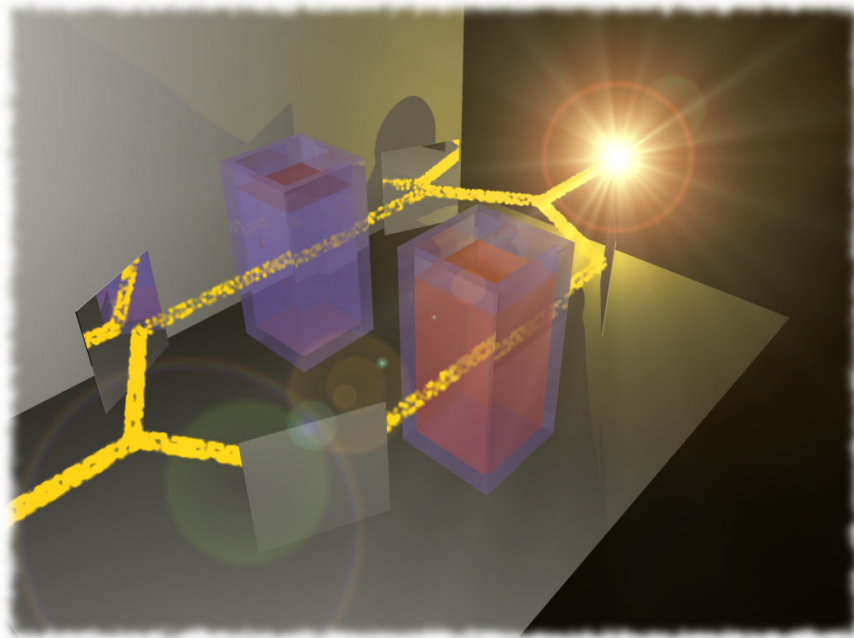


Methoden zur Untersuchung von Ligandenbindungen

Differenzspektrometrie



Modul Enzymkinetik:

Leitung: Prof. Hans Bisswanger

Betreuung: Elena Kracker

Versuchsprotokoll:

Paula Quecke

Stefan Mogk

Titelbild: Strahlengang im Differenzspektrophotometer

Die Darstellung zeigt schematisch die sehr schnell wechselnden Strahlengänge durch Referenz- und Probenküvette. Die Verwendung von nur einer Lichtquelle und eines Analysators zur Messung der optischen Dichte liefert eine hohe Messgenauigkeit.

1 Index

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Index.....	2
1.1	Inhaltsverzeichnis.....	2
1.2	Abbildungsverzeichnis	3
2	Einleitung	4
3	Material und Methoden	4
3.1	Chemikalien und Instrumente	4
3.2	Differenzspektrometrie.....	5
3.3	Bindung von Cyanid an Katalase	6
3.4	Auswertung	7
4	Experimenteller Teil.....	9
4.1	Versuch.....	9
4.2	Auswertung	9
5	Literatur	9

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strahlengang des Zweistrahlenspektrometers.....	5
Abbildung 2: Humane Katalase, Kristallstruktur 1.5 Å.....	6
Abbildung 3: Auswertungsverfahren nach Scatchard.....	7
Abbildung 4: Auswertungsverfahren nach Stockell.....	8
Abbildung 5: Absorptionsspektren bei unterschiedlicher Sättigung.....	9
Abbildung 6: Titrationsschritte 1-10 bei T=15°C	9
Abbildung 7: Titrationsschritte 11-20 bei T=15°C	9
Abbildung 8: Titrationsschritte 21-30 bei T=15°C	9
Abbildung 9: Titrationsschritte 31-34 bei T=15°C	9
Abbildung 10: Titrationsschritte 1-10 bei T=25°C	9
Abbildung 11: Titrationsschritte 11-20 bei T=25°C	9
Abbildung 12: Titrationsschritte 21-30 bei T=25°C	9
Abbildung 13: Titrationsschritte 1-10 bei T=35°C	9
Abbildung 14: Titrationsschritte 11-20 bei T=35°C	9
Abbildung 15: Titrationsschritte 21-30 bei T=35°C	9
Abbildung 16: Sättigungskurve über den gesamten Messbereich	9
Abbildung 17: Sättigungskurve über den unteren Messbereich, 15°C und 25°C.....	9
Abbildung 18: Zur Anlage einer Tangente benutzten Messwerte, 15 °C und 25 °C.....	9
Abbildung 19: Sättigungskurve über den unteren Messbereich, 35°C	9
Abbildung 20: Zur Anlage einer Tangente benutzten Messwerte, 35 °C	9
Abbildung 21: Auswertung nach Scatchard, 15 °C und 25 °C	9
Abbildung 22: Auswertung nach Scatchard, 35 °C.....	9
Abbildung 23: Auswertung nach Stockell, 15 °C	9
Abbildung 24: Auswertung nach Stockell, 25 °C und 35 °C.....	9

2 Einleitung

Es wurde die Bindung von Cyanid an das Enzym Katalase spektroskopisch untersucht. Neben der exemplarischen Aufzeichnung der absoluten Absorptionsspektren wurden detaillierte Messungen mit Hilfe differenzspektroskopischer Methoden für unterschiedliche Ligandenkonzentrationen durchgeführt.

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten wurde für drei verschiedene Temperaturen vorgenommen und nach der van't Hoffschen Reaktionsisobaren die Reaktionsenthalpie soweit möglich ermittelt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Instrumente

Photometer	-	Uvicon Spektrophotometer 930
Temperierung	-	LKB 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator
Mikroliterspritze		
KPP	-	0,1 M Kaliumphosphat pH 7,0
KCN	-	0,1 M Kaliumcyanid
Katalase	-	0,33 mM Katalase (MW 60000) aus Rinderleber vorliegend als Kristallsuspension, 20 mg/ml
Katalase 1:40	-	8,3 µM Katalase 50 µl Katalase-Suspension auf 2 ml Lösung in KPP

3.2 Differenzspektrometrie

Während sich bei Einstrahlphotometern nur eine Küvette im Strahlengang befindet, ermöglichen es Doppelstrahlspektrophotometer, Referenz- und Leerwerte nahezu zeitgleich zu erfassen. Dieses Verfahren liefert eine wesentlich erhöhte Genauigkeit insbesondere bei Versuchen, bei denen Spontanreaktionen, z.B. durch Instabilität des Substrats, neben der eigentlich zu messenden Enzymreaktion ablaufen.

Technisch kann das Doppelstrahlprinzip auf zweierlei Arten realisiert werden: Im einfachsten Fall wird das erzeugte monochromatische Licht mit einem Strahlteiler in zwei Strahlen halber Intensität aufgetrennt. Der Proben- und Referenzstrahl wird dann mit zwei unabhängigen Photomultipliern zeitgleich registriert und rechnerisch voneinander abgezogen. Die Verwendung von unterschiedlichen Messgeräten kann bei unzureichender Kalibrierung für zusätzliche Fehlerquellen sorgen.

Ein aufwändigeres Verfahren benutzt eine rotierende, mit einem Spiegel versehene Lochblende, die den Lichtstrahl wechselweise durch eine Küvette passieren lässt oder zur zweiten Küvette reflektiert. Beide Strahlengänge haben idealerweise dieselbe Intensität und verlaufen symmetrisch zueinander. Da die Messung mit nur einem Photomultiplier erfolgt, werden die alternierenden Strahlen durch eine zweite, in gleicher Frequenz rotierende Lochblende zum Detektor gelenkt. Die Extinktionen werden nacheinander gemessen und ihre Differenz ausgegeben.

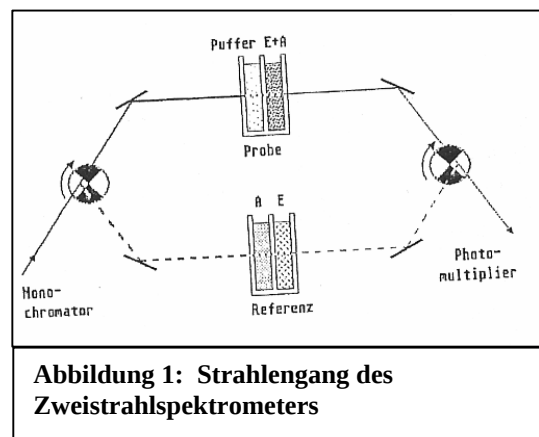


Abbildung 1: Strahlengang des Zweistrahlenspektrometers

Differenzspektren eignen sich besonders zur Untersuchung von multiplen Gleichgewichten (Makromolekül-Ligand-Bindungen), bei denen eine durch die Bindung verursachte spektrale Änderung auftritt. Hier kann sowohl das Protein- als auch das Ligandenspektrum eine Verschiebung erfahren. In der Praxis betrifft dies jedoch meist das Makromolekül, dessen aromatische Aminosäuren in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln Energieunterschiede zwischen Grund- und angeregtem Zustand aufweisen. Die Bindung eines Liganden kann z.B. dazu führen, dass Aminosäurereste abgeschirmt werden oder sich hydrophile Teile des Proteins im Rahmen des induced-fit-Modells nach innen kehren. Dies daraus resultierende Änderung in der Umgebungspolarität für die betroffenen Aminosäuren führt dann zur Verschiebung des Absorptionsspektrums.

