

Enzymkinetische Methoden

Mehrsubstratreaktionen pH-Abhängigkeit



Modul Enzymkinetik:

Leitung: Prof. Hans Bisswanger

Betreuung: Miriam Dzubinova

Versuchsprotokoll:

Paula Quecke

Stefan Mogk

1 Index

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Index.....	2
1.1	Inhaltsverzeichnis.....	2
1.2	Abbildungsverzeichnis.....	2
2	Einleitung.....	3
3	Material und Methoden.....	3
3.1	Chemikalien und Instrumente.....	3
3.2	Alkoholdehydrogenase.....	4
3.3	Reaktionskinetik.....	5
3.4	pH-Abhängigkeit von Enzymaktivitäten.....	8
4	Experimenteller Teil.....	9
4.1	Kinetik der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion.....	9
4.2	pH-Optimum der ADH.....	14
5	Zusammenfassung und Diskussion.....	15
6	Literatur.....	16

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	ADH, Struktur.....	4
Abbildung 2:	Theoretische Auswertung, Diagramme.....	7
Abbildung 3:	Aktives Zentrum von ADH.....	8
Abbildung 4:	Auftragung nach Eadie-Hofstee.....	12
Abbildung 5:	Auftragung nach Lineweaver-Burk.....	12
Abbildung 6:	Auftragung nach Hanes.....	13
Abbildung 7:	pH-Optimumskurve.....	15

2 Einleitung

Ziel des Versuches war es, den Bisubstratmechanismus der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion zu ermitteln, sowie die zugehörigen Konstanten (Michaeliskonstante und Produkthemmkonstante für beide Substrate, Maximalgeschwindigkeit) zu bestimmen.

Ferner galt es eine pH-Optimumskurve aufzunehmen, um die pK-Werte der am Katalysemechanismus beteiligten funktionellen Gruppen festzustellen.

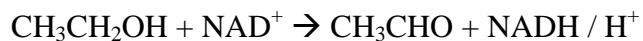
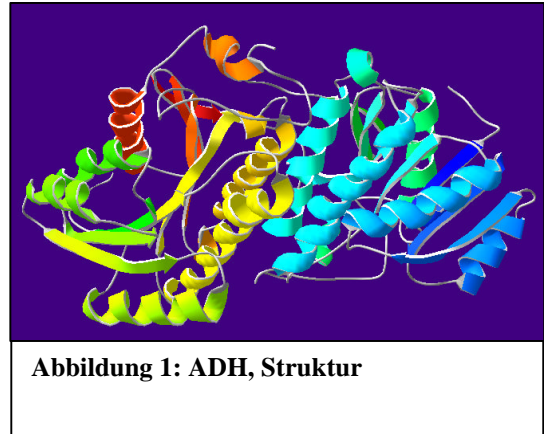
3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Instrumente

Photometer	-	Gilford Response bei 340 nm
GN Puffer	-	75 mM Glycin 75 mM Natriumpyrophosphat pH 9,0
TS Puffer	-	Teorell-Stenhagen-Puffer verschiedener pH (3-12)
ADH	-	6 µg / ml Alkoholdehydrogenase aus Hefe, 1 mg / ml Rinderserumalbumin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
EtOH	-	Ethanol
NAD	-	100 mM Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
DTT	-	100 mM 1,4-Dithio-DL-threitol
Semicarbazid	-	2,2 M N-Aminoharnstoff pH 6,4

3.2 Alkoholdehydrogenase

Die Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1 / CAS 9031-72-5) dient im Menschen und in vielen Tieren dem Abbau von toxischen Alkoholen. Das in Magen und Leber vorhandene Enzym katalysiert hauptsächlich die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd unter Beteiligung des Cofaktors Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid:



Im Menschen koexistieren mindestens sechs geringfügig unterschiedliche Alkoholdehydrogenasen. Alle sind Dimere aus zwei Polypeptidketten, wobei jede Untereinheit zwei Zinkionen Zn^{2+} enthält. Eines dieser Ionen ist essentiell für die Funktion des Enzyms: es ist am aktiven Zentrum lokalisiert und stabilisiert die Hydroxylgruppe des Alkohols.

Alkoholdehydrogenase ist verantwortlich für die Toxizität von anderen Alkoholen: zum Beispiel oxidiert sie Methanol zu dem wesentlich giftigeren Produkt Formaldehyd, und Ethylenglykol zu Glykol- und Oxalsäure. Die konventionelle Behandlung dieser Art von Vergiftungen besteht in der Medikation mit Ethanol, das als Substrat bevorzugt umgesetzt wird. Ausserdem existiert mit Fomepizole (4-Methylpyrazol) die Möglichkeit ADH kompetitiv zu hemmen. Ein weiterer Inhibitor ist 2-Flour-Ethanol.

