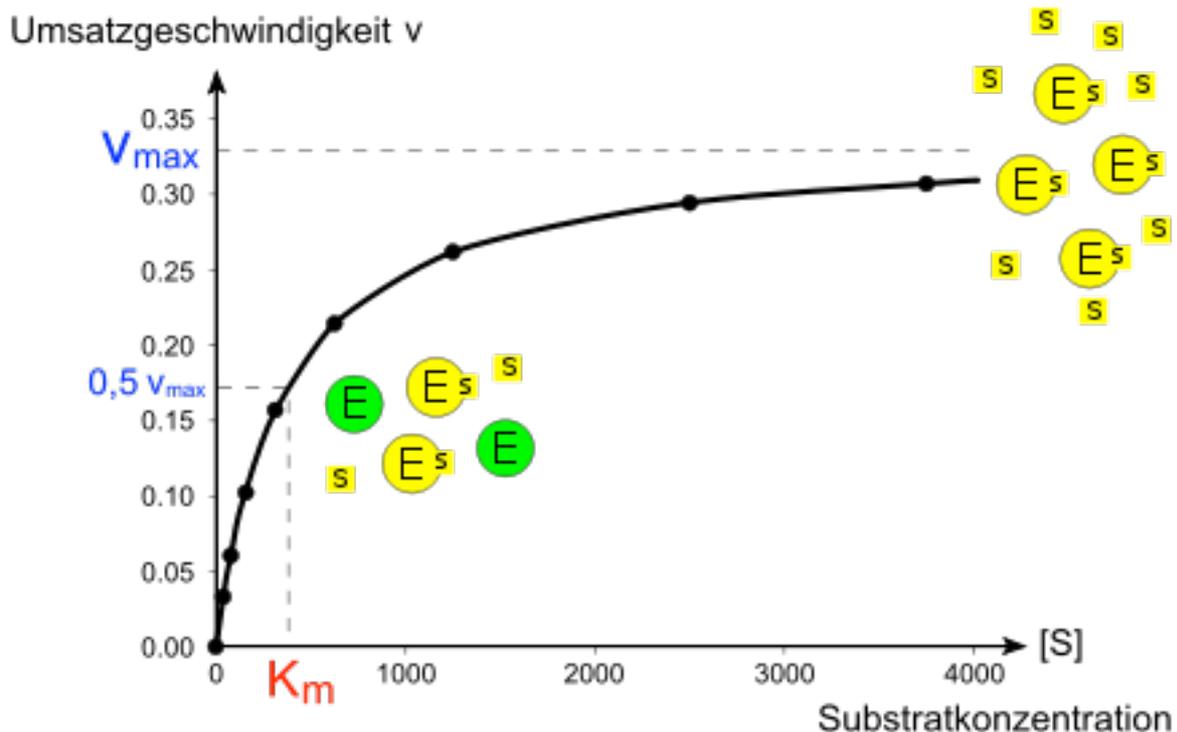
Die Enzymkinetik beschäftigt sich mit dem zeitlichen Verlauf enzymatischer Reaktionen. Eine zentrale Größe hierbei ist die Reaktionsgeschwindigkeit. Sie ist ein Maß für die Änderung der Substratkonzentration mit der Zeit, also für die Stoffmenge Substrat, die in einem bestimmten Reaktionsvolumen pro Zeiteinheit umgesetzt wird (Einheit: mol/(l·s)). Neben den Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert der Lösung, hängt sie von den Konzentrationen des Enzyms, der Substrate und Produkte sowie von Effektoren (Aktivatoren oder Inhibitoren) ab.

Im Zusammenhang mit der Reaktionsgeschwindigkeit steht die Enzymaktivität. Sie gibt an, wie viel aktives Enzym sich in einer Enzym-Präparation befindet. Die Einheiten der Enzymaktivität sind Unit (U) und Katal (kat), wobei 1 U definiert ist als diejenige Menge Enzym, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt: 1 U = 1 µmol/min. Katal wird selten benutzt, ist jedoch die SI-Einheit der Enzymaktivität: 1 kat = 1 mol/s. Eine weitere wichtige Messgröße bei Enzymen ist die spezifische Aktivität (Aktivität pro Masseneinheit, U/mg). Daran kann man sehen, wie viel von dem gesamten Protein in der Lösung wirklich das gesuchte Enzym ist.