Da die Differenzspektrometrie eine sehr empfindliche Messmethode darstellt, ist es erforderlich, Fehlerquellen weitestgehend zu minimieren. In der Praxis kommen häufig Tandemküvetten zum Einsatz, die durch eine geschliffene Trennwand in zwei Kammern gleicher Schichtdicke unterteilt sind. Sowohl die Proben-, als auch die Referenzküvette werden mit Makromoleküllösung in einer Kammer und mit Puffer in der anderen Kammer befüllt. Wird der Makromoleküllösung in der Probenküvette nun schrittweise Ligand zugegeben, so erfolgt die gleiche Zugabe zur Pufferlösung in der Referenzküvette. Auf diese Weise wird die absolute, bindungsunabhängige Absorption des Liganden bei der Messung kompensiert.

Ferner muss darauf geachtet werden, dass die Volumenzunahme, die durch Zugabe des Ligands entsteht, auch in der Referenzküvette mit Puffer ausgeglichen wird. Die Durchmischung erfolgt bestenfalls kontinuierlich mit einem kleinen Magnetrührer, oder wenn nicht anders praktikierbar, manuell mit Hilfe eines Glasstabs, der stets für dieselbe Küvette verwendet wird und zwischendurch nicht getrocknet werden darf, um Verluste gering zu halten.

3.3 Bindung von Cyanid an Katalase

Die Katalase (MW: 60000) ist physiologisch für die Beseitigung des starken Zellgifts Wasserstoffperoxid durch Disproportionierung zu Sauerstoff und Wasser verantwortlich. Es handelt sich um ein homotetrameres Enzym, dessen Untereinheiten je einen Eisen-Porphyrin-Komplex enthalten. Das Eisenion ist vierfach durch Porphyrin koordiniert, eine weitere Koordinationsstelle wird von einem Histidylrest der Katalase-Untereinheit besetzt.

Die sechste freie Koordinationsstelle kann von Anionen wie Cyanid oder Fluorid besetzt werden. Dies führt zu einer Ligandenfeldaufspaltung der

Orbitale des Eisenatoms. Das Eisenatom bewegt sich dabei in die Porphyrinebene hinein (*Perutzmechanismus*), was eine Verschiebung des Porphyrinspektrums zu längeren Wellenlängen verursacht.



**Abbildung 2 : Human. Katalase,
Kristallstruktur 1.5 Å**

3.4 Auswertung

Aus den aufgenommenen Differenzspektren werden die durch Ligandenbindung verursachten Änderungen quantifiziert. Hierzu wird für jede Kurve die Differenz zwischen dem lokalen Maximum (bei ca 430 nm) und der Basislinie ausgemessen. Die erhaltenen Werte der spektralen Änderung werden dann gegen die jeweilige Ligandenkonzentration in der Küvette aufgetragen..

Aus diesen Primärdiagrammen lassen sich die Konzentrationen des gebundenen und freien Liganden ablesen (Abb. 3a) und nach Scatchard auswerten (Abb. 3b). Dafür müssen Tangenten an den unteren und oberen Bereich der Sättigungskurve angelegt werden. Dies erfolgt einerseits mittels linearer Regression über die ersten Messwerte, andererseits über die zeichnerische Ermittlung einer Asymptoten für den Sättigungsbereich. Die Berechnung der Anteile gebundenen und freien Ligandens erfolgt mithilfe der Tangenten für die Messwerte im Bereich mittlerer Sättigung.

Letztlich sollen aus dem Sekundärdiagramm nach Scatchard die Dissoziationskonstanten für die unterschiedlichen Temperaturen gewonnen werden.

Als zweites Auswertungsverfahren wird die Linearisierung der Titrationskurve nach Stockell angewendet (Abb. 4). Hierbei wird der Maximalwert des Signals bei Sättigung als $Y=1$ definiert und wie in der Abbildung dargestellt aufgetragen.

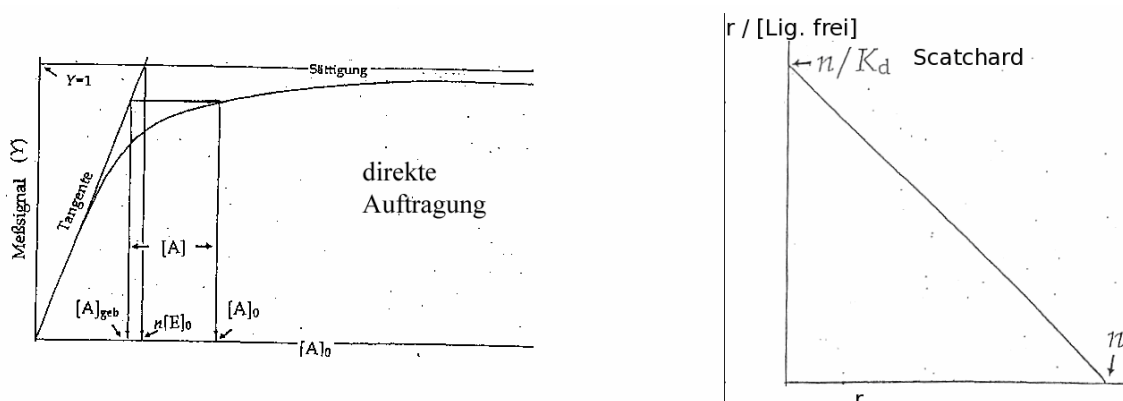


Abbildung 3: Auswertungsverfahren nach Scatchard

Es gilt :

$$r = [\text{gebundener Ligand}] / [\text{Makromolekül}] \quad (1)$$

$$n = \text{Zahl der Bindungsstellen} \quad (2)$$

Scatchard $r / [\text{freier Ligand}] = -r \cdot (1 / K_d) + (n / K_d) \quad (3)$

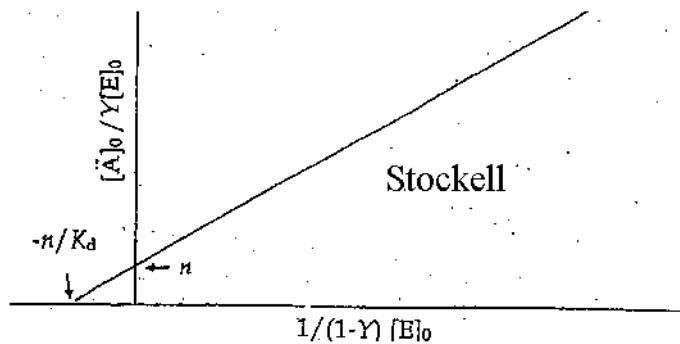


Abbildung 4: Auswertungsverfahren nach Stockell

Die bei den verschiedenen Temperaturen erhaltenen Dissoziationskonstanten werden im van't Hoffschen Diagramm aufgetragen und die Reaktionsenthalpie bestimmt:

van't Hoff
$$\ln\left(\frac{K'_p}{K_p}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T'}\right) \quad (4)$$

wobei K'_p die Gleichgewichtskonstante bei der Temperatur T' ,
 K_p die Konstante bei T und ΔH° die Standardreaktionsenthalpie bei T
ist.

4 Experimenteller Teil

4.1 Versuch

In einem Vorversuch wurde das Absorptionsspektrum von Katalase 1:40 im Spektralbereich zwischen 200 und 700 nm unter Verwendung einer UV-durchlässigen Quarzküvette aufgenommen. Als Referenz diente KPP.

Anschliessend wurde dreimal KCN zugegeben und für den Bereich der Untersättigung ($0,5 \mu\text{M} = 0,5 K_D$), den mittleren Sättigungsbereich ($3 \mu\text{M} = 3 K_D$) sowie bei Vollsättigung ($50 \mu\text{M} = 50 K_D$) die spektrale Änderung veranschaulicht.

Neben den konventionellen Absorptionsspektren wurde zusätzlich ein Differenzspektrum mit freier Katalase als Referenz gemessen.

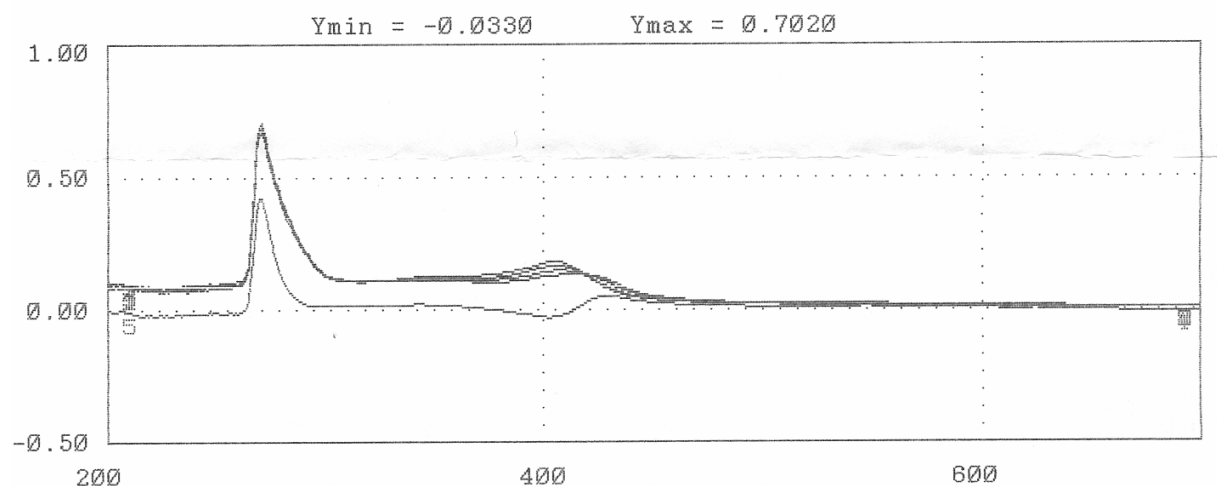


Abbildung 5: Absorptionsspektren bei unterschiedlicher Sättigung

Die oberen drei Spektren zeigen die Absorption der Katalase, deren lokales Maximum bei 400 nm durch zunehmende Sättigung bathochrom verschoben wird.