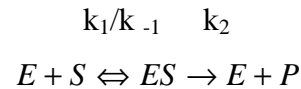
In Hefen und vielen Bakterien spielt die Alkoholdehydrogenase eine wichtige Rolle in der Fermentation: Pyruvat aus der Glykolyse wird in Acetaldehyd und Kohlendioxid umgewandelt, und dann von der ADH zu Ethanol oxidiert. Auf diese Weise wird für die Glykolyse benötigtes NAD^+ regeneriert. ADH aus Hefe ist grösser als die menschliche und besteht aus vier Untereinheiten.

In Insekten wie der Fruchtfliege kommt eine der menschlichen nicht verwandte Alkoholdehydrogenase vor, die an kein Metallion gebunden ist.

Eine dritte Klasse der Alkoholdehydrogenasen enthält Eisen als Zentralion. Sie existieren in Bakterien, und eine (scheinbar inaktive) Form wurde in Hefe gefunden.

3.3 Reaktionskinetik

Die Kinetik einer enzymkatalysierten Einsubstratreaktion der einfachsten Form :



wird durch Michaelis-Menten ausgehend von folgenden Randbedingungen beschrieben:

- k_2 ist geschwindigkeitsbestimmender (d.h. langsamster) Schritt
- $e = e(0) - es$ (1)

- Nach einer Anlaufzeit ist die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes quasi-stationär (Bodenstein-Hypothese). Im „steady state“ Bereich gilt: $des / dt = 0$ (2)

- Zu Beginn der Reaktion gilt: $v(0) = \frac{dp}{dt} = k_2 \cdot es$ (3)

Es ist:
$$\frac{des}{dt} = k_1 \cdot s \cdot e - k_{-1} \cdot es - k_2 \cdot es$$
 (4)

1 in 4:
$$\frac{des}{dt} = k_1 \cdot s \cdot (e(0) - es) - k_{-1} \cdot es - k_2 \cdot es$$
 (5)

2 in 5:
$$0 = k_1 \cdot s \cdot e - k_{-1} \cdot es - k_2 \cdot es$$
 (6)

$$es = \frac{k_1 \cdot s \cdot e(0)}{k_1 \cdot s + k_{-1} + k_2} = \frac{s \cdot e(0)}{s + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$
 (7)

$$es = \frac{s \cdot e(0)}{s + K_M} \quad \text{mit :} \quad K_M := \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$
 (8)

3 in 8:
$$v(0) = k_2 \cdot \frac{s \cdot e(0)}{s + K_M}$$
 (9)

Gleichung (9) wird maximal für $K_M \ll s$:

$$v(0)_{Max} = k_2 \cdot e(0)$$
 (10)

9 in 10:
$$v(0) = \frac{v(0)_{Max} \cdot s}{K_M + s}$$
 (11)

Für enzymkatalysierte Bisubstratreaktionen gelten deutlich komplexere Zusammenhänge. Prinzipiell lassen sich die Reaktionsmechanismen in *sequenzielle Mechanismen* (*random*: Reihenfolge der bindenen Substrate egal, z.B. Kinasen, Phosphorylase B / *ordered*: bestimmte Reihenfolge der Bindung, z.B. ADH) und Ping-Pong-Mechanismen (1. Substratbindung, Gruppenübertragung auf Enzym, 2. Substratbindung, erneute Gruppenübertragung, z.B. Aminotransferasen) unterscheiden.

Gegenüber einem reversiblen Einsubstratmechanismus mit jeweils zwei Maximalgeschwindigkeiten (Hin- und Rückreaktion) und zwei Michaelis-Konstanten (für Substrat und Produkt) ergeben sich für Bisubstratreaktionen¹ eine Vielzahl neuer Konstanten: Jedes Substrat und jedes Produkt verfügt über seine eigene Michaelis-Konstante für die Wechselwirkung mit dem zentralen Komplex. Weiterhin besitzt jeder dieser Liganden eine zusätzliche Konstante für seine Bindung an das freie Enzym unter Bildung der nicht katalytisch aktiven Übergangskomplexe. Es handelt sich um Bindungskonstanten, die als Hemmkonstanten bezeichnet werden, da sie in der Rückreaktion mit den Konstanten für die Produkthemmung identisch sind. Für die Bestimmung von Anfangsgeschwindigkeiten in der Hinreaktion ($[P]=[Q]=0$) erhält man für einen random-bi-bi-Mechanismus :

$$v = \frac{V_i [A][B]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (12)$$

Bei Konstanterhaltung eines der beiden Substrate wird also auch hier prinzipiell die ursprüngliche Form der Michaelis-Menten-Gleichung mit hyperboler Abhängigkeit erhalten.

