

Arbeitsgruppe D 6 Clara Dees
Susanne Duncker
Anja Hartmann
Kristin Hofmann

Kurs 10: Enzymologie

Einleitung

Enzyme ermöglichen durch ihre katalytische Wirkung viele Reaktionen im Stoffwechsel von Lebewesen. Im Allgemeinen handelt es sich bei Enzymen um Proteine, deren Aktivität von bestimmten Umweltbedingungen abhängt – dies sind unter anderem der pH-Wert, die Temperatur, die Ionenstärke und die Substratmenge. Einige Proteine sind mit so genannten Cofaktoren¹ bzw. prosthetischen Gruppen² assoziiert, die die Katalysefunktion innehaben.

In diesem Kurs lernten wir anhand der Stärke-Phosphorylase aus der Kartoffelknolle grundlegende Dinge über die enzymatische Katalyse physiologischer Reaktionen.

Verwendetes Material

- handelsübliche Kartoffelknolle
- Reibe
- 1 M Mercaptoethanol-Lösung
- Stärkelösung (1 mg/ml)
- 0,08 M Citratpuffer mit 0,02 M NaF mit verschiedenen pH-Werten (4,5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,5)
- 0,02 M Glukose-1-Phosphat
- 0,008 M Glukose-1-Phosphat
- J₂-Reagenz (Zusammensetzung s. Skript S. 126)

Versuchsbeschreibung und Auswertung

1. Vorbereitung

Um die Experimente durchführen zu können, musste zunächst die Phosphorylase aus der Kartoffelknolle extrahiert werden. Hierzu wurde die Knolle mit Hilfe einer Reibe gerieben. Um Schädigung der Enzymmoleküle durch Oxidation zu vermeiden, wurde die Reibe mit Mercaptoethanol befeuchtet. Der entstandene Brei wird durch ein Zellstofftuch gepresst und die so gewonnene Lösung zehn Minuten lang bei 12000 Upm zentrifugiert. Um die übrig gebliebenen Zellen aufzubrechen, wird die Lösung eingefroren – die sich bildenden Eiskristalle zerstören die Zellstrukturen. Nach dem Auftauen wird die Lösung erneut zentrifugiert und der Überstand, der Enzymextrakt, auf Eis aufbewahrt.

1 ml des Enzymextrakts wird 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf die wie im Skript auf Seite 126 beschriebenen hergestellten Ansätze verteilt (Ansatz 12 wurde erst nach Inkubation und J₂-Zugabe mit Enzymextrakt versetzt, s. Skript S. 127). Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen (siehe Skript S. 127 f) 20 Minuten inkubiert, danach wurden jeder Probe 2 ml J₂-Reagenz zugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen.

2. Erstellung einer Eichgeraden

Um die Stärkemenge in unseren Proben zu bestimmen, benötigten wir für unsere Photometerergebnisse eine Eichgerade, die durch Messung von Stärkelösungen bekannter Konzentration (Ansatz 1 – 6) erstellt wurde. Die Zusammensetzung der Stärkelösungen ist der Tabelle auf S. 126 im Skript zu entnehmen.

¹ Coenzyme: Cofaktoren, die leicht vom Protein abdissoziieren

² prosthetische Gruppen: Cofaktoren, die fest an das Protein gebunden sind, z.B. das Häm im Hämoglobin

Die Eichgerade wurde erstellt, indem die Werte der optischen Dichte der Ansätze 1 und 6 verbunden wurden, da diese Gerade sehr gut zu den Werten der Ansätze 1 – 6 passt. Ansatz 6a liegt nicht auf der so erstellten und weitergeführten Eichgeraden, was vermutlich daran liegt, dass das Photometer aufgrund des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei Werten der optischen Dichte über 0,9 nur ungenau messen kann. Der in Tabelle 1 enthaltene Eichgeradenwert für Ansatz 6a wurde daher aufgrund der Steigung der Werte der Ansätze 1 – 6 errechnet.

Entgegen der Anleitung im Skript fertigten wir einen weiteren Ansatz, Ansatz 6a, an, der ausschließlich 0,65 ml Stärke enthielt.

Die Ansätze wurden bei 620 nm im Photometer vermessen. Die Ergebnisse und die entstandene Eichgerade sind in Tabelle 1 und Diagramm 1 zu sehen.