Das Differenzspektrum (Abb 4, unten) gibt die Stärke der Verschiebung wieder. Ausgewertet werden im folgenden die Differenzen zwischen des maximalen Peaks des Differenzspektrums und dessen Basislinie.

Für den Hauptversuch wurde dreimal mit KCN bei T=15 °C, 25 °C und 35°C titriert. Die zugegebenen Konzentrationen KCN, die Endkonzentration in der Probenküvette, sowie die spektrale Änderung fasst Tabelle 1 zusammen.

Die Zugabe der KCN-Lösung erfolgte jeweils in einem Volumen von 1 µl mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Alle fünf Messungen wurde das Volumen der Referenzküvette durch Zugabe von KPP angeglichen.

Da der Ligand im Bereich der Differenzspektren selbst nicht absorbiert, wurde auf den Einsatz von Tandemküvetten verzichtet. Die Durchmischung erfolgte mit zwei getrennten Rührspateln, so dass Volumenverluste und Vermischung der Lösungen aus Proben- und Referenzküvette vermieden wurden.

Tabelle 1: Titration mit KCN bei verschiedenen Temperaturen

Messung	1µl Zugabe von	Endkonzentration	spektrale Änderung		
	KCN	in 2ml Küvette	15 °C	25 °C	35 °C
	Vorverdünnung				
	[µM]	[nM]	[]	[]	[]
1	0	0	0,26	-0,15	13,89
2	20	10	0,33	-0,02	12,34
3	4	12	0,26	0	19,54
4	4	14	0,36	0,17	2,57
5	8	18	0,29	0,05	16,46
6	20	28	0,12	0,05	15,43
7	20	38	0,41	0,09	18
8	100	88	0,43	0,21	17,49
9	100	138	0,46	0,31	19,03
10	500	388	0,62	0,51	12,34
11	500	638	0,57	0,73	14,26
12	500	888	1,03	0,78	17,23
13	1000	1388	1,6	1,15	17,69
14	1000	1888	1,89	1,38	19,29
15	2000	2888	2,8	1,71	20,2
16	2000	3888	2,63	1,8	23,17
17	2000	4888	3,26	2,17	22,26
18	2000	5888	3,14	2,26	26,83
19	4000	7888	3,66	2,49	26,6
20	4000	9888	4,11	2,82	27,97
21	10000	14888	3,94	3,09	20,57
22	10000	19888	4,2	2,86	24,69
23	10000	24888	4,2	3,37	21,94
24	10000	29888	4,11	3,37	21,49
25	10000	34888	4,46	3,49	24,69
26	20000	44888	4,63	3,71	20,57

27	20000	54888	4,29	3,54	24,69
28	20000	64888	4,54	3,94	26,06
29	20000	74888	4,89	3,83	20,11
30	20000	84888	5,23	3,89	27,89
31	20000	94888	5,23		
32	20000	104888	5,31		
33	20000	114888	5,49		
34	20000	124888	5,57		