Für die Untersuchung des *ordered*-Mechanismus der Alkohol-Dehydrogenase mit unterschiedlichen Ethanol und NAD-Konzentrationen können folgende theoretische linearisierte Diagramme erhalten werden:

¹ Bisswanger, Hans: Enzymkinetik. Theorie und Methoden. (Wiley-VCH), 113-23, insbes. Abb. 2.28, Tab. 2.2

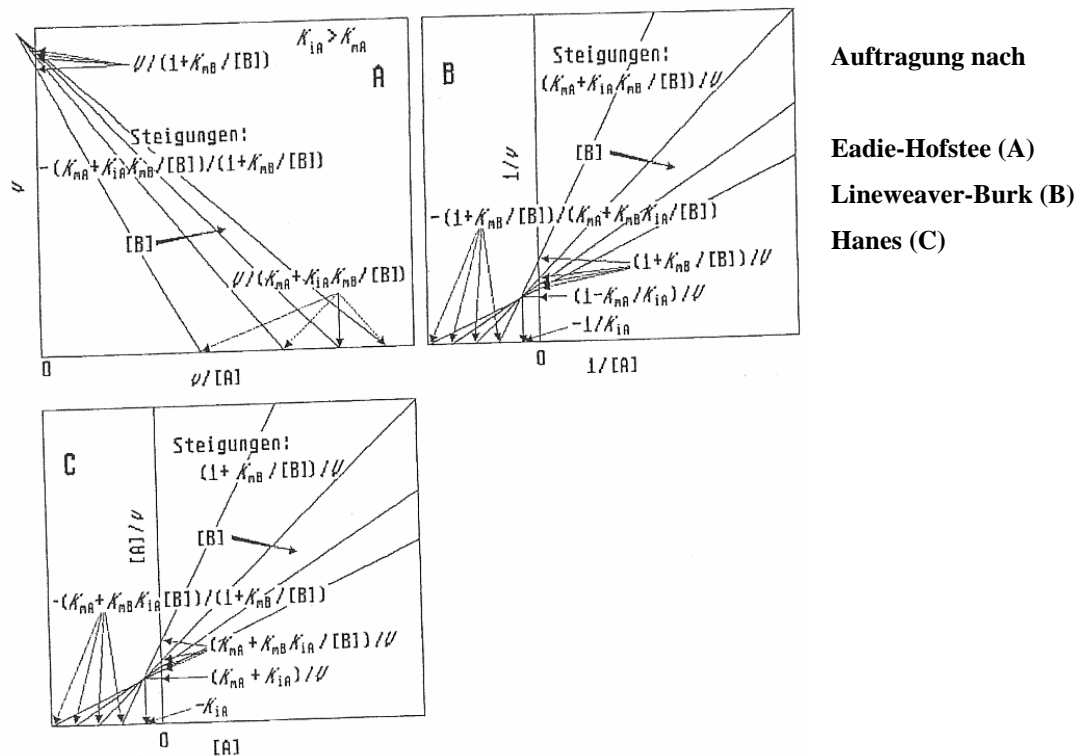


Abbildung 2: Theoretische Auswertung, Diagramme

Alle Konstanten lassen sich dann über die Auftragung in Sekundärdiagrammen wie folgt ermitteln:

Primärdiagramm		Sekundärdiagramm		Schnittpunkt mit	
Y	X	Y	X	Ordinate	Abszisse
$1/v$	$1/[A]$	St_A	$1/[B]$	K_{MA}/V	$-K_{MA} / K_{iA} K_{MB}$
		Or_A	$1/[B]$	$1/V$	$-1 / K_{MB}$

Die photospektrometrische Messung beruht auf der Absorption von NADH bei 340 nm. Mit Hilfe der Gleichung nach Lambert-Beer lassen sich die Konzentrationen ohne Kalibriermessung errechnen:

$$\text{Extinktion} \quad E = \epsilon * c * d \quad [] \quad (13)$$

ϵ : Extinktionskoeffizient NAD $6,22 * 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mol}$

c : Konzentration

d : Schichtdicke

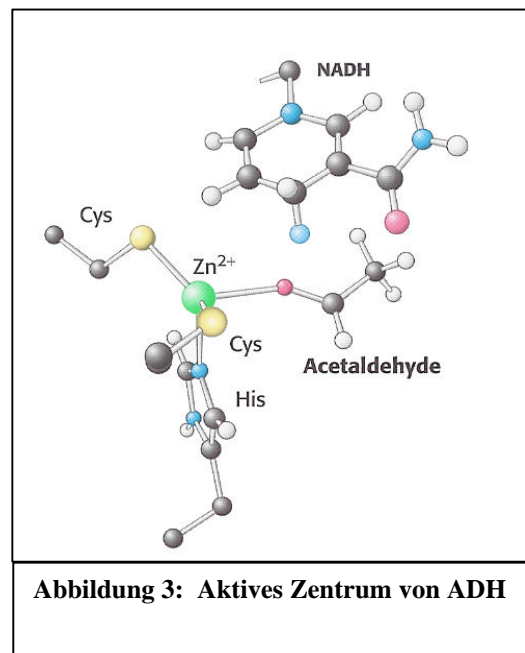
3.4 pH-Abhängigkeit von Enzymaktivitäten