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6	6a
Stärkemenge [μg]	0	50	100	200	300	400	650
optische Dichte [nm]	0	0,105	0,192	0,392	0,564	0,743	1,118
Eichgerade	0,000					0,743	1,204

Tabelle 1: Ermittelte Photometerwerte für die Erstellung der Eichgerade

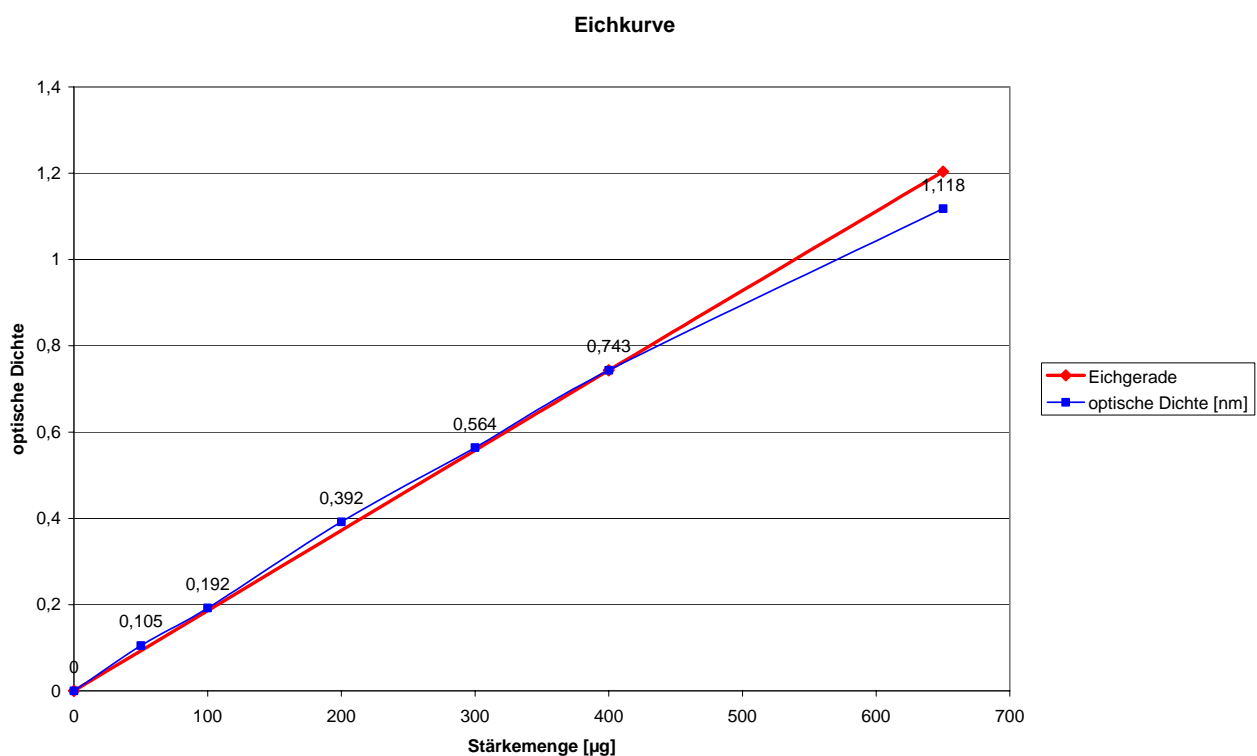


Diagramm 1: Eichgerade auf Basis der Daten aus Tabelle 1

Mit Hilfe der in Diagramm 1 dargestellten Eichgeraden konnten wir die Stärkemenge der anderen Lösungen bestimmen.

3. Bestimmung des pH-Optimums

Um das pH-Optimum zu messen, wurden die nach Skript S. 127 angefertigten Ansätze 7 bis 12, die verschiedene pH-Werte hatten, zum gleichen Zeitpunkt mit 0,15 ml verdünntem Enzymextrakt versetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert (Ansatz 12 wurde nach Skript S. 127 erst nach der J_2 -Zugabe mit Enzymextrakt versetzt). Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion durch J_2 -Zugabe (S. Skript S. 127) wurde die Extinktion im Photometer gemessen und die verbleibende Stärkemenge mit Hilfe der Eichgerade bestimmt. Die Messergebnisse sind Tabelle 2 zu entnehmen, in Diagramm 2 sind sie grafisch dargestellt.