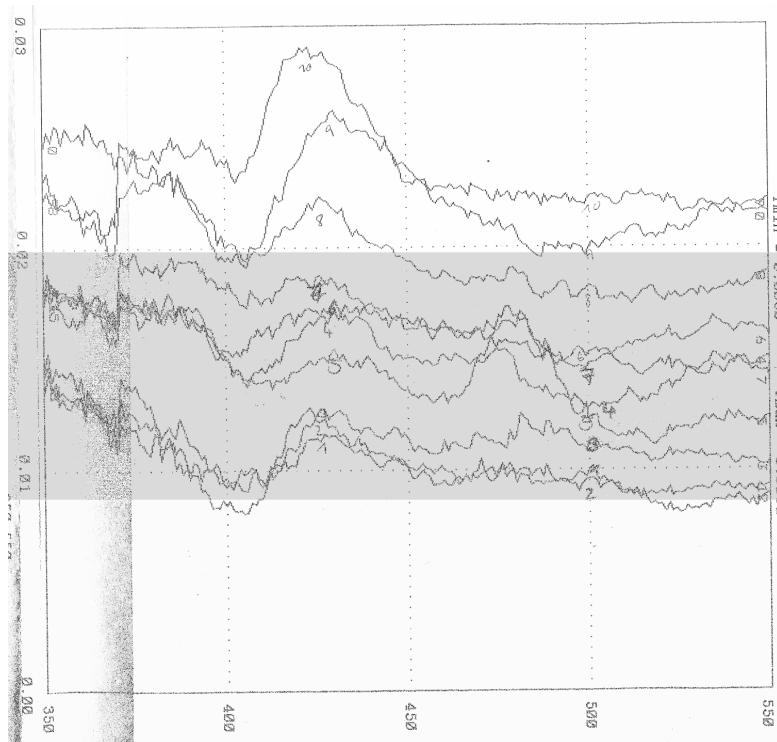


Abbildung 6: Titrationschritte 1-10 bei T=15°C

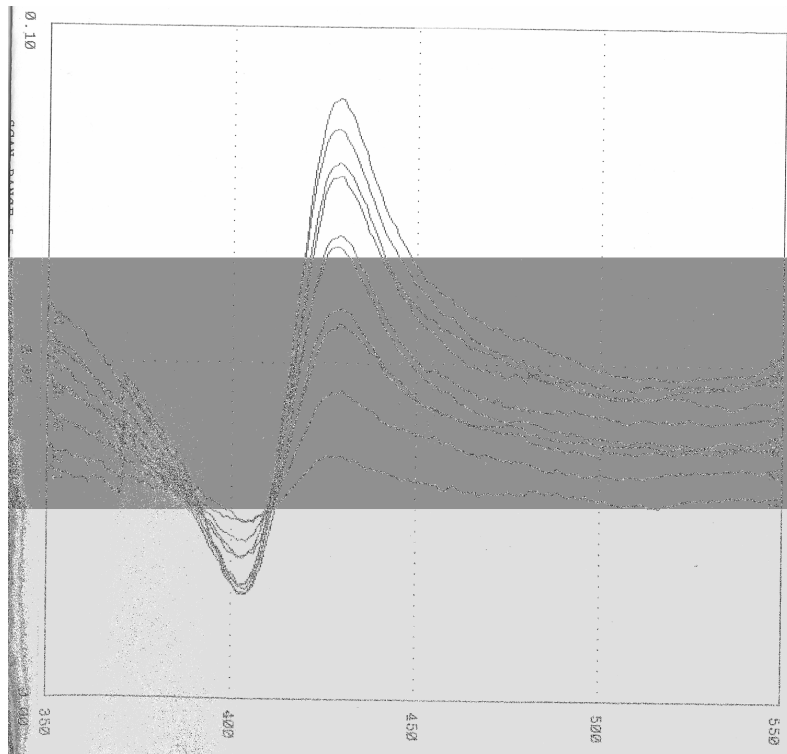


Abbildung 7: Titrationsschritte 11-20 bei $T=15^{\circ}\text{C}$

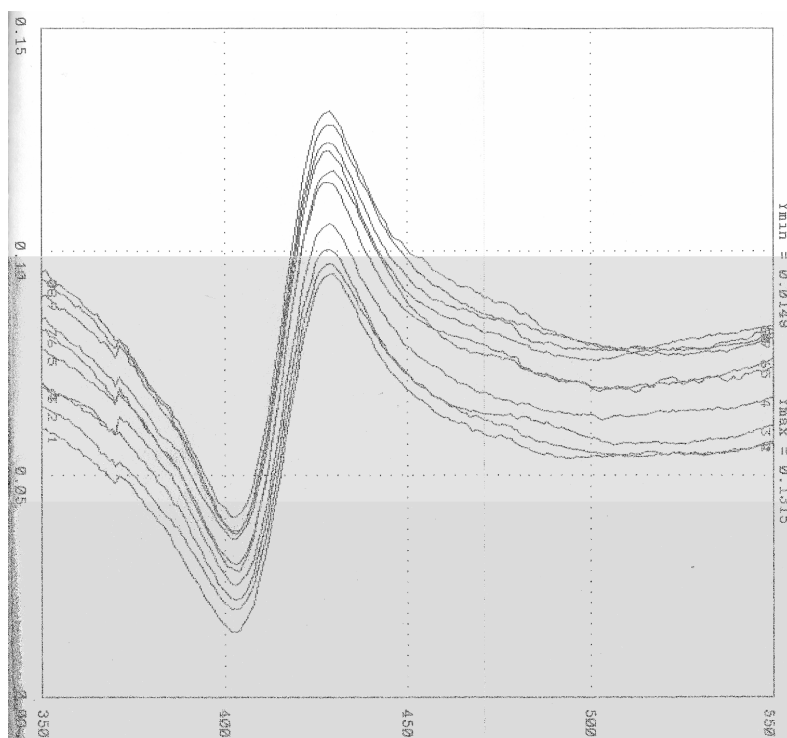


Abbildung 8: Titrationsschritte 21-30 bei $T=15^{\circ}\text{C}$

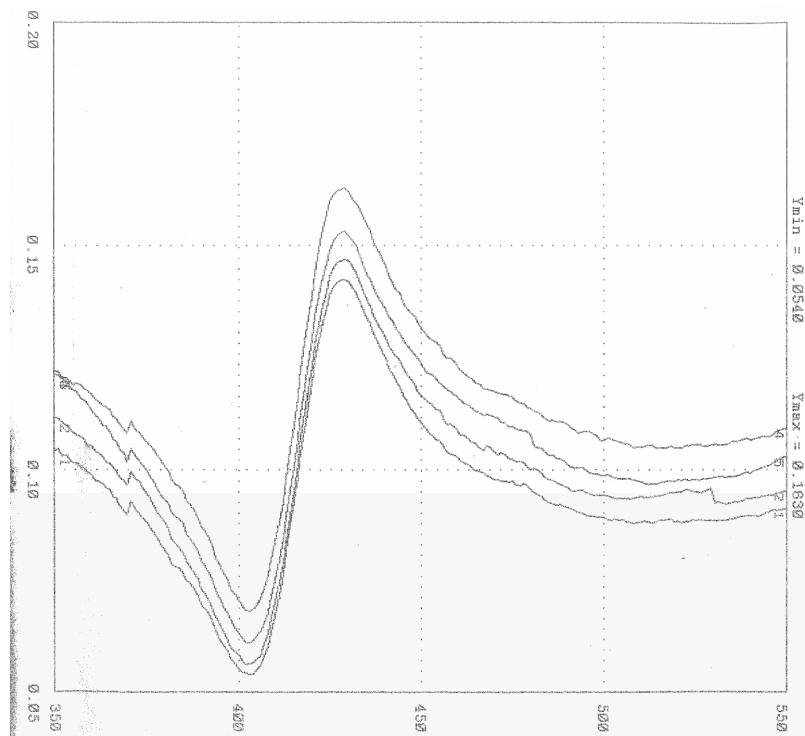


Abbildung 9: Titrationsschritte 31-34 bei T=15°C

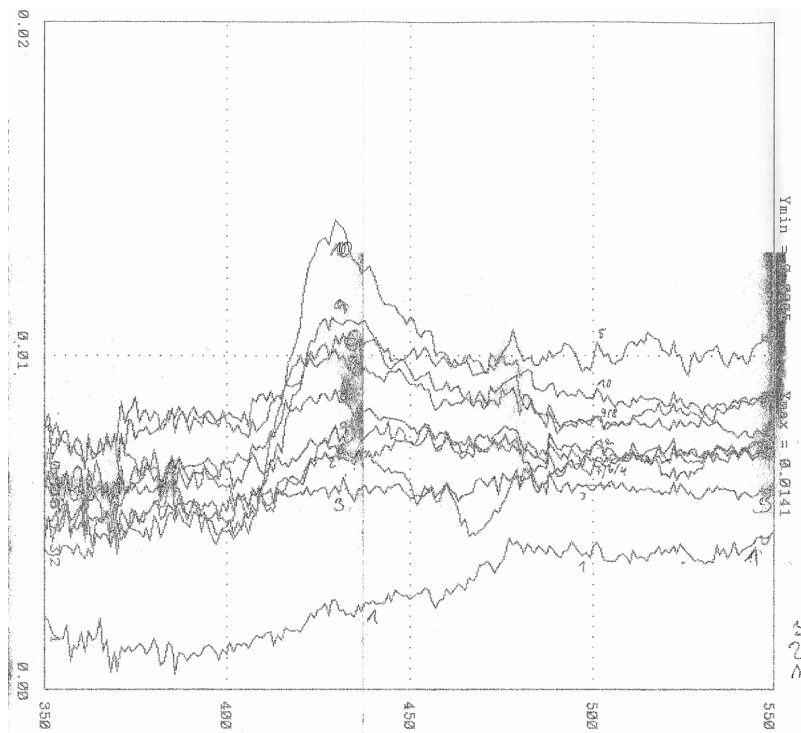


Abbildung 10: Titrationschritte 1-10 bei T=25°C

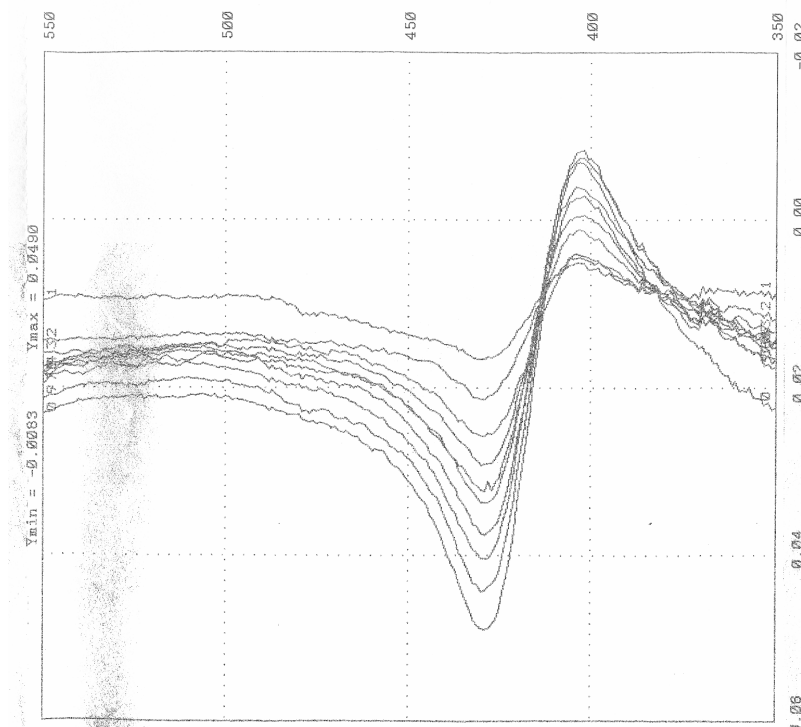


Abbildung 11: Titrationschritte 11-20 bei T=25°C

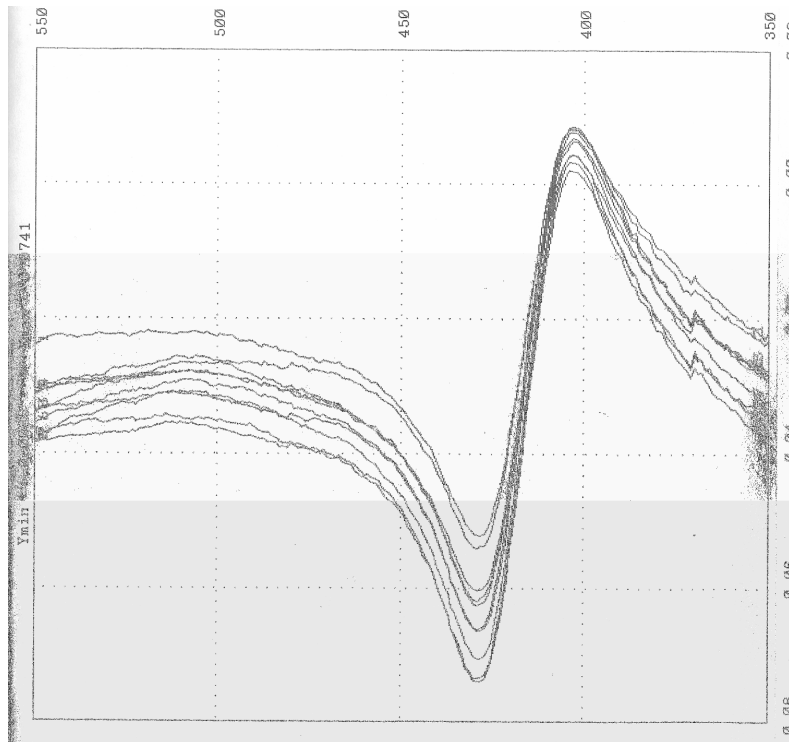


Abbildung 12: Titrationsschritte 21-30 bei $T=25^\circ\text{C}$

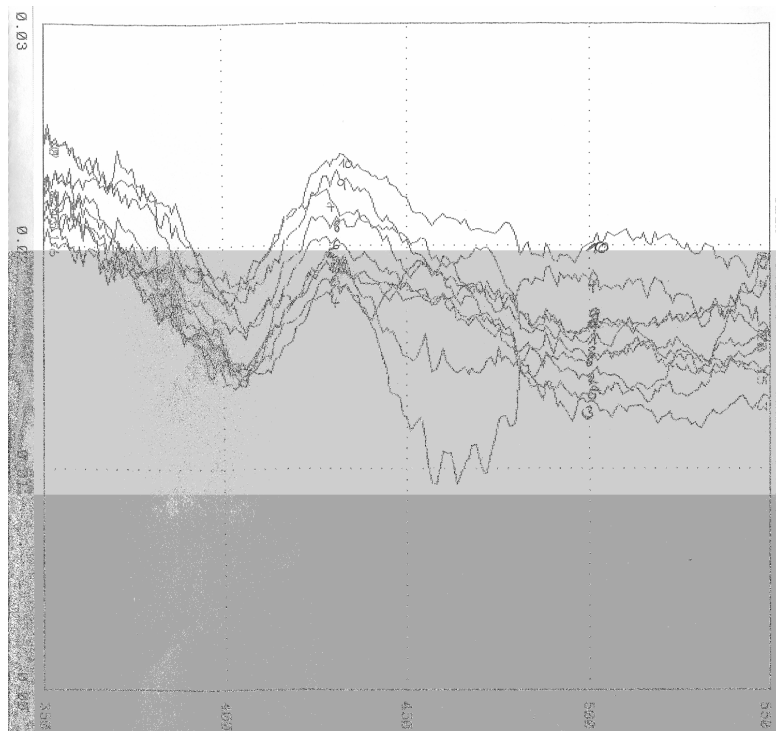


Abbildung 13: Titrationsschritte 1-10 bei $T=35^\circ\text{C}$

