



Enzymkinetik: Kinetik der alkalischen Phosphatase mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat

(letzte Änderung 03.11.2015, A. Bauer)

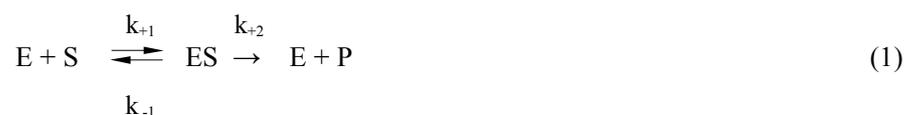
1 Motivation

Die Reaktion von Enzymen mit Substraten verläuft abhängig von den Konzentrationen mit einem charakteristischen Zeitverlauf, der erstmals von Michaelis und Menten beschrieben wurde. Im Versuch wird der Reaktionsverlauf der alkalischen Phosphatase (AP) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat spektroskopisch untersucht. Sie bestimmen zunächst den Extinktionskoeffizienten des Reaktionsproduktes und danach die Michaelis-Menten-Konstante der AP für p-Nitrophenylphosphat, die spezifische Aktivität und die Wechselzahl des Enzyms sowie die Inhibitor-konstante von Phosphat.

2 Grundlagen

2.1 Enzymkinetik

Die 1913 von L. Michaelis und M.L. Menten entwickelte Theorie der Enzymkinetik nimmt an, dass ein Enzym E zunächst mit dem Substrat S einen Komplex bildet, der in einem zweiten Schritt zerfällt, wobei freies Enzym und das Produkt P gebildet werden. Die Rückreaktion $E+P \rightarrow ES$ ist zu Reaktionsbeginn wegen $P \approx 0$ vernachlässigbar und kann deshalb unberücksichtigt bleiben.



Für die interessierende Geschwindigkeit v der Gesamtreaktion, d.h. die Geschwindigkeit der Bildung von P, gilt:

$$v = k_{+2} \cdot [ES] \quad (2)$$

Wie groß ist [ES]? Befindet sich das Reaktionssystem im stationären Zustand (*steady state*), bleiben also [E] und [ES] konstant, müssen Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes gleich sein:

$$k_{+1} \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_{+2} \cdot [ES] \quad (3)$$

Wenn wir $[E] = [E_t] - [ES]$ setzen, wobei $[E_t]$ die Gesamtkonzentration des Enzyms ist, folgt aus (3):

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} \quad (4)$$

Gleichung (4) eingesetzt in (2) ergibt dann:

$$v = \frac{k_{+2}[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} \quad (5)$$

Es wird nun zusammengefasst: $v_{\max} = k_{+2}[E_t]$. Darum wird k_{+2} oft auch als k_{cat} bezeichnet. Zusätzlich wird noch die sogenannte Michaelis-Menten-Konstante K_m definiert:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (6)$$

Damit ergibt sich aus (5) die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

K_m ist eine enzyspezifische Größe mit der Einheit einer Konzentration. Wenn $[S] = K_m$ ist, folgt durch Einsetzen in (7) $v = 1/2 v_{\max}$. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m ist also gleich derjenigen Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Oft wird die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion durch k_{+2} limitiert, d.h. $k_{+2} \ll k_{-1}$, der ES-Komplex zerfällt also bevorzugt in die Ausgangsstoffe, statt Produkt zu bilden. Unter diesen Bedingungen entspricht der K_m -Wert der Gleichgewichtskonstanten $K_s = [E][S]/[ES] = k_{-1}/k_{+1}$ des Enzym-Substrat-Komplexes.

2.2 Reaktionshemmung

Die reversible Hemmung von Enzymen spielt eine wichtige Rolle bei der Stoffwechselregulation. Bei der *kompetitiven* Hemmung ist der Hemmstoff (Inhibitor) dem Substrat im allgemeinen strukturell ähnlich und konkurriert mit diesem um die Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms.



Analog zur Michaelis-Menten-Ableitung kann man eine Inhibitorkonstante K_I als Gleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes definieren:

$$K_I = [E][I]/[EI] \quad (9)$$

Berücksichtigt man diese Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes bei der Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung, so ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart eines Inhibitors:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (10)$$

bzw. in der doppelt-reziproken Lineweaver-Burk-Darstellung:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}[S]} + \frac{K_m}{K_I v_{\max}[S]} \cdot [I] = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} \quad (11)$$

Während v_{\max} durch einen kompetitiven Inhibitor im Vergleich zu (7) nicht beeinflusst wird, vergrößert sich der scheinbare K_m -Wert des Enzyms um den Faktor $(1 + [I]/K_I)$, d.h. das Enzym wird erst bei einer höheren Substratkonzentration seine halbe Maximalgeschwindigkeit erreichen. Für konstante $[S]$ hängt $1/v$ linear von $[I]$ ab, was sich für die einfache Bestimmung ausnutzen lässt.