Ansatz	7	8	9	10	11	12
optische Dichte [nm]	0,014	0,155	0,326	0,274	0,105	0
Stärkemenge [$\mu\text{g}/20 \text{ min}$]	8,069	89,340	187,902	157,930	60,521	0,000
Stärkemenge [$\mu\text{g}/\text{min}$]	0,403	4,467	9,395	7,897	3,026	0,000
pH-Wert	4,5	5,5	6	6,5	7,5	6

Tabelle 2: berechnete verbliebene Stärkemenge bei verschiedenen pH-Werten

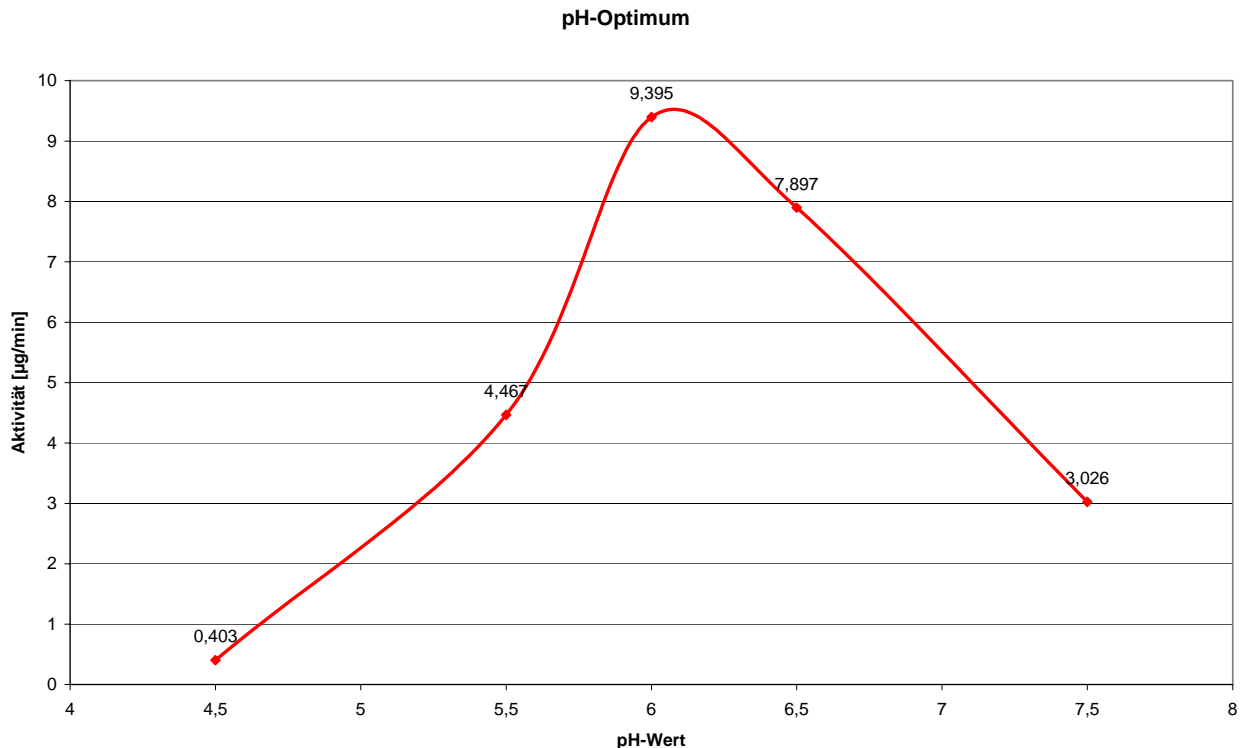


Diagramm 2: grafische Darstellung der Werte aus Tabelle 2

Die Ergebnisse dieses Experiments legen den Schluss nahe, dass das pH-Optimum der Phosphorylase bei pH 6,0 liegt, da sie, wie aus Diagramm 2 ersichtlich, bei diesem pH-Wert die meisten Substratmoleküle pro Minute umsetzt, also die höchste Aktivität aufweist.