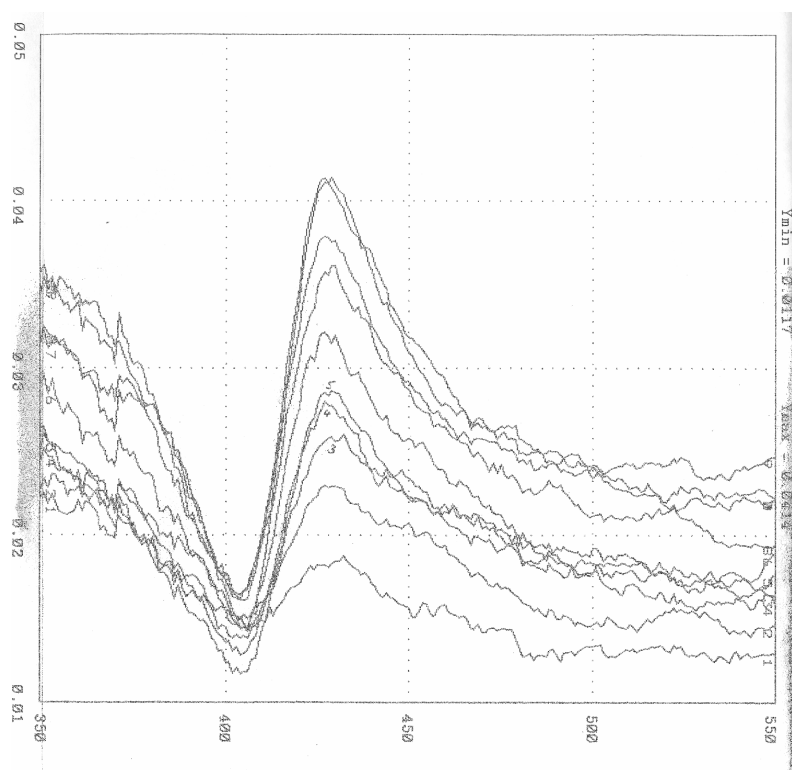


Abbildung 14: Titrationsschritte 11-20 bei T=35°C

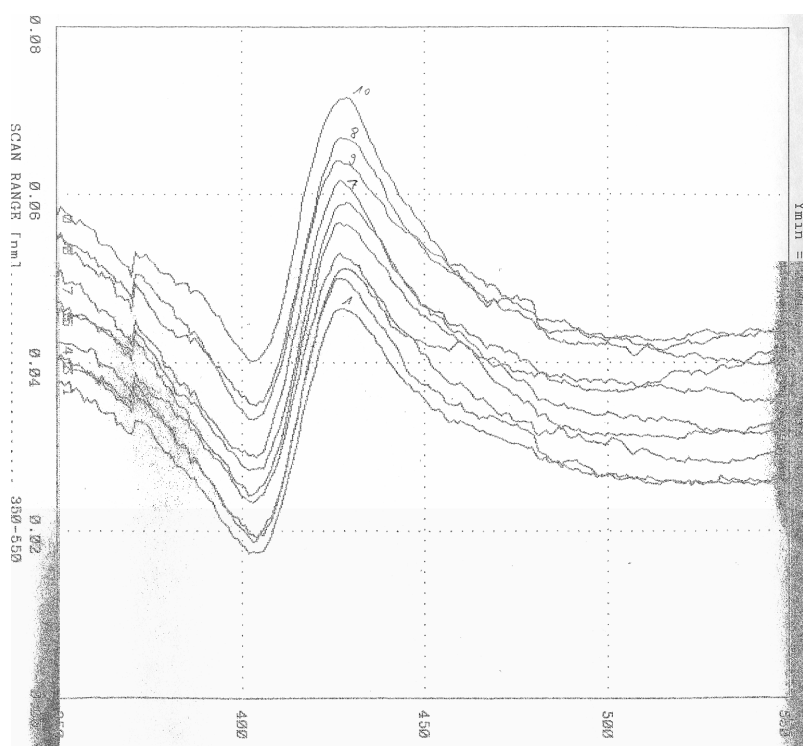


Abbildung 15: Titrationsschritte 21-30 bei T=35°C

4.2 Auswertung

Abbildung 16 zeigt die spektralen Änderungen bei den jeweiligen Cyanid-Konzentrationen. Für die Auswertung werden an den unteren und oberen Sättigungsbereich Tangenten angelegt (Abb. 17-20) und die Konzentration von gebundenem und freiem Liganden bestimmt.

Tabelle 2: Tangentenberechnung zur Auswertung nach Scatchard

Berechnung von Tangenten			
Temperatur	Sättigungsbereich	Regression an Messungen	Gleichung
15 °C	unterer	Nr. 1-9	$y = 0,0015 x + 0,2669$
	oberer		$y = 4,20$
25 °C	unterer	Nr. 1-9	$y = 0,0025 x - 0,0188$
	oberer		$y = 3,37$
35 °C	unterer	Nr. 1-16	$y = 0,0022 x + 14,511$
	oberer		$y = 25,00$