Die gemessene Enzymaktivität ist proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit und damit stark von den Reaktionsbedingungen abhängig. Sie steigt mit der Temperatur entsprechend der RGT-Regel an: eine Erhöhung der Temperatur um ca. 5–10 °C führt zu einer Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch der Aktivität. Dies gilt

jedoch nur für einen begrenzten Temperaturbereich. Bei Überschreiten einer optimalen Temperatur kommt es zu einem steilen Abfallen der Aktivität durch Denaturierung des Enzyms. Änderungen im pH-Wert der Lösung haben oft dramatische Effekte auf die Enzymaktivität, da dieser die Ladung einzelner für die Katalyse wichtiger Aminosäuren im Enzym beeinflussen kann. Jenseits des pH-Optimums vermindert sich die Enzymaktivität und kommt irgendwann zum Erliegen. Ähnliches gilt für die Salzkonzentration bzw. die Ionenstärke in der Umgebung.

### Michaelis-Menten-Theorie



### Sättigungshyperbel

Ein Modell zur kinetischen Beschreibung einfacher Enzymreaktionen ist die Michaelis-Menten-Theorie (MM-Theorie). Sie liefert einen Zusammenhang zwischen der *Reaktionsgeschwindigkeit*  $v$  einer Enzymreaktion sowie der Enzym- und Substratkonzentration  $[E_0]$  und  $[S]$ . Grundlage ist die Annahme, dass ein Enzym mit einem Substratmolekül einen Enzym-Substrat-Komplex bildet und dieser entweder in Enzym und Produkt oder in seine Ausgangsbestandteile zerfällt. Was schneller passiert hängt von den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  ab.



Das Modell besagt, dass mit steigender Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit steigt. Das geschieht anfangs linear und flacht dann ab, bis eine weitere Steigerung der Substratkonzentration keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit des Enzyms hat, da dieses bereits mit Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  arbeitet. Die MM-Gleichung lautet wie folgt:

$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S_0]}{K_m + [S_0]}$$

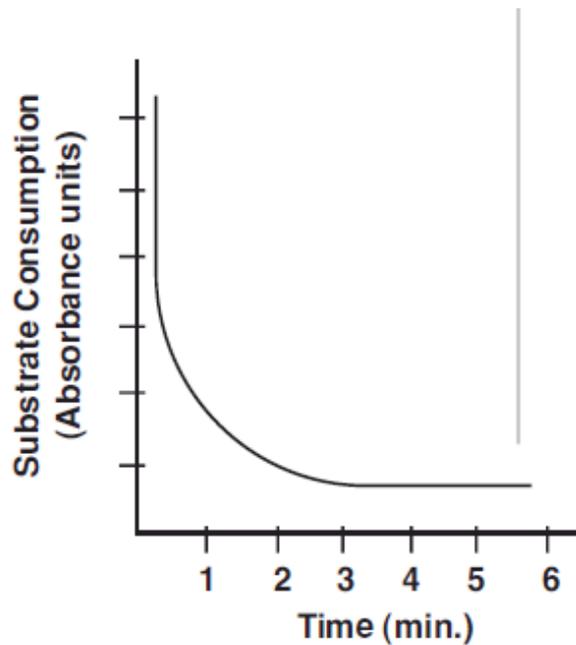
Die Parameter  $K_m$  und  $k_{cat}$  sind geeignet, Enzyme kinetisch zu charakterisieren, d. h. Aussagen über ihre katalytische Effizienz zu treffen. Ist  $K_m$  beispielsweise sehr niedrig, heißt das, das Enzym erreicht schon bei niedriger Substratkonzentration seine Maximalgeschwindigkeit und arbeitet damit sehr effizient. Bei geringen Substratkonzentrationen ist die Spezifitätskonstante  $k_{cat}/K_m$  ein geeigneteres Maß für die katalytische Effizienz. Erreicht sie Werte von mehr als  $10^8$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , wird die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch durch die Diffusion der Substrat- und Enzymmoleküle begrenzt. Jeder zufällige Kontakt von Enzym und Substrat führt zu einer Reaktion. Enzyme, die eine solche Effizienz erreichen, nennt man „katalytisch perfekt“.