Ein pH-Wert, der nicht dem Optimum des Enzyms entspricht, hat zur Folge, dass die Tertiär- und gegebenenfalls Quartärstruktur des Enzyms durch nicht vorhergesehene Bindungen von Protonen und OH-Gruppen gestört, wenn nicht sogar vollständig zerstört wird. Dies ist der Grund, weshalb die Phosphorylase bei niedrigerem oder höherem pH-Wert als 6,0 eine geringere Aktivität zeigt.

4. Ermittlung des Temperaturoptimums

Um das Temperaturoptimum der Phosphorylase zu bestimmen, wurden die Ansätze 13, 14, 9 und 15, die bei verschiedenen Temperaturen inkubiert worden waren (s. Skript S. 127), mit Hilfe des Photometers auf ihre Stärkemenge hin untersucht. Die dabei gewonnenen Daten sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Ansatz	13	14	9	15
Inkubationstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	4	21	37	60
oD	0,014	0,211	0,326	0,046
Stärkemenge [$\mu\text{g}/20 \text{ min}$]	8,07	121,62	187,90	26,51
Stärkemenge [$\mu\text{g}/\text{min}$]	0,40	6,08	9,40	1,33

Tabelle 3: Daten zur Bestimmung des Temperaturoptimums

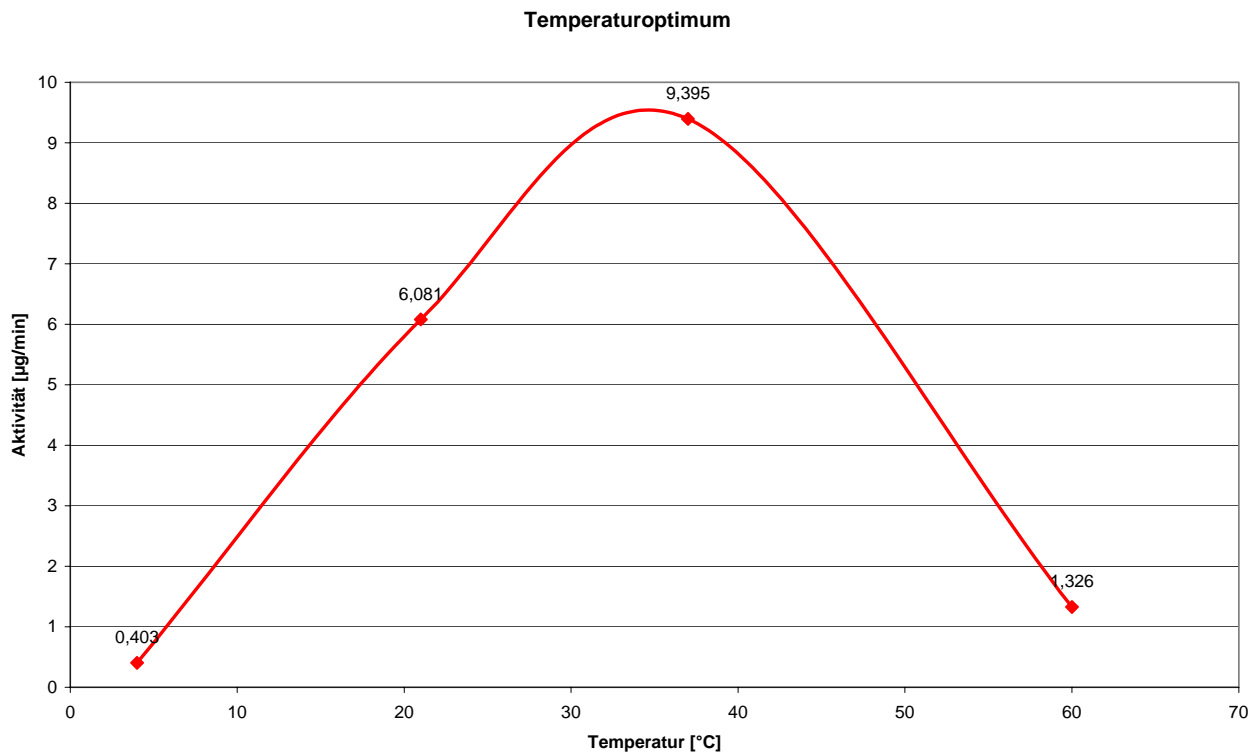


Diagramm 3: Temperaturoptimum aufgrund der Daten aus Tabelle 3

Unsere Ergebnisse belegen, dass die Phosphorylase ihr Temperaturoptimum bei ca. 37 °C hat. Jedoch ist zu beachten, dass wir lediglich vier Messpunkte hatten und somit keine exakten Aussagen über den genauen Verlauf der Optimumskurve machen können – hierzu wären genauere Messungen notwendig.