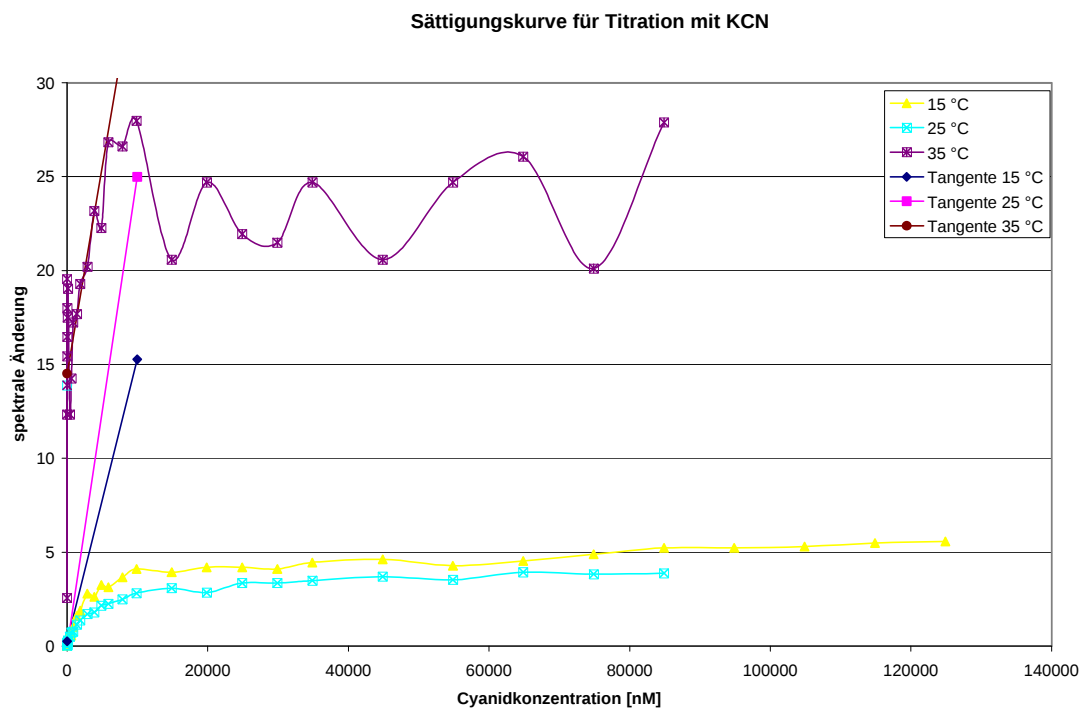


Abbildung 16: Sättigungskurve über den gesamten Messbereich

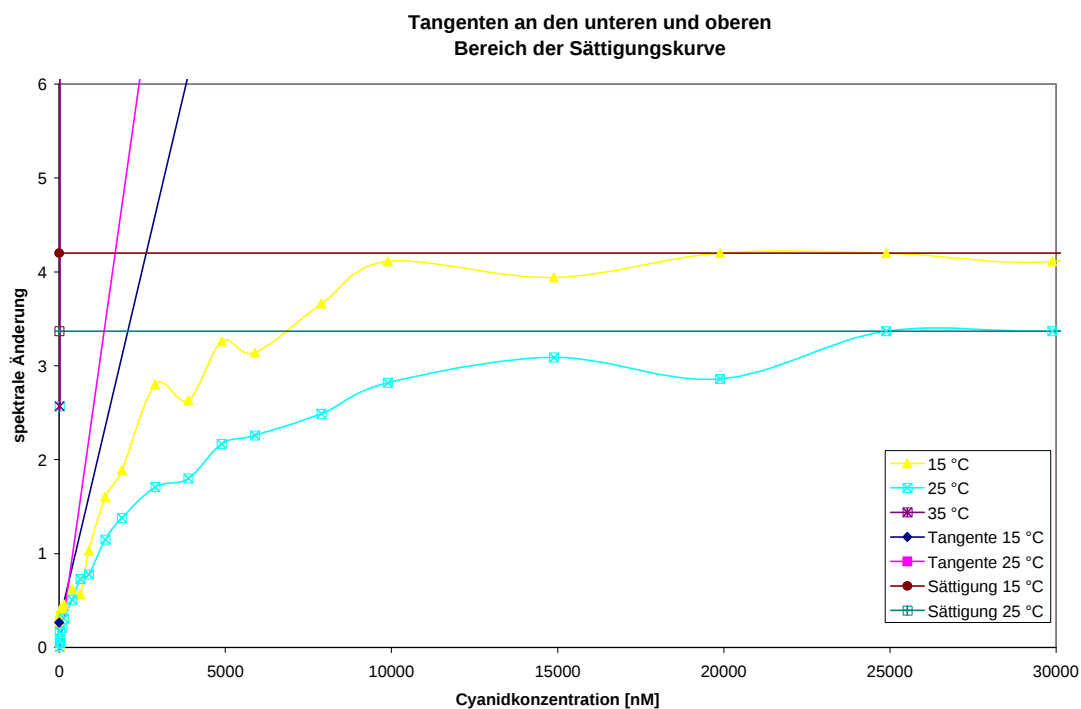


Abbildung 17: Sättigungskurve über den unteren Messbereich, 15°C und 25°C

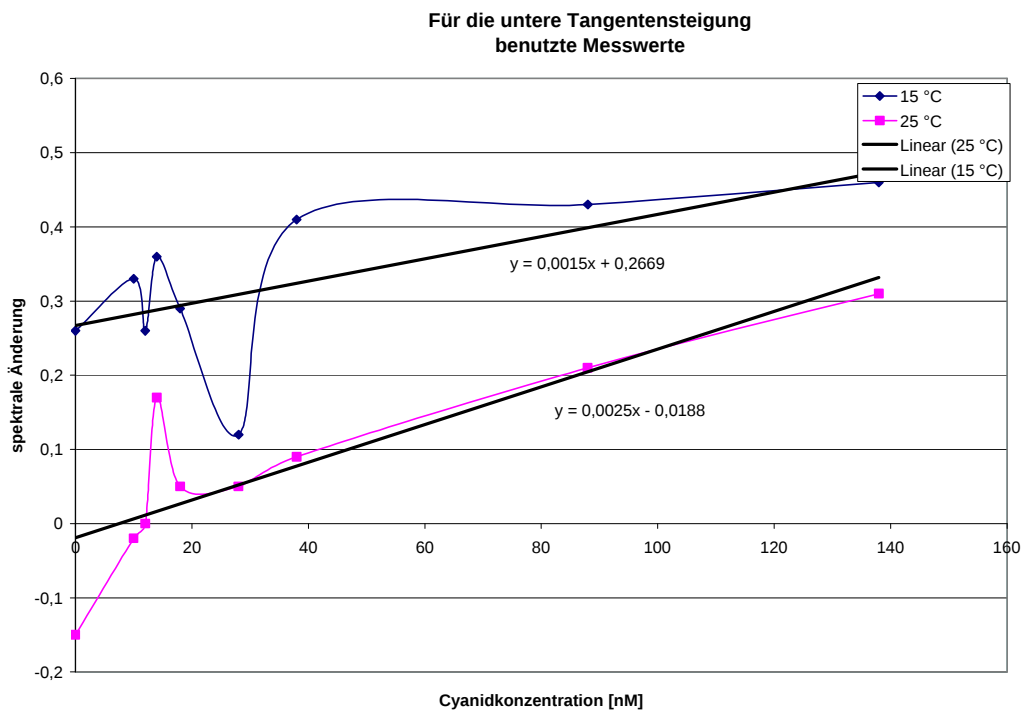


Abbildung 18: Zur Anlage einer Tangente benutzten Messwerte, 15 °C und 25 °C

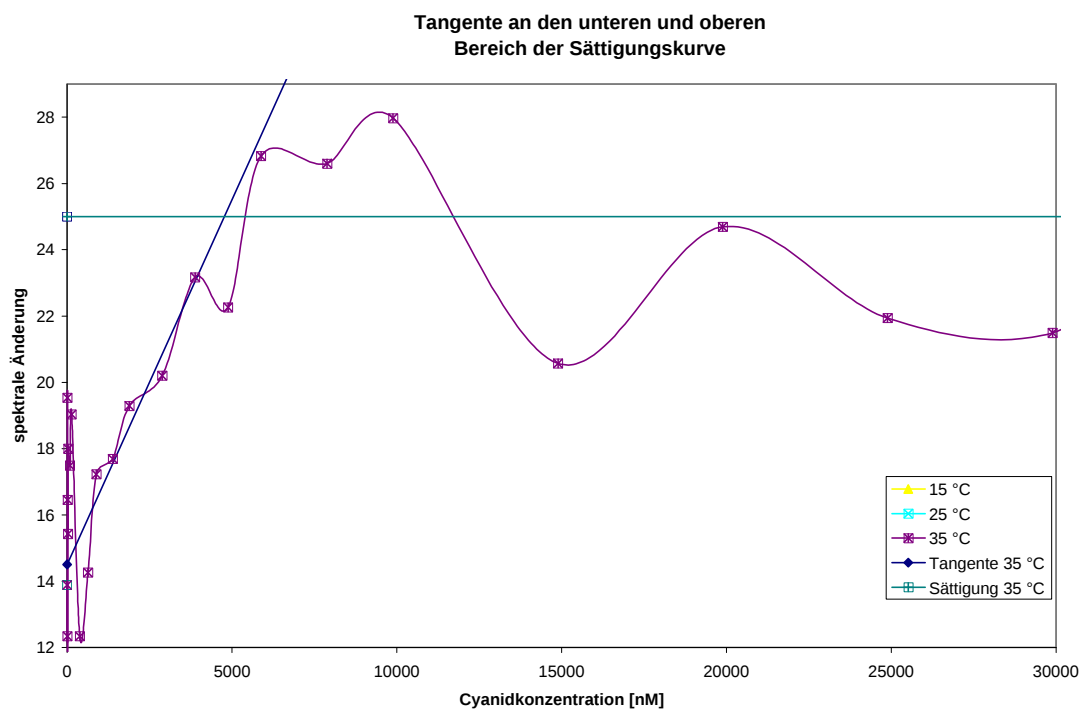


Abbildung 19: Sättigungskurve über den unteren Messbereich, 35°C

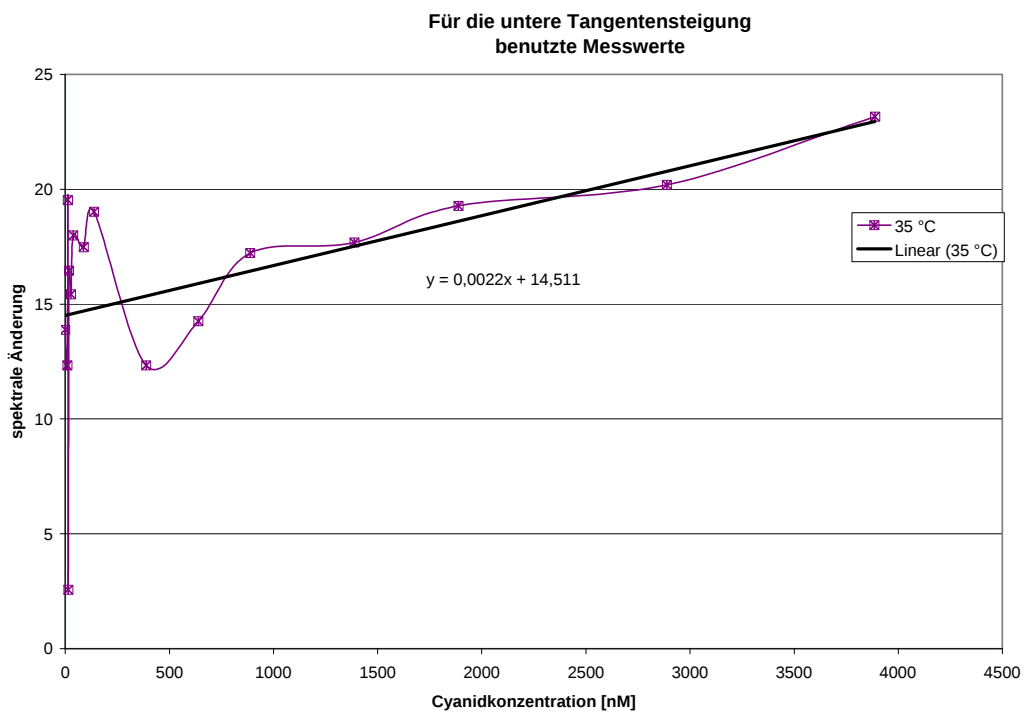


Abbildung 20: Zur Anlage einer Tangente benutzten Messwerte, 35 °C

Die aus der direkten Auftragung erhaltenen Konzentrationen des freien und gebundenen Liganden werden nun wie unter 3.4. erläutert bestimmt und nach Scatchard aufgetragen.

Tabelle 3: Auswertung der Primärdiagramme

Auftrag nach Scatchard		mit $[E]_0 = 8,3 \mu\text{M} = 8300 \text{ nM}$			
Temperatur	$[A]_0 \text{ [nM]}$	$[A]_{\text{geb}} \text{ [nM]}$	$[A]_{\text{frei}} \text{ [nM]}$	$[A]_{\text{geb}} / [E]_0$	$r / [A]_{\text{frei}} \text{ [1/nM]}$
15 °C	888	508,73	379,27	6,13E-02	1,62E-04
	1388	888,73	499,27	1,07E-01	2,14E-04
	1888	1082,07	805,93	1,30E-01	1,62E-04
	2888	1688,73	1199,27	2,03E-01	1,70E-04
	3888	1575,40	2312,60	1,90E-01	8,21E-05
	4888	1995,40	2892,60	2,40E-01	8,31E-05
	5888	1915,40	3972,60	2,31E-01	5,81E-05
	7888	2262,07	5625,93	2,73E-01	4,84E-05
	9888	2562,07	7325,93	3,09E-01	4,21E-05
	14888	2448,73	12439,27	2,95E-01	2,37E-05
25 °C	888	319,52	568,48	3,85E-02	6,77E-05
	1388	467,52	920,48	5,63E-02	6,12E-05
	1888	559,52	1328,48	6,74E-02	5,07E-05
	2888	691,52	2196,48	8,33E-02	3,79E-05
	3888	727,52	3160,48	8,77E-02	2,77E-05