In unserem speziellen Experiment befassen wir uns mit einem enzymatischen Assay, d.h. wir verfolgen eine durch Katalase katalysierte Enzymreaktion unter Betrachtung aller an dieser Reaktion beteiligten Substrate und Produkte.

Entscheidend für diese Reaktion ist zunächst die Startgeschwindigkeit, mit der das Enzym an das Substrat bindet, diese Geschwindigkeit bleibt im Prozess bei gleicher Temperatur und gleichem pH-Wert so lange konstant, bis kein Substrat mehr gebunden werden kann.

$$V = \frac{[S]_1 - [S]_2}{T_1 - T_2}$$

In der obigen Gleichung stellt  $[S]_1$  die molare Konzentration des Substrates zu einer beliebigen Startzeit  $T_1$  dar, während  $[S]_2$  die Substratkonzentration zu einem zweiten Zeitpunkt  $T_2$  markiert. Trägt man unterschiedliche Messwerte in diese Gleichung ein und erstellt einen Graphen, so wird man feststellen, dass eine Abnahme der Substratkonzentration gegen die Zeit erfolgt:

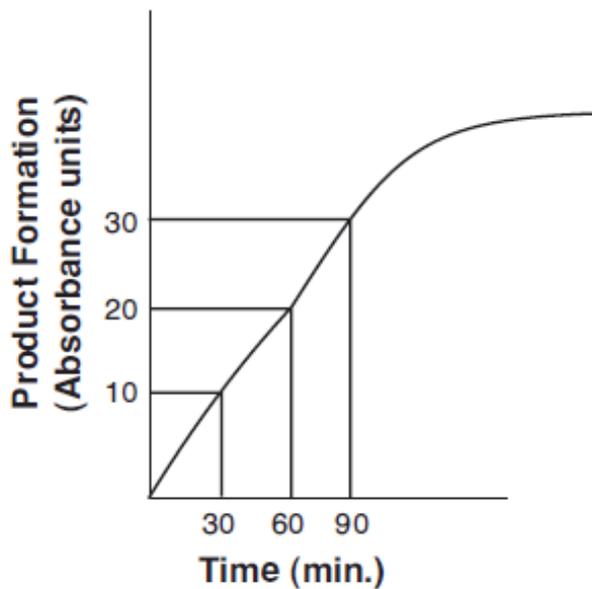


Betrachtet man umgekehrt die Entstehung eines Produktes gegen die Zeit, was durch folgende Gleichung charakterisiert ist:

$$V = \frac{[P]_2 - [P]_1}{T_2 - T_1}$$

Einheit der Gleichung:  $\mu\text{mol Produkt/s}$

So lässt sich schnell feststellen, dass eine schnellstmögliche Bildung des Produktes erfolgt, bis ein gewisser Sättigungsgrad an Produkt erhalten ist. Ab diesem Zeitpunkt bleibt die Bildung des Produktes in Abhängigkeit von der Zeit nahezu konstant.



An unserem Beispiel lässt sich zeigen, dass zum Zeitpunkt 0 kein Produkt gebildet wird. Nach 30 Sekunden werden 10  $\mu\text{mol}$  Produkt gebildet, nach 60 Sekunden werden 20  $\mu\text{mol}$  und nach 90 Sekunden werden 30  $\mu\text{mol}$  Produkt gebildet. Setzt man nun die obigen Werte in unsere Gleichung ein, so erhält man folgendes Ergebnis für die Rate der Produktbildung innerhalb einer enzymatischen Reaktion:

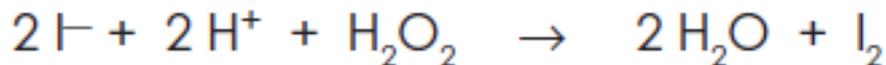
$$\frac{30\mu\text{mol} - 10\mu\text{mol}}{90\text{s} - 30\text{s}} = \frac{20}{60} = 0.33\mu\text{mol/s}$$

In unserem Experiment verwenden wir einen kolorimetrischen Enzymnachweis, d.h die Menge an gebildetem Produkt wird durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Unter Kolorimetrie (auch Absorptionsphotometrie oder Spektrophotometrie genannt) versteht man generell die Konzentrationsbestimmung einer lichtabsorbierenden Substanz in einer flüssigen, festen oder gasförmigen Phase durch eine Vergleichsmessung mit einer Probe bekannter Konzentration.

Das Messprinzip beruht darauf, dass ein Lichtstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge und einer bestimmten Intensität durch ein Probenglas (Küvette) bestimmter Dicke geleitet wird. Je nach Stoff wird Licht bestimmter Wellenlängen (unterschiedliche Energieinhalte) absorbiert (verschluckt). Die Stärke der Absorption hängt von der Konzentration des Stoffes ab.

Das für die Kolorimetrie verwendete Licht reicht vom UV-Bereich über das sichtbare Licht bis in den IR-Bereich. Die Berechnung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

In unserem Experiment messen wir also das noch nach der Katalyse verbleibende Wasserstoffperoxid in der Reaktion mittels einer zweiten, farbigen Reaktion. Dazu lassen wir Kaliumiodid-Lösung mit dem Reaktionsgemisch reagieren. Die Iod-Ionen binden an noch verbleibende, freie Wasserstoff-Ionen und bilden einen das farbige, rotbraune Iod.



Warum machen wir das?

Das Enzym Katalase katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff nur in einer optimalen Umgebung. In einer säurehaltigen Umgebung wird die Katalase denaturiert und kann die enzymatische Reaktion nicht beenden (Inhibitoren für die Katalase sind Cyanid, Phenol, Azid und Harnstoff. Alle diese Hemmstoffe wirken kompetitiv und werden an die Katalase direkt gebunden. Sie verringern so die katalytische Wirksamkeit des Enzyms. Ein weitere Inhibitor ist Wasserstoffperoxid selbst. In hoher Konzentration vergiftet es das Enzymsystem. Bis zu einer Konzentration von 0.4 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Substratkonzentration. Bei höherer  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Konzentration fällt die Reaktionsgeschwindigkeit stark ab).

## 1. Experiment:

*Wenn man die Abnahme an Substrat innerhalb einer Reaktion als Funktion gegen die Zeit darstellen kann, so kann aus diesen Resultaten sowohl qualitative als auch quantitative Rückschlüsse auf die Enzymrate gezogen werden.*

Zu einer gepufferten Lösung Wasserstoffperoxid wird schrittweise Katalase zugegeben. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wird Schritte zu je 30 Sekunden dokumentiert.

## Vorbereitung des Experimentes

1) Beschrifte 8 leere Reaktionsröhrchen mit einem wasserfesten Marker.