Die Enzymaktivität verändert sich zwischen 4 °C und 37 °C um den Faktor 23,5. Die RGT-Regel besagt, dass sich die Aktivität von Enzymen bei einem Temperaturanstieg um ca. 10 °C verdoppelt. Unsere Daten übertreffen dies sogar bei weitem.

5. Bestimmung des K_M -Wertes für Glukose-1-Phosphat

Der K_M -Wert, auch Michaelis-Menten-Konstante genannt, ist die Substratmenge, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms halbmaximal ist. Dieser K_M -Wert wird grafisch bestimmt. Hierzu wurden die Ansätze 16 – 23 wie im Skript auf S. 128 beschrieben vorbereitet und nach der Reaktion am Photometer vermessen. Die von uns ermittelten Daten sind in Tabelle 4 beschrieben und in Diagramm 4 grafisch aufgetragen. Zur grafischen Bestimmung des K_M -Wertes wurde die grafische Darstellung nach Lineweaver-Burk (Diagramm 4a) verwendet – hierbei wurde der Nullwert, also Ansatz 16, außer Acht gelassen, da eine Teilung durch 0 mathematisch nicht möglich ist.

Ansatz	16	17	18	19	20	21	22	23
oD	0,000	0,109	0,170	0,196	0,187	0,175	0,146	0,112
Stärkemenge [µg/20 min]	0,000	62,826	97,986	112,972	107,784	100,868	84,153	64,555
Stärkemenge [µg/min]	0,000	3,141	4,899	5,649	5,389	5,043	4,208	3,228
G-1-P-Konzentration [mM]	0,000	0,308	0,615	0,923	1,231	1,846	3,077	4,308