Ein Enzym unterliegt bezüglich seiner Konformation und Aktivität einer Abhängigkeit von Randbedingungen wie pH-Wert und Temperatur. Die höchste Enzymaktivität liegt nahezu bei allen Proteinen im pH-Bereich des natürlichen (physiologischen) Vorkommensorts. Leichte Abweichungen vom pH-Optimum führen dazu, dass funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum protoniert oder deprotoniert werden und damit nicht mehr in der gewohnten Weise mit dem Substrat interagieren können. Wird der pH-Wert korrigiert, so ist der Vorgang vollständig reversibel.

Extreme pH-Änderungen führen hingegen zur Zerstörung der räumlichen Struktur des Proteins durch Änderungen im Faltungsmuster oder durch Hydrolyse von stabilisierenden Disulfidbrücken. Diese Vorgänge, die ausserhalb des sogenannten pH-Stabilitätsbereiches auftreten, sind irreversibel².

Das aktive Zentrum der Alkoholdehydrogenase enthält ein Zinkion, das an zwei Cystein-Reste und einen Histidin-Rest gebunden ist. Das Zinkion bindet Ethanol bzw. Acetaldehyd während ein Hydridion (hellblau) auf NAD übertragen wird.

Die pH-Optimums-(Glocken)-Kurve spiegelt teilweise die Ionisierung essentieller, direkt am katalytischen Mechanismus beteiligter Gruppen wider. In diesem Fall lassen sich aus den Wendepunkten der Optimumskurve die pK-Werte der betreffenden Gruppen bestimmen. Entspricht der pH Wert dem pK-Wert, so liegen nach Hendersen-Hasselbalch Säure und ihre konjugierte Base im Verhältnis 1:1 vor. Mit anderen Worten heisst das, nur noch die Hälfte der essentiellen funktionellen Gruppen liegen in der richtigen Form vor. Die Aktivität ist nur noch halb so hoch wie am pH-Optimum.



² Tatsächlich stimmt dies nur teilweise. Christian Anfinsen zeigte 1957 wie denaturierte Ribonuclease A spontan renaturieren kann. (J.Biol.Chem. 1961 May; 236: 1361-3)

4 Experimenteller Teil

4.1 Kinetik der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion

Für den Versuch sollten 11 Ethanol-Konzentrationen und 5 NAD-Konzentrationen unterschiedlich miteinander kombiniert werden. Um den Ablauf zu beschleunigen wurden zuerst aufwändige Verdünnungsreihen hergestellt.

Die Messung selbst erfolgte nach einem einheitlichen Pipettierschema:

- 880 μ l GN Puffer
- 30 μ l vorverdünntes EtOH
- 20 μ l vorverdünntes NAD
- 20 μ l DTT
- 30 μ l Semicarbazid
- 20 μ l ADH

Die anschließende Messung im Spektrometer lieferte automatisch errechnete Änderungsgeschwindigkeiten der Extinktion bei 340 nm.

Die Vorverdünnungen wurden so gewählt, dass die Endkonzentrationen in der Küvette einem vielfachen der geschätzten K_M -Werte der Substrate entsprechen. Tabelle 1 stellt das Verdünnungsschema zusammen. Zum besseren Verständnis soll das Vorgehen exemplarisch an der Verdünnung „EtOH 0,1“ erläutert werden:

Ausgehend von der EtOH – Stammlösung (rein, d.h. 17 M) wurde eine 1:100 Verdünnung angesetzt (\rightarrow *eingesetzte Verdünnung*). Von dieser wurden 35,3 μ l mit 144,7 μ l Wasser verdünnt, was ein Volumen von 180 μ l ergibt. Die \rightarrow *Konzentration* dieser Vorverdünnung betrug 33,3 mM.

Wie im Pipettierschema angegeben kamen nun 30 μ l „EtOH 0,1“ zu einem Gesamtvolumen von 1 ml in die Küvette, was einer \rightarrow *Konzentration* von 1 mM und damit das 0,1-fache des geschätzten \rightarrow K_M -Wertes von Ethanol entspricht.