2.3 Definitionen und Einheiten (nach IUB)

2.3.1 Die molare Aktivität, Wechselzahl

Die molare Aktivität oder Wechselzahl A_m eines Enzyms gibt die Zahl der Substratmoleküle an, die pro Zeiteinheit von einem Enzymmolekül umgesetzt werden $A_m = \frac{\Delta n_S}{n_E \cdot t} = \frac{\Delta n_S / V}{n_E / V \cdot t} = \frac{\Delta [S]}{[E_T] \cdot t} = \frac{v}{[E_t]}$. Sie ist bei Substratsättigung identisch mit $k_{+2} = v_{\max} / [E_t]$.

2.3.2 Die spezifische Aktivität und die Internationale Einheit

Die spezifische Aktivität A_s gibt an, welche Stoffmenge an Substrat pro Zeiteinheit und Masse Enzym umgesetzt wird. Sie ergibt sich aus der Wechselzahl und der molaren Masse des Enzyms:

$$A_s = \frac{n_S}{m_E \cdot t} = \frac{n_E}{n_E} \cdot \frac{n_S}{m_E \cdot t} = \frac{n_S}{M_E \cdot n_E \cdot t} = \frac{A_m}{M_E}$$

Die spezifische Aktivität ist ein Maß für die Reinheit des Enzyms. Üblicherweise wird sie in U/mg angegeben und ist bei kommerziellen Produkten für jede Charge auf der Verpackung zu finden. Dabei ist U die *Internationale Einheit* (U = Unit) der katalytischen Aktivität, definiert als die Menge an Enzym, die in einem optimierten Milieu und bei Substratsättigung die Umwandlung von 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Substrat katalysiert.

2.4 Abkürzungen

NPP	p-Nitrophenylphosphat
NP	p-Nitrophenol
AP	Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure

2.5 Prinzip der Messung

Die alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern. Durch Versuche mit ^{32}P konnte gezeigt werden [2], dass in dem folgenden Sequenzabschnitt der AP die Aminosäure Serin für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (aktives Zentrum).

-Thr-Gly-Lys-Pro-Asp-Tyr-Val-Thr-Asp-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-

Die deprotonierte Hydroxylgruppe des Serins greift nukleophil am Phosphoratom des Substrates an, der Alkohol des Substrates wird dabei abgespalten. Das phosphorylierte Serin des Enzyms wird im zweiten Schritt hydrolytisch gespalten und Phosphat ins Medium entlassen.

Hier befindet sich auch der Angriffspunkt für Inhibitoren, so z.B. für K_2HPO_4 bei der AP [3] oder für Alkylphosphate (E 605) bei der Acetylcholinesterase.



Die enzymatische Produktion von NP kann direkt aus der zeitlichen Zunahme der Extinktion E bei 410 nm im Spektralphotometer bestimmt werden. $\Delta E/\Delta t$ ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit v (min^{-1}). Da sowohl das Absorptionsmaximum des NP als auch das pH-Optimum der AP im Alkalischen erreicht wird, werden alle Versuche in 0,5 mol/l CHES-Puffer ($\text{pK}_a=9,55$) durchgeführt. Das Vorhandensein von freiem NP in der NPP-Substratlösung, hat auf die photometrische Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit v keinen Einfluss. Die AP (Sigma) wurde aus Kälberdarm isoliert und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 100000 [4].

3 Quellen und Literatur

- A.L. Lehninger, Biochemie, Verlag Chemie (1987) 147-174.

- T.W. Goodwin, Structure and activity of enzymes, Academic Press (1964)
- A. Garen, Biochim. Biophys. Acta, **38** (1960) 470-483
- Th.E. Barman, Enzyme Handbook, Springer-Verlag (1969)
- D. Voet, J.G. Voet, Biochemie, Verlag Chemie (1992), 309-347.