	4888	875,52	4012,48	1,05E-01	2,63E-05
	5888	911,52	4976,48	1,10E-01	2,21E-05
	7888	1003,52	6884,48	1,21E-01	1,76E-05
	9888	1135,52	8752,48	1,37E-01	1,56E-05
	14888	1243,52	13644,48	1,50E-01	1,10E-05
35 °C	888	1235,91	-347,91	1,49E-01	-4,28E-04
	1388	1445,00	-57,00	1,74E-01	-3,05E-03
	1888	2172,27	-284,27	2,62E-01	-9,21E-04
	2888	2585,91	302,09	3,12E-01	1,03E-03
	3888	3935,91	-47,91	4,74E-01	-9,90E-03
	4888	3522,27	1365,73	4,24E-01	3,11E-04
	5888	5599,55	288,45	6,75E-01	2,34E-03
	7888	5495,00	2393,00	6,62E-01	2,77E-04
	9888	6117,73	3770,27	7,37E-01	1,95E-04
	14888	2754,09	12133,91	3,32E-01	2,73E-05

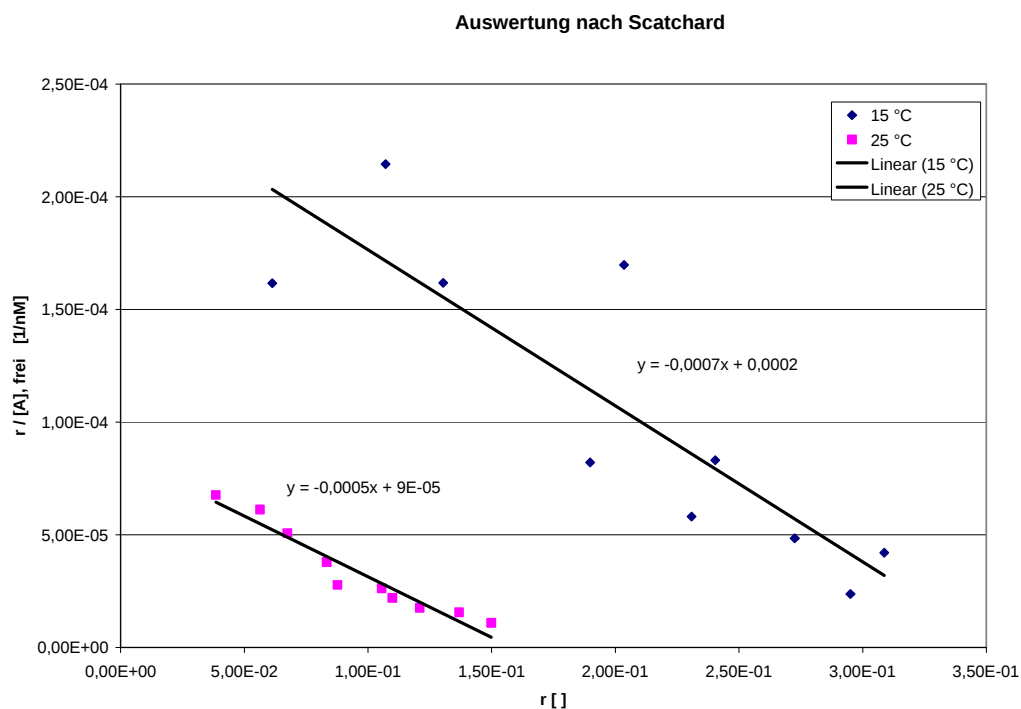


Abbildung 21: Auswertung nach Scatchard, 15 °C und 25 °C

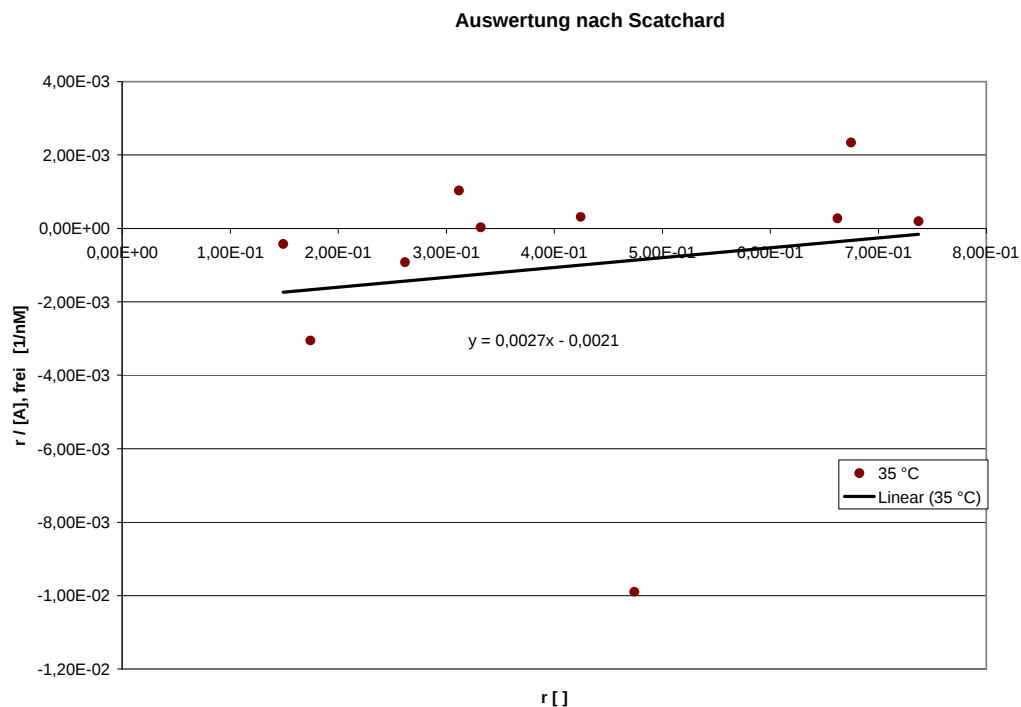


Abbildung 22: Auswertung nach Scatchard, 35 °C

Tabelle 4: Ergebnisse der Auswertung nach Scatchard

Temperatur	n	n / K_D	K_D
15 °C	0,29	2 E-04	1450 nM = 1,5 μ M
25 °C	0,18	9 E-05	2000 nM = 2,0 μ M
35 °C	kein typisches Scatchard-Diagramm	---	---

Die Auswertung nach Scatchard ergibt plausible Dissoziationskonstanten bei 15 °C und 25 °C. Die Zahl der Bindungsstellen liegt unter eins. Unter der Annahme, dass jedes Monomer der Katalase über eine Bindungsstelle verfügen sollte, die gesamte Katalase also vier Bindungsstellen aufweist, sind folgende Schlüsse möglich: Theoretisch wäre es denkbar, dass nur ein geringer Teil des Enzyms intakt vorliegt, so dass nur wenige Moleküle tatsächlich den Liganden binden können. Andererseits können systematische Fehler bei der Messung und der Auswertung mit Hilfe der Tangenten auftreten.