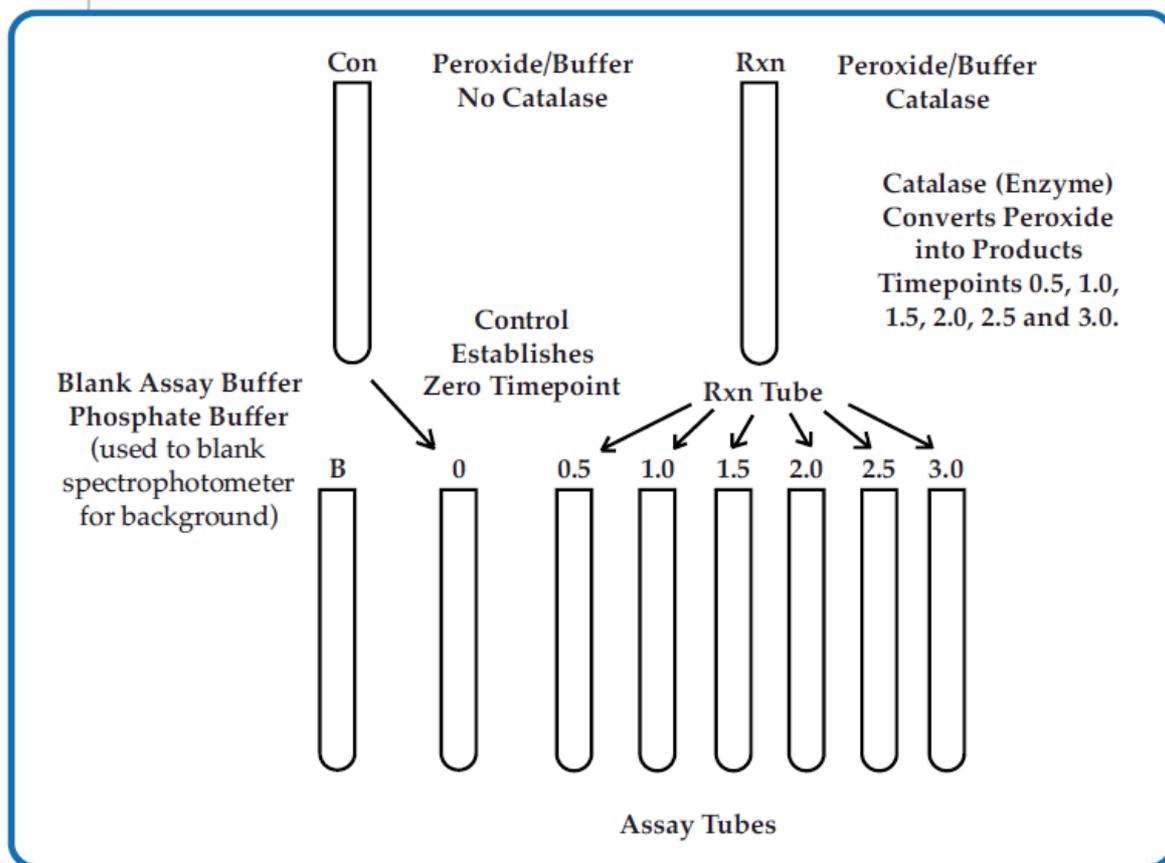
B  
0  
0.5  
1.0  
1.5  
2.0

Gib in jedes Röhrchen mit 3ml der Assay-Lösung – verwende eine 5ml Pipette!

2) Anschließend gibst Du in jedes Röhrchen 0.3ml verdünnten Puffer und mischst die Probe durch vortexen oder mehrmaliges, vorsichtiges Schütteln.

3) Beschrifte zwei weitere Röhrchen mit C (für Kontrolle) und R (für Reaktion)

- 4) Gib in beide Röhrrchen 1,8ml des Enzym-Reaktion-Gemisch
- 5) Gib zum Röhrrchen für die Kontrolle 0,3ml Phoshatpuffer und mische vorsichtig.
- 6) Dann entnimmst Du diesem Röhrrchen 0,3ml und gibst diese 0,3ml Reaktionsgemisch in das Röhrrchen 0
- 7) Jetzt kann Du das Kontrollröhrrchen erst mal zur Seite stellen und machst mit dem Reaktionsröhrrchen R weiter.