Tabelle 4: Werte zur Bestimmung des K_M -Werts und V_{max}

Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Geschwindigkeit

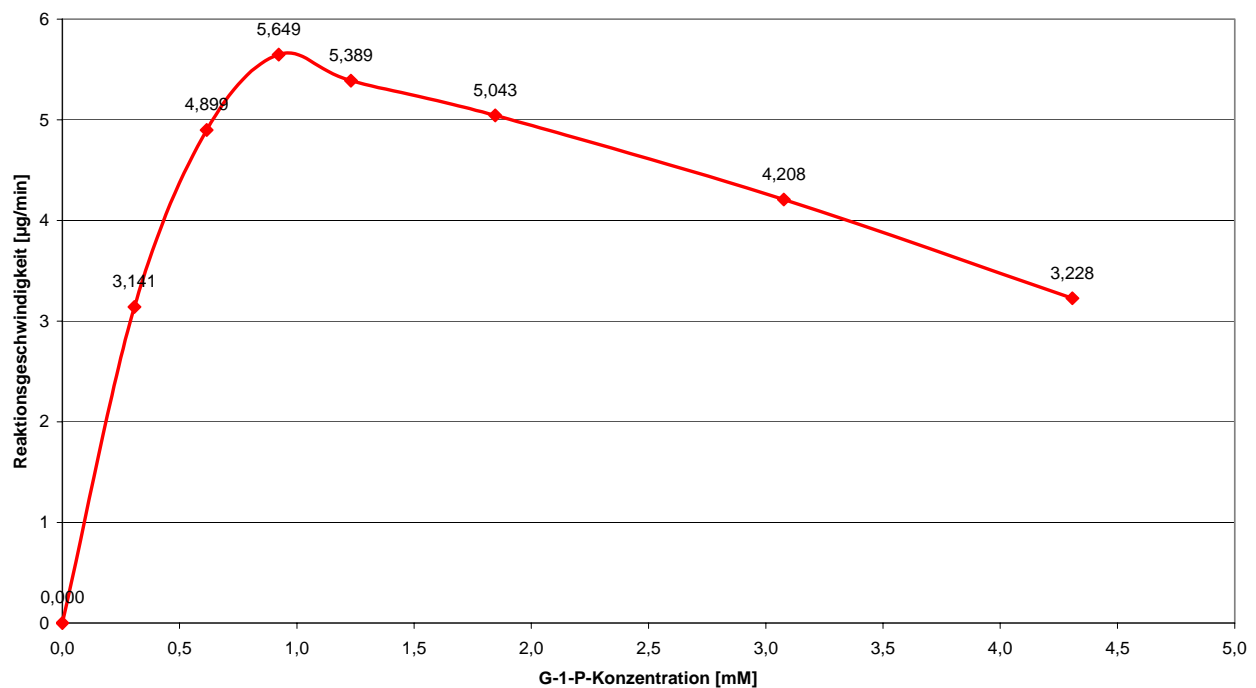


Diagramm 4: grafische Darstellung der Werte aus Tabelle 4

Darstellung nach Lineweaver-Burk

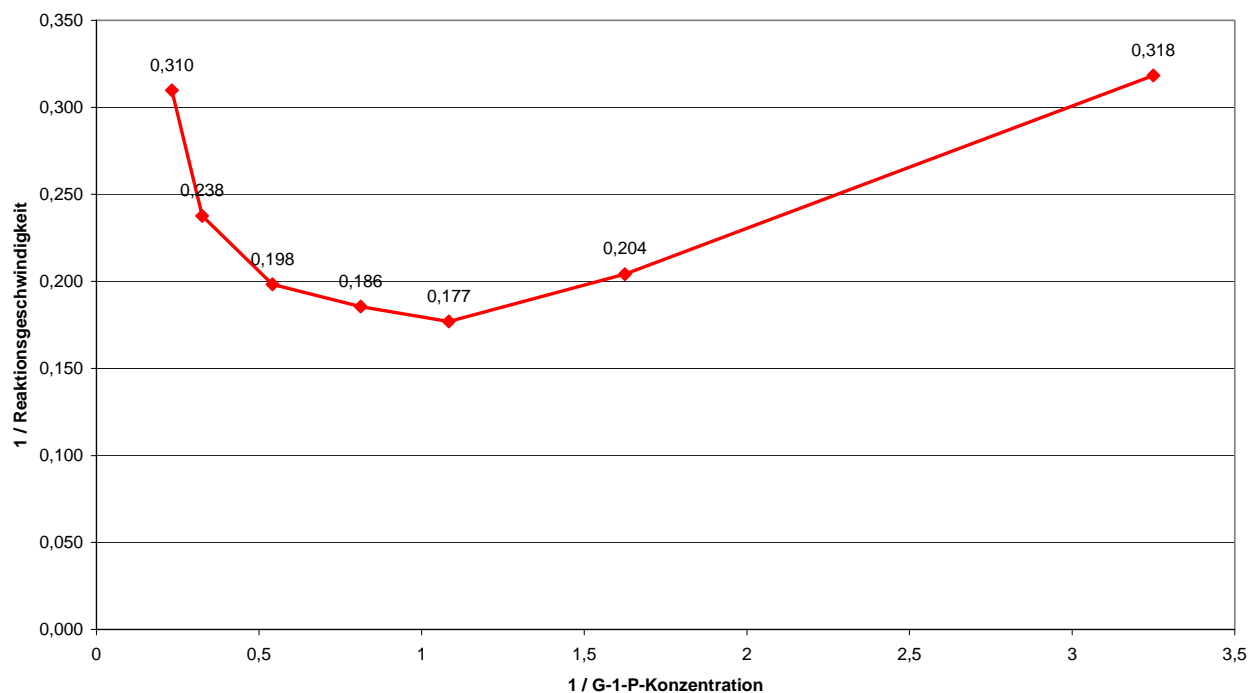


Diagramm 4a: grafische Darstellung der Werte aus Tabelle 4 nach Lineweaver-Burk

Wie aus Diagramm 4a deutlich ersichtlich ist, entsprechen unsere Daten nicht den zu erwartenden Ergebnissen, da die Lineweaver-Burk-Darstellung nicht einmal annäherungsweise eine Gerade ergibt. Diesen Fehlern liegen zwei Ursachen zugrunde:

1. Nach der Inkubationszeit der Ansätze von 20 Minuten sollte die Enzymreaktion durch Zugabe von J_2 abgebrochen werden. Die Zugabe der J_2 -Lösung verschob sich aufgrund von Pipettierungsschwierigkeiten bei jedem Ansatz etwas nach hinten. Da wir die Ansätze leider während dieser Zeit im Wasserbad beließen, verlängerte sich die Inkubationszeit sowie die

Enzymreaktionszeit bei jedem Ansatz ein wenig. Die Enzymreaktionen wurden also nicht alle nach der gleichen Zeit abgebrochen, was verschiedene Ergebnisse zur Folge hat.

- Bei der Vorbereitung der Küvetten für die Bestimmung der optischen Dichte am Photometer unterlief uns ein weiterer Fehler beim Pipettieren. In der Annahme, die Küvetten seien bisher mit der falschen Menge an Probe befüllt worden, wurde während der Vorbereitung der Küvetten etwa ab Ansatz 17 eine andere Füllhöhe für die Küvetten gewählt. Es ist möglich, dass dieser Vorgang die Messung des Photometers durch zu niedrige Füllhöhe der Küvetten vor oder nach der Veränderung der Füllhöhe beeinflusste.

Um einen K_M -Wert bestimmen zu können, verwenden wir daher für die Diagramme 5 und 5a die Werte der Gruppe D10.