4 Vorbereitung auf den Versuch

1. Wie funktioniert ein UV-Vis-Spektrophotometer?
2. Was besagt das Lambert-Beer'sche Gesetz?
3. Wie hängen Aktivierungsenthalpie und Reaktionsgeschwindigkeit zusammen, und wie funktionieren Katalysatoren?
4. Leiten Sie Gl. (4) aus Gl. (3) her!
5. Was für einen Kurvenverlauf erwarten Sie für die Abhängigkeit der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration S ?
6. Wo können Sie in dieser Kurve die Michaeliskonstante K_m ablesen?
7. Warum ist die Maximalgeschwindigkeit $v_{\max} = k_{+2}[E_t]$?
8. Wie sehen die Strukturformeln von Substrat und Produkt der hier untersuchten Reaktion aus? Skizzieren Sie den Reaktionsmechanismus!
9. Welche Farbe hat das Produkt vermutlich, wenn es nur Licht mit Wellenlängen um 410 nm absorbiert?
10. Wie erklären Sie sich, dass Phosphat ein Inhibitor für die alkalische Phosphatase ist?
11. In einem Experiment erhalten Sie nach dem Fit der Messwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung ein v_{\max} von 0,3 mM/s. Die Konzentration des Enzyms beträgt im Messansatz 1,8 $\mu\text{g/ml}$, seine molare Masse ist 36000 g/mol. Berechnen Sie die Wechselzahl und die spezifische Aktivität!
12. Wie groß ist der apparente K_m -Wert, wenn $[I] = K_I$ ist?

5 Versuchsdurchführung und Auswertung

Richten Sie sich bei der Herstellung der benötigten Lösungen nach dem beiliegenden Pipettier- und Verdünnungsschema.

5.1 Lambert-Beersches Gesetz

Die Anwendbarkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes soll für NP (in 0,5 mol/l CHES) im Konzentrationsbereich 5-50 μM überprüft und der molare Extinktionskoeffizient angegeben werden.

5.2 Bestimmung von K_m und v_{\max}

Mischen Sie die Substratlösung mit dem Enzym gründlich: decken Sie dazu die Küvette mit Parafilm ab und invertieren Sie sie mehrfach. Stellen Sie den Messansatz ins Spektrometer und registrieren Sie die Extinktion über 5 Minuten.

Bestimmen Sie für mindestens 7 verschiedene NPP-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit v (jeweils doppelt) und ermitteln Sie aus dem Fit der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung oder durch Auftragung nach Lineweaver-Burk (8) K_m und v_{\max} der alkalischen Phosphatase.

5.3 Bestimmung der Aktivitäten

Berechnen Sie aus v_{\max} die spezifische und die molare Aktivität des Enzyms. Sie benötigen dazu die Konzentration des Enzyms *im Messansatz*.

5.4 Bestimmung von K_I

Mit Gleichung (10) soll die Inhibitorkonstante K_I ermittelt werden. Messen Sie dazu v bei fünf verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors K_2HPO_4 bei konstantem $[S] = 2.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Verwenden Sie für die Berechnung Ihre selbst bestimmten Werte für v_{max} und K_m .

6 Praktische Hinweise, Verdünnungen und Pipettierschema

6.1 Allgemeines

Photometer einschalten (Front, links unten), Enzymkinetik-Messprogramm: Hauptmenue -> Methodenspeicher -> Methode einlesen -> Nr.20

Pipettenspitzen: 1-10 μ l farblos, 10-200 μ l gelb, 200-1000 μ l blau

Die Bestandteile der Messlösungen (außer AP-Enzymlösung) direkt in die Küvetten pipettieren und durch invertieren mischen (Parafilm zum Zuhalten verwenden).

Bei der eigentlichen Enzymkinetik AP-Lösung kurz vor der Messung direkt in die Messlösung in der Küvette pipettieren, durch invertieren mischen (Parafilm verwenden) und zügig in das Spektrometer stellen, direkt „Start“ drücken.

6.2 AP (alkalische Phosphatase)

5 μ l kommerzielle AP-Suspension + 990 μ l 500 mM CHES, pH 9,5

+ 5 μ l 0,3 mM $MgCl_2$ / 30 μ M $ZnCl_2$

= 1:200 Verdünnung der kommerziellen Enzympräparation

Notieren Sie sich die Konzentration der kommerziellen Enzympräparation und die auf dem Etikett angegebene spezifische Aktivität! Sie benötigen die Enzymkonzentration im Messansatz für Ihre eigenen Berechnungen der Aktivitäten und Wechselzahlen.