Tabelle 1: Verdünnungsschema

Eppendorf-Cup					Küvette		
Beschriftung Vorverdünnung					Messung (1 ml Gesamtvolumen)		
	Vol. EtOH [µl]	Vol. Wasser [µl]	eingesetzte Verdünnung 1/x-fach	Konzentration *) [mol/l]	eingesetztes Volumen [µl]	Konzentration **) [mol/l]	K _M - Wert ***) x-fach
EtOH 0,1	35,3	144,7	100	3,33E-02	30	1,00E-03	0,10
EtOH 0,2	70,6	109,4	100	6,67E-02	30	2,00E-03	0,20
EtOH 0,4	141,2	38,8	100	1,33E-01	30	4,00E-03	0,40
EtOH 0,6	21	159	10	1,98E-01	30	5,95E-03	0,60
EtOH 0,8	28,2	151,8	10	2,66E-01	30	7,99E-03	0,80
EtOH 1	35,2	144,8	10	3,32E-01	30	9,97E-03	1,00
EtOH 2	70,6	109,4	10	6,67E-01	30	2,00E-02	2,00
EtOH 5	176,4	3,6	10	1,67E+00	30	5,00E-02	5,00
EtOH 7	24,7	155,3	1	2,33E+00	30	7,00E-02	7,00
EtOH 10	35,3	144,7	1	3,33E+00	30	1,00E-01	10,00
EtOH konz	180	0	1	1,70E+01	30	5,10E-01	51,00
NAD 0,2	100	900	10	1,00E-03	20	2,00E-05	0,20
NAD 0,5	200	800	10	2,00E-03	20	4,00E-05	0,40
NAD 2	100	900	1	1,00E-02	20	2,00E-04	2,00
NAD 5	250	750	1	2,50E-02	20	5,00E-04	5,00
NAD konz	1000	0	1	1,00E-01	20	2,00E-03	20,00

*) EtOH: Konzentration der Vorverdünnung = V(EtOH) * (17 M / Faktor) / (180 µl)
NAD: Konzentration der Vorverdünnung = V(NAD) * (100 mM / Faktor) / (1000 µl)
**) Konzentration in Küvette = c(Vorverd.) * eingesetztes Volumen / 1000 µl
***) x = Konzentration in Küvette / K_M-Wert
Mit angenommenem K_M (Ethanol) = 10 mM, K_M (NAD) = 100 µM

Die gemessenen Extinktionsänderungsgeschwindigkeiten, bzw. Reaktionsgeschwindigkeiten ergaben unter verschiedensten Konzentrationen entweder keine Werte oberhalb des statistischen Hintergrundrauschens, oder wiesen keine erkennbare Abhängigkeit einer Michaelis-Menten-Kinetik auf. So zeigte sich beispielsweise bei konstanter Sättigung von Substrat A und Abnahme von Substrat B keine halbmaximale Geschwindigkeit im Bereich des K_M-Wertes und umgekehrt.

Unter diesen Bedingungen erschien es nicht sinnvoll alle Kombinationen zu messen. Statt dessen wurden vier unterschiedliche Chargen des Enzyms ADH aufgetaut, verdünnt und

getestet. Alle wiesen leichte Unterschiede in ihrer Aktivität auf, und schienen unter Substratsättigung zu funktionieren. Allerdings war es mit keiner Enzymprobe möglich, kinetische Zusammenhänge zu visualisieren.

Eine Auswahl der gemessenen Daten wird in Tabelle 2 dargestellt und in den folgenden Diagrammen ohne Auswertung aufgezeichnet.

Tabelle 2: Versuch Bisubstratkinetik

dE/dt	NAD				
[]	0,2 KM	0,5 KM	2 KM	5 KM	20 KM
EtOH					
0,1 KM					
0,2 KM					
0,4 KM					
0,6 KM					
0,8 KM				-0,0007	0,0040
1 KM				-0,0010	0,0044
2 KM				-0,0030	0,0118
5 KM		-0,0007	0,0090	0,0157	0,0350
7 KM		0,0001	0,0008	-0,0019	0,0061
10 KM		0,0009	0,0090	0,0004	0,0066
51 KM	-0,0015	0,0078	0,0312	0,0484	0,1314

A/dt	NAD				
[mU]	0,2 KM	0,5 KM	2 KM	5 KM	20 KM
EtOH					
0,1 KM					
0,2 KM					
0,4 KM					
0,6 KM					
0,8 KM				-0,11	0,64
1 KM				-0,16	0,71
2 KM				-0,48	1,90
5 KM		-0,11	1,45	2,52	5,63
7 KM		0,02	0,13	-0,31	0,98
10 KM		0,14	1,45	0,06	1,06
51 KM	-0,24	1,25	5,02	7,78	21,13