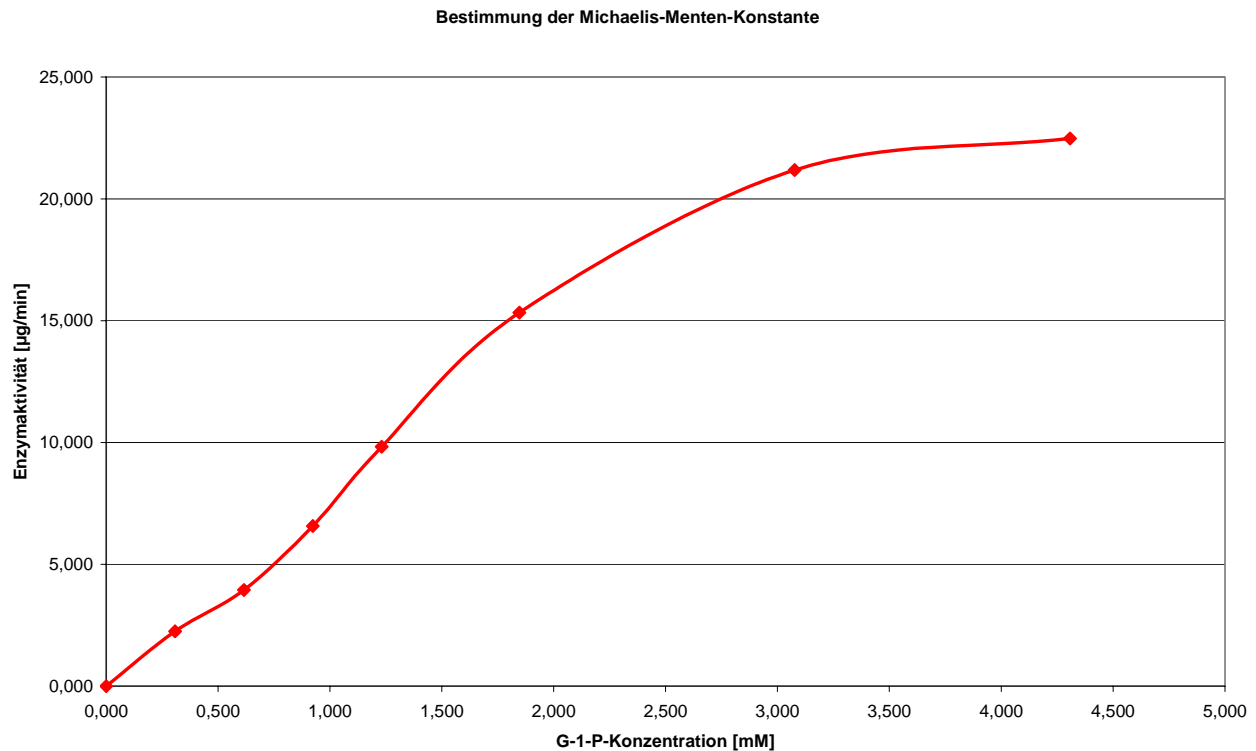
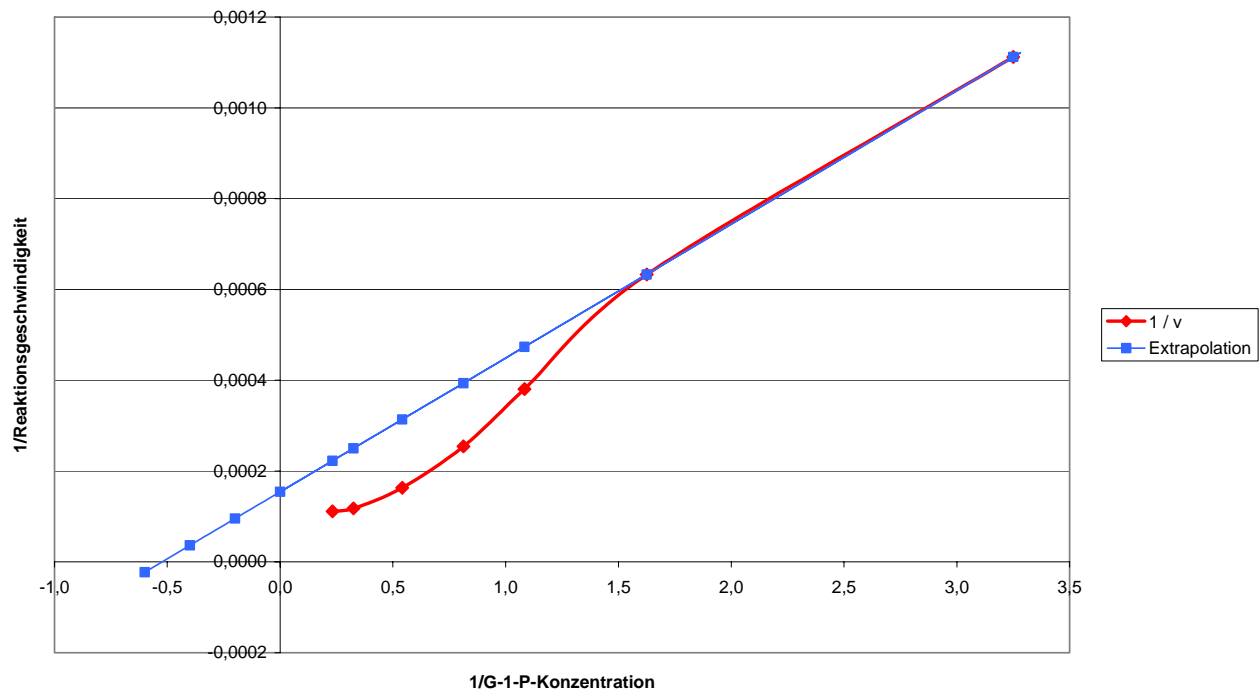


Diagramm 5: grafische Darstellung der Daten der K_M -Wert-Bestimmung von Gruppe D10

Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit nach Lineweaver-Burk

Diagramm 5a: grafische Darstellung der Daten der K_M -Wert-Bestimmung von Gruppe D10 nach Lineweaver-Burk

Um die Achsenabschnitte und damit den K_M - und v_{\max} -Wert in Diagramm 5a zu bestimmen, wurden die letzten beiden Datenpunkte im Diagramm verlängert und aus den Schnittpunkten dieser Gerade die Werte abgelesen.

Der aus Diagramm 5a ermittelte Wert für v_{\max} liegt bei 6483,4 $\mu\text{g}/\text{min}$, der K_M -Wert liegt bei 0,53 mM.

Der im Praktikum genannte Erwartungswert für K_M von 0,7 – 1,2 mM wurde von Gruppe 10 im Versuch nicht erreicht.

Anhang:

Originalmitschrift der Photometermesswerte