6.3 NP (p-Nitrophenol)

20 mM Stammlösung wird bereitgestellt

NP-Verdünnung auf 2 mM in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß: 900 μ l CHES + 100 μ l 20 mM NP

Messung im Enzymkinetikprogramm (Nr.20, abgespeichert), Null-Abgleich am Photometer bei 410 nm gegen Luft

Küvette in den Halter stellen, Deckel schließen, *nicht* START drücken, Absorption rechts oben am Display ablesen und aufschreiben

Mess-Lösungen:

0 μ M = 0 μ l 2 mM NP + 1000 μ l 500 mM CHES

5 μ M = 2,5 μ l 2 mM NP + 998 μ l 500 mM CHES

10 μ M = 5,0 μ l 2 mM NP + 995 μ l 500 mM CHES

20 μ M = 10,0 μ l 2 mM NP + 990 μ l 500 mM CHES

30 μ M = 15,0 μ l 2 mM NP + 985 μ l 500 mM CHES

50 μ M = 25,0 μ l 2 mM NP + 975 μ l 500 mM CHES

6.4 NPP (p-Nitrophenylphosphat)

10 mM Stammlösung: 25 mg NPP auf der Analysenwaage einwiegen, in ein 15 ml-Schraubdeckelröhrchen geben, lösen in 6.75 ml 500 mM CHES, pH 9,5

Messung im Enzymkinetikprogramm

Mess-Lösungen: jeweils 1 ml Mischung der NPP-Stammlösung mit Puffer zur passenden Endkonzentration

25 μM = 2,5 μl 10 mM NPP + 997,5 μl 500 mM CHES

50 μM = 5,0 μl 10 mM NPP + 995 μl 500 mM CHES

100 μM = 10 μl 10 mM NPP + 990 μl 500 mM CHES

500 μM = 50 μl 10 mM NPP + 950 μl 500 mM CHES

1 mM = 100 μl 10 mM NPP + 900 μl 500 mM CHES

2,5 mM = 250 μl 10 mM NPP + 750 μl 500 mM CHES

5 mM = 500 μl 10 mM NPP + 500 μl 500 mM CHES

dazu für die Messung 2 μl AP (Jeder Messansatz einzeln & erst kurz vor der Messung. Gut mischen!)

am Photometer „Start“ drücken. Aufnahme für eine Minute.

Nachberechnung: 7 (Rechnen) => 1 (Nachberechnung) => 1 (Start Berechnung) => Messdaten werden auf einen Zettel vom Photometer ausgedruckt.

Rechenparameter: Start 5, Zeit 35, Intervall 6

Für jeden Konzentrationswert Doppelbestimmung!

6.5 Messung mit Inhibitor

NPP (p-Nitrophenylphosphat) im Messansatz: 2,5 mM

dazu NPP-Stammlösung: 3,13 mM (3,12 ml 10 mM NPP + 6,88 ml 500 mM CHES), wird für den Messansatz in der Küvette auf 2,5 mM verdünnt.

K_2HPO_4 als Inhibitor, Stammlösung : 100 mM K_2HPO_4 in 0,5 M CHES

Messung im Enzymkinetikprogramm (Nr.20, abgespeichert)

Mess-Lösungen mit variabler Inhibitorkonzentration

1 mM = 10 μl Inhibitor + 800 μl 3,13 mM NPP + 190 μl CHES

2,5 mM = 25 μl Inhibitor + 800 μl 3,13 mM NPP + 175 μl CHES

5 mM = 50 μl Inhibitor + 800 μl 3,13 mM NPP + 150 μl CHES

10 mM = 100 μl Inhibitor + 800 μl 3,13 mM NPP + 100 μl CHES

20 mM = 200 μl Inhibitor + 800 μl 3,13 mM NPP + 0 μl CHES

jeweils + 2 μl AP (Jeder Messansatz einzeln & erst kurz vor der Messung. Gut mischen!)

am Photometer „Start“ drücken. Aufnahme für eine Minute.

Nachberechnung: 7 (Rechnen) => 1 (Nachberechnung) => 1 (Start Berechnung) => Messdaten werden auf einen Zettel vom Photometer ausgedruckt.

Rechenparameter: Start 5, Zeit 35, Intervall 6

Für jeden Konzentrationswert Doppelbestimmung!