- 8) Gib 0,3ml verdünnte Enzymlösung zum mit „R“ gekennzeichneten Röhrrchen und mische vorsichtig. Stoppuhr in der anderen Hand parat halten und los geht's!
- 9) Entnimm dem Röhrrchen R 0,3ml Reaktionsgemisch (mit einer frischen Pipettenspitze) und gib diese 0,3ml zum Zeitpunkt 30 Sekunden zum Röhrrchen „0.5“ – kurz mischen.
- 10) Entnimm dem Röhrrchen R Reaktionsgemisch (mit einer frischen Pipettenspitze) und gib diese 0,3ml zum Zeitpunkt 60 Sekunden zum Röhrrchen „1.0“ – kurz mischen.
- 11) Entnimm dem Röhrrchen R Reaktionsgemisch (mit einer frischen Pipettenspitze) und gib diese 0,3ml zum Zeitpunkt 90 Sekunden zum Röhrrchen „1.5“ – kurz mischen.
- 12) Entnimm dem Röhrrchen R Reaktionsgemisch (mit einer frischen Pipettenspitze) und gib diese 0,3ml zum Zeitpunkt 120 Sekunden zum Röhrrchen „2.0“ – kurz mischen.
- 13) Warte jetzt noch 3-4 Minuten um eine vollständige Reaktion und damit Farbentwicklung zu erhalten.

14) Abhängig vom verwendeten Spektrometer kann jetzt weiter mit den Reaktionsröhrchen gearbeitet werden, oder Du musst die Reaktionsgemische in eine Küvette transferieren (immer neue Spitzen verwenden).

15) Die Probe B dient dazu, beim Spektrometer die Nulllinie bei der Wellen 500nm einzustellen, dazu gibt man die Probe ins Gerät und drückt auf „Nullabgleich“, d.h. hat diese Probe bestehend aus Wasser und Puffer bereits eine leichte Färbung (durch Verunreinigung etc.), so wird diese Verfärbung bei der Messung der folgenden Proben nicht berücksichtigt.

16) Miss nun die einzelnen Proben und trage die gemessenen Werte in der Tabelle im Feld A<sub>500</sub> ein.

TIME (min)	Assay Solution	Diluted Buffer	Volume Con	Volume Rxn	A <sub>500</sub>
Blank	3ml	0.3ml	---	---	
0	3ml	---	0.3ml	---	
0.5	3ml	---	---	0.3ml	
1.0	3ml	---	---	0.3ml	
1.5	3ml	---	---	0.3ml	
2.0	3ml	---	---	0.3ml	
2.5	3ml	---	---	0.3ml	
3.0	3ml	---	---	0.3ml	

Du kannst nun einen Graphen erstellen, der die Absorption in Abhängigkeit von der Zeit darstellt.

Um Deine Ergebnisse Bezug auf die molare Konzentration an Wasserstoffperoxid darzustellen gehe wie folgt vor:

$$\frac{(\text{Absorption})}{\epsilon} \times 11 = \text{Molarität des Wasserstoffperoxids in „R“}$$

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (in diesem Assa  $5 \times 10^3$ )

11 = Verdünnungsfaktor für dieses System

In der Chemie ist der Extinktionskoeffizient ( $\varepsilon$ , Epsilon), genauer gesagt der molare, dekadische Extinktionskoeffizient (Synonym: molarer Absorptionskoeffizient) ein Maß dafür, wie viel elektromagnetische Strahlung eine spezielle Substanz in molarer Konzentration bei einer Durchtrittslänge von 1 cm und bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert. Dieser Begriff wird häufig in der UV/VIS-Spektroskopie bzw. Photometrie verwendet. Seinen Wert erhält man über die Gleichung

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

abgeleitet von einer fundamentalen Gleichung der Photometrie, dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E bezeichnet die Extinktion, d. h. die Verminderung der Intensität, des im Photometer gemessenen Lichtes (um genau zu sein, ist die Extinktion definiert als der dekadische Logarithmus des Verhältnisses der Ausgangsintensität  $I_0$  und der hinter der Probe gemessenen Intensität  $I$ , was auch als Probedurchlässigkeit bezeichnet werden kann). Die Extinktion  $E$  ist eine dimensionslose Größe.