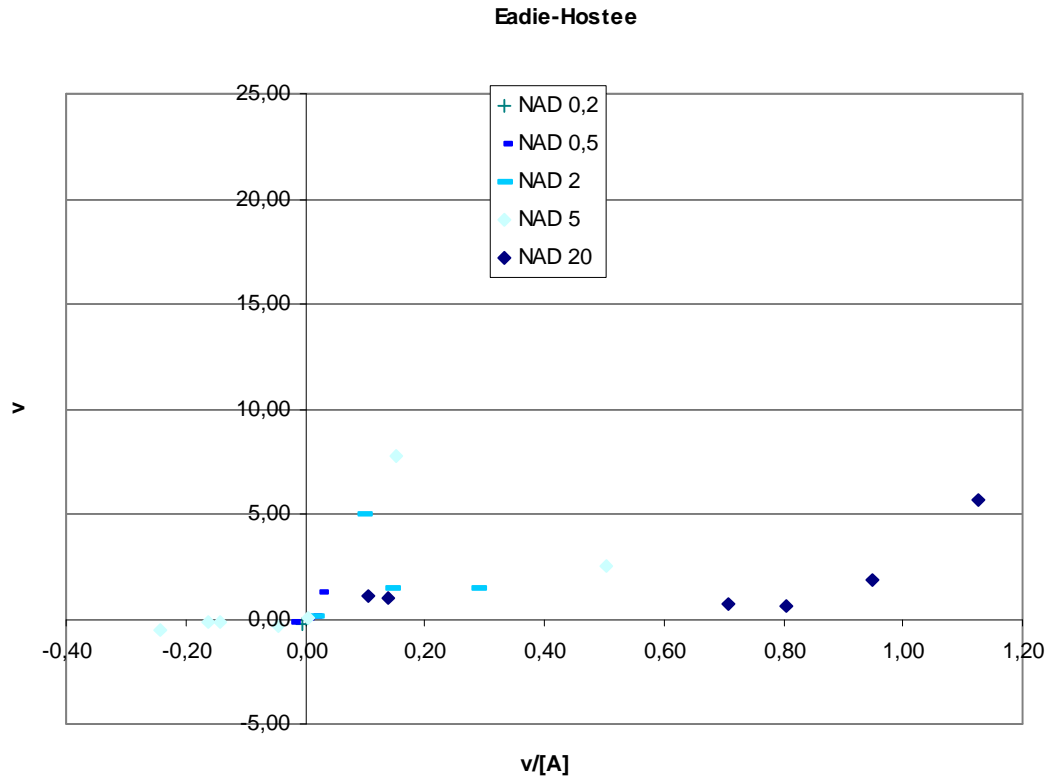


Abbildung 4: Auftragung nach Eadie-Hofstee

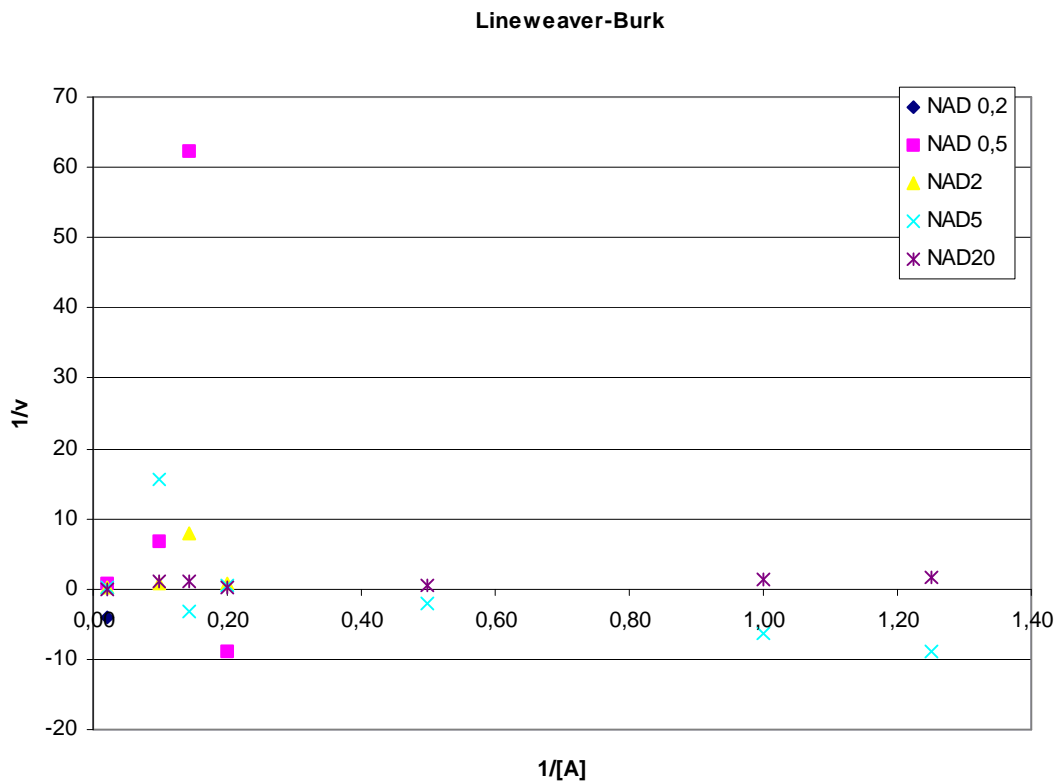


Abbildung 5: Auftragung nach Lineweaver-Burk

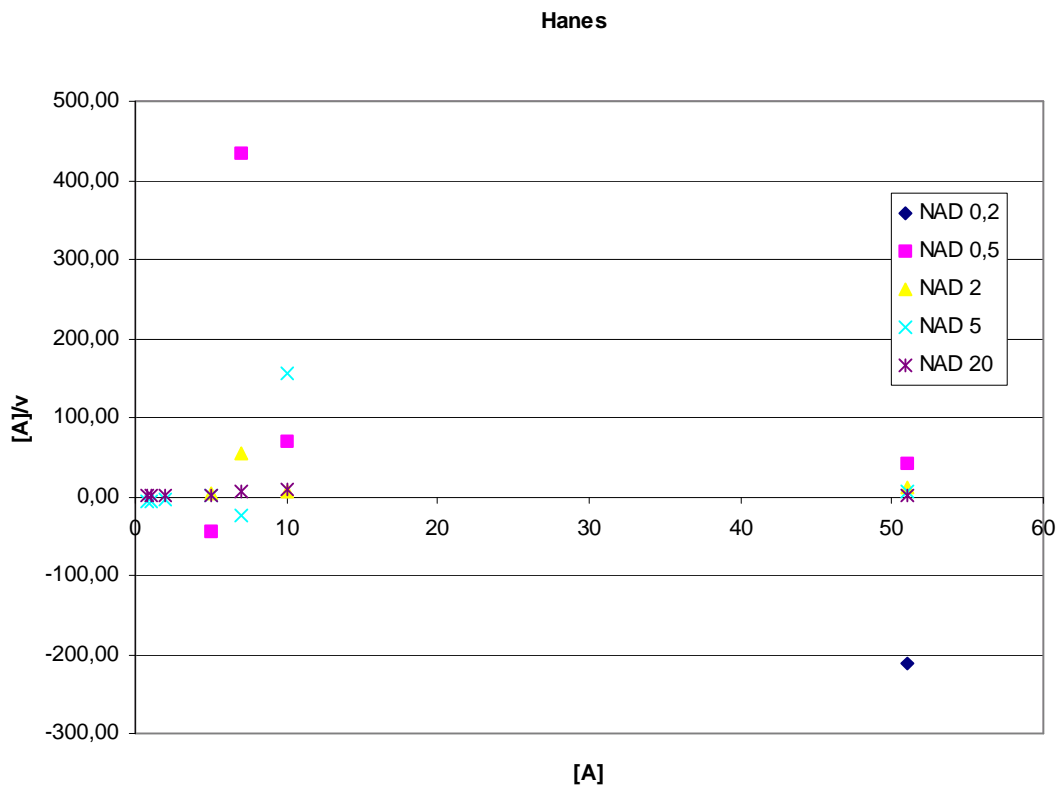


Abbildung 6: Auftragung nach Hanes

4.2 pH-Optimum der ADH

Es wurden Enzymtests unter Substratsättigung in TS Puffer von pH 3 bis pH 12 in Schritten von je 0,5 gefahren. Die Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit wurden unmittelbar gestartet und über einen Zeitraum von je 4 Minuten verfolgt. Die erhaltenen Werte sind elektronisch berechnete Änderungsgeschwindigkeiten der Extinktion bei 340 nm. Pro Messung wurden eingesetzt:

- 880 µl TS Puffer
- 30 µl EtOH konz.
- 20 µl NAD konz.
- 20 µl DTT
- 30 µl Semicarbazid
- 20 µl ADH

Es wurden folgende Messwerte erhalten:

Tabelle 3: pH-Optimumskurve

pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
dE/dt [1/min]	0,0251	0,0377	0,0409	0,0479	0,0267	0,0294	0,0320	0,0570
A [mU]	4,0484	6,0806	6,5968	7,7258	4,3065	4,7419	5,1613	9,1935
pH	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5
dE/dt [1/min]	0,0979	0,0912	0,0715	0,0636	0,0211	0,0000	0,0000	0,0000
A [mU]	15,79	14,71	11,532	10,258	3,4032	0	0	0
Aktivität in der Küvette: $A = (dE/dt) / (6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}) / (1 \text{ cm}) \cdot 1 \text{ ml}$								

Die pK-Werte der Aminosäuren im katalytischen Zentrum lassen sich anhand der Wendepunkte (die gleichzeitig die halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit repräsentieren) ablesen. Sie betragen ca. pH 6,4 und 8,6.