- \*  $\varepsilon$  ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient
- \*  $c$  ist die Konzentration der Lösung in der Messküvette
- \*  $d$  ist die Schichtdicke der Messküvette (meist 1 cm)

Die gängige Einheit des Extinktionskoeffizienten ist  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Er ist abhängig von der Wellenlänge und der Temperatur bei der gemessen wird. Farbstoffe in wässriger Lösung haben ihr Absorptionsmaximum im sichtbaren Spektralbereich (VIS) und meist Extinktionskoeffizienten in der Größenordnung von  $10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## Versuchsauswertung:

Erstelle jetzt einen Graphen aus der Wasserstoffperoxidkonzentration gegen die Zeit und zeichne eine Bestgerade durch Deine Werte (größere Abweichungen zwischen dem Zeitpunkt 0 und dem ersten gemessenen Datenpunkt von dieser Bestgerade sind vollkommen normal). Zeichne eine lineare

Jetzt kannst du die Geschwindigkeit der Umwandlung von Wasserstoffperoxid berechnen, sie entspricht der Steigung Deiner Bestgeraden. Dazu wählst Du zunächst einen Dir zwei Punkt auf der Zeitachse. Von diesen Punkten ziehst Du eine Gerade auf Bestgerade. Von

den Schnittpunkten dieser Geraden mit Deiner Bestgerade ziehst Du zwei weitere Geraden auf die Achse Molarität der Wasserstoffperoxidkonzentration.

Notiere alle vier Werte und setze Sie in folgende Gleichung ein:

$$\text{Umsatzrate} = \frac{(\text{Peroxid 1} - \text{Peroxid 2})}{(\text{Zeit 1} - \text{Zeit 2})}$$

### Fragen zum Versuch:

- 1) Warum konntest Du bei einem Schritt des Versuchs Blasen im Röhrchen aufsteigen sehen?
- 2) Würden diese Blasen auch aufsteigen wenn Du die Enzymlösung vor Beginn des Versuchs kochen würdest?
- 3) Aus was bestehen die Blasen?
- 4) Warum nimmt die Farb-Intensität der Lösungen mit Dauer des Experimentes ab?
- 5) Was genau kann die Umsatzrate verringern?
- 6) Wir behandeln die Enzymlösung vor Versuchsbeginn mit Trypsin, einem proteolytischen Enzym – dann wiederholen wir den Versuch. Warum wirkt unser Enzym nun nicht mehr als Katalysator?
- 7) Mit einem Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration erhöht sich in unserem Experiment die Umsatzrate des Enzyms. Warum kommt die Reaktion / Umsatzrate des Enzyms bei einem sehr hohen Level an Wasserstoff zum Erliegen?
- 8) Erkläre die Reaktion die zum Umsatz-Stopp führt!
- 9) Erstelle einen Graphen, der die Wasserstoffperoxid-Bildung gegen die Zeit darstellt:
  - a. Horizontale X-Achse gibt die Zeit/min vor (unabhängige Variable)
  - b. Vertikale Y-Achse gibt die Peroxidkonzentration an (abhängige Variable)

**Quellenangaben:**

- # ↑ Löffler, Petrides, Heinrich: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007), ISBN 978-3540326809, S. 289
- # ↑ Löffler, Petrides, Heinrich: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007), ISBN 978-3540326809, S. 58, 147
- # ↑ Linderstrøm-Lang, K.U. (1952): Proteins and Enzymes. In: Lane Medical Lectures. Bd. 6, S. 1-115. Stanford University Publications, University Series, Medical Sciences, Stanford University Press.
- # ↑ Eintrag: tertiary structure. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). doi:10.1351/goldbook.T06282.
- # ↑ Eintrag: quaternary structure. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). doi:10.1351/goldbook.Q05004.
- # ↑ Brockhaus ABC Chemie, VEB F. A. Brockhaus Verlag Leipzig 1965, S. 709.
- # ↑ Otto-Albrecht Neumüller (Herausgeber): Römpps Chemie Lexikon, Frank'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1983, 8. Auflage, S. 2177-2178, ISBN 3-440-04513-7.
- # ↑ Otto-Albrecht Neumüller (Herausgeber): Römpps Chemie Lexikon, Frank'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1983, 8. Auflage, S. 2177-2178, ISBN 3-440-04513-7.
- # ↑ Klaus Lüders, Robert Otto Pohl: Pohls Einführung in die Physik: Band 2: Elektrizitätslehre und Optik. Springer, 2010, ISBN 9783642016271.