Damit liegen sie im Seitenketten-pK-Bereich der am Katalysemechanismus beteiligten Aminosäuren Cystein (Literatur: pK 8,4) und Histidin (Literatur: pK 6,5).

Ein zweites Maximum im sauren Milieu ist vermutlich als artifiziell einzustufen.

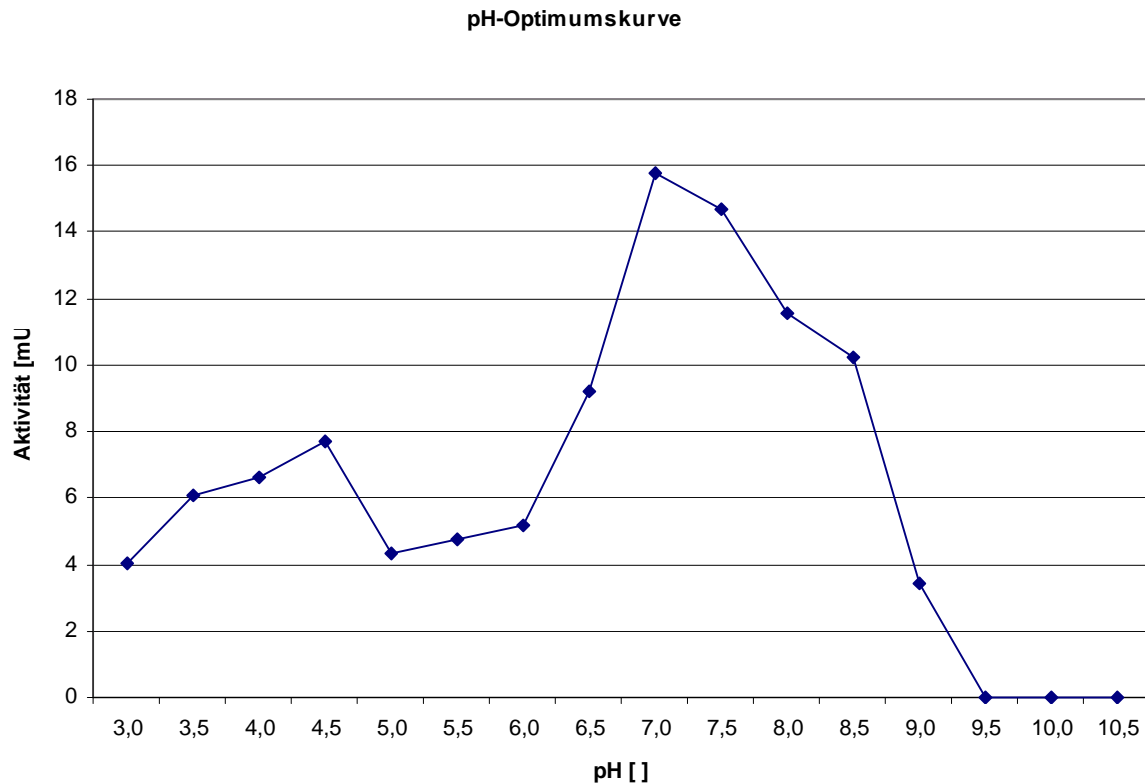


Abbildung 7: pH-Optimumskurve

5 Zusammenfassung und Diskussion

Der Versuchsteil zur Bisubstratkinetik lieferte keine Daten, die für eine Auswertung verwendet werden könnten. Mögliche Gründe hierfür sind systematische Fehler bei der Herstellung der Verdünnungen, mangelnde Aktivität der ADH, oder fehlerhafte Konfiguration des Spektrophotometers. Eine genaue Lokalisation des Fehlers konnte innerhalb der zur Verfügung stehenden Zeit nicht vorgenommen werden. Bemerkenswert ist, dass unterschiedliche Gruppen unabhängig voneinander dieselben Probleme hatten, so dass simple Anwendungs- oder Berechnungsfehler wahrscheinlich ausscheiden. Der Versuch zur Bisubstratkinetik mit Lactat-Dehydrogenase lieferte hingegen akzeptable Ergebnisse.

Die pH-Optimumskurve weist zwar eine starke statistische Fehlerstreuung auf, liefert aber pK-Werte, die sehr nahe bei den Literaturwerten liegen. Wiederholte Versuche zum Ausschluss relativer Fehler und ggf. enger gewählte pH-Abstände könnten die erhaltenen Ergebnisse verbessern oder validieren.

6 Literatur

- Bisswanger, Hans: Enzymkinetik. Theorie und Methoden. (Wiley-VCH)
Stryer, Tymoczko, Berg: Biochemistry (Freeman)
Voet, Voet, Pratt: Lehrbuch der Biochemie (Wiley-VCH)
Atkins et Beran: Chemie, einfach alles (VCH)