Für die Messung bei 35 °C wird kein typisches Scatchard-Diagramm mit negativer Steigung der Regressionsgeraden erhalten. Eine Auswertung erfolgt deshalb nicht.

Das zweite eingesetzte Verfahren ist die Auftragung nach Stockell. Hierfür wird der Maximalwert des Signals bei Sättigung als $Y=1$ definiert und wie unter 3.4 beschrieben aufgetragen:

Tabelle 5: Auswertung der Primärdiagramme nach Stockell

Auswertung nach Stockell			mit $[E]_0 = 8,3 \mu\text{M} = 8300 \text{ nM}$						
	15 °C			25 °C			35 °C		
$[A]_0$	Y	$1/((1-Y) [E]_0)$	$[A]_0 / (Y [E]_0)$	Y	$1/((1-Y) [E]_0)$	$[A]_0 / (Y [E]_0)$	Y	$1/((1-Y) [E]_0)$	$[A]_0 / (Y [E]_0)$
[nM]	[]	[nM]		[]	[nM]		[]	[nM]	
0	0,05	1,26E-04	0,00E+00	-3,81E-02	1,16E-04	0,00E+00	4,97E-01	2,39E-04	0,00E+00
10	0,06	1,28E-04	2,03E-02	-5,08E-03	1,20E-04	-2,37E-01	4,41E-01	2,16E-04	2,73E-03
12	0,05	1,26E-04	3,10E-02	0,00E+00	1,20E-04	---	6,99E-01	4,00E-04	2,07E-03
14	0,06	1,29E-04	2,61E-02	4,31E-02	1,26E-04	3,91E-02	9,19E-02	1,33E-04	1,84E-02
18	0,05	1,27E-04	4,17E-02	1,27E-02	1,22E-04	1,71E-01	5,88E-01	2,93E-04	3,69E-03
28	0,02	1,23E-04	1,57E-01	1,27E-02	1,22E-04	2,66E-01	5,52E-01	2,69E-04	6,12E-03
38	0,07	1,30E-04	6,22E-02	2,28E-02	1,23E-04	2,00E-01	6,44E-01	3,38E-04	7,11E-03
88	0,08	1,31E-04	1,37E-01	5,33E-02	1,27E-04	1,99E-01	6,25E-01	3,22E-04	1,70E-02
138	0,08	1,31E-04	2,01E-01	7,87E-02	1,31E-04	2,11E-01	6,80E-01	3,77E-04	2,44E-02

388	0,11	1,36E-04	4,20E-01	1,29E-01	1,38E-04	3,61E-01	4,41E-01	2,16E-04	1,06E-01
638	0,10	1,34E-04	7,51E-01	1,85E-01	1,48E-04	4,15E-01	5,10E-01	2,46E-04	1,51E-01
888	0,18	1,48E-04	5,79E-01	1,98E-01	1,50E-04	5,40E-01	6,16E-01	3,14E-04	1,74E-01
1388	0,29	1,69E-04	5,82E-01	2,92E-01	1,70E-04	5,73E-01	6,32E-01	3,28E-04	2,64E-01
1888	0,34	1,82E-04	6,70E-01	3,50E-01	1,85E-04	6,49E-01	6,90E-01	3,88E-04	3,30E-01
2888	0,50	2,42E-04	6,92E-01	4,34E-01	2,13E-04	8,02E-01	7,22E-01	4,34E-04	4,82E-01
3888	0,47	2,28E-04	9,92E-01	4,57E-01	2,22E-04	1,03E+00	8,28E-01	7,02E-04	5,65E-01
4888	0,59	2,91E-04	1,01E+00	5,51E-01	2,68E-04	1,07E+00	7,96E-01	5,90E-04	7,40E-01
5888	0,56	2,76E-04	1,26E+00	5,74E-01	2,83E-04	1,24E+00	9,59E-01	2,96E-03	7,40E-01
7888	0,66	3,51E-04	1,45E+00	6,32E-01	3,27E-04	1,50E+00	9,51E-01	2,46E-03	9,99E-01
9888	0,74	4,60E-04	1,61E+00	7,16E-01	4,24E-04	1,66E+00	1,00E+00	---	---
14888	0,71	4,12E-04	2,54E+00	7,84E-01	5,58E-04	2,29E+00	7,35E-01	4,55E-04	2,44E+00
19888	0,75	4,90E-04	3,18E+00	7,26E-01	4,40E-04	3,30E+00	8,83E-01	1,03E-03	2,71E+00
24888	0,75	4,90E-04	3,98E+00	8,55E-01	8,33E-04	3,51E+00	7,84E-01	5,59E-04	3,82E+00
29888	0,74	4,60E-04	4,88E+00	8,55E-01	8,33E-04	4,21E+00	7,68E-01	5,20E-04	4,69E+00
34888	0,80	6,05E-04	5,25E+00	8,86E-01	1,05E-03	4,75E+00	8,83E-01	1,03E-03	4,76E+00
44888	0,83	7,14E-04	6,51E+00	9,42E-01	2,06E-03	5,74E+00	7,35E-01	4,55E-04	7,35E+00
54888	0,77	5,24E-04	8,59E+00	8,98E-01	1,19E-03	7,36E+00	8,83E-01	1,03E-03	7,49E+00
64888	0,82	6,52E-04	9,59E+00	1,00E+00	---	---	9,32E-01	1,76E-03	8,39E+00
74888	0,88	9,87E-04	1,03E+01	9,72E-01	4,32E-03	9,28E+00	7,19E-01	4,29E-04	1,25E+01
84888	0,94	1,97E-03	1,09E+01	9,87E-01	9,49E-03	1,04E+01	9,97E-01	4,21E-02	1,03E+01
94888	0,94	1,97E-03	1,22E+01						
104888	0,95	2,58E-03	1,33E+01						
114888	0,99	8,39E-03	1,40E+01						
124888	1,00	---	---						

Auftragung nach Stockell

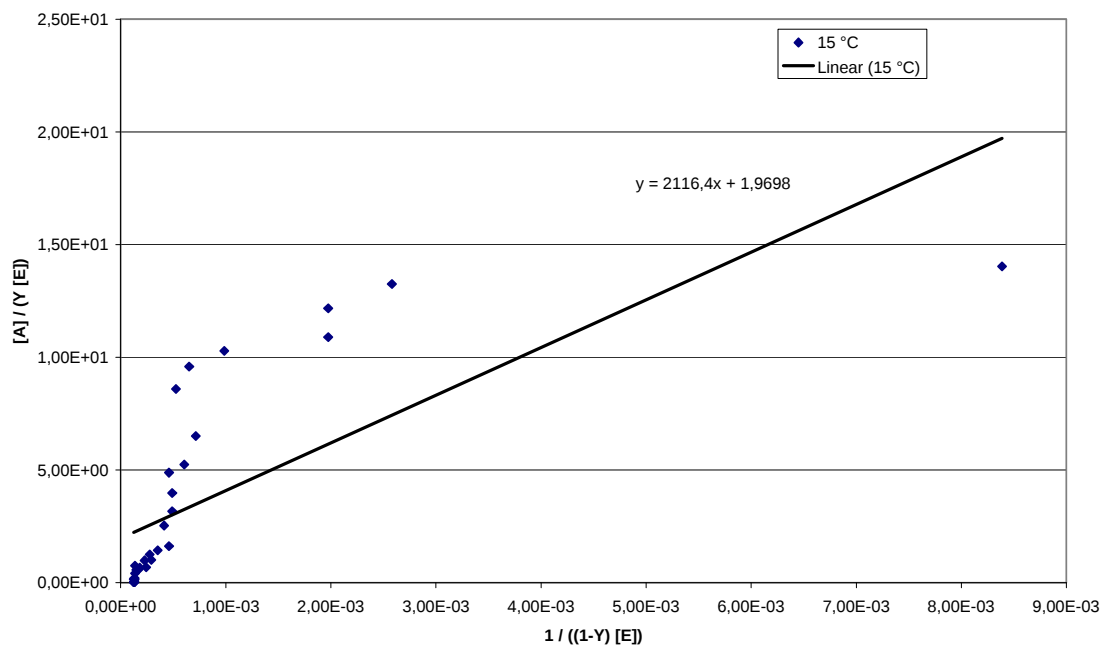


Abbildung 23: Auswertung nach Stockell, 15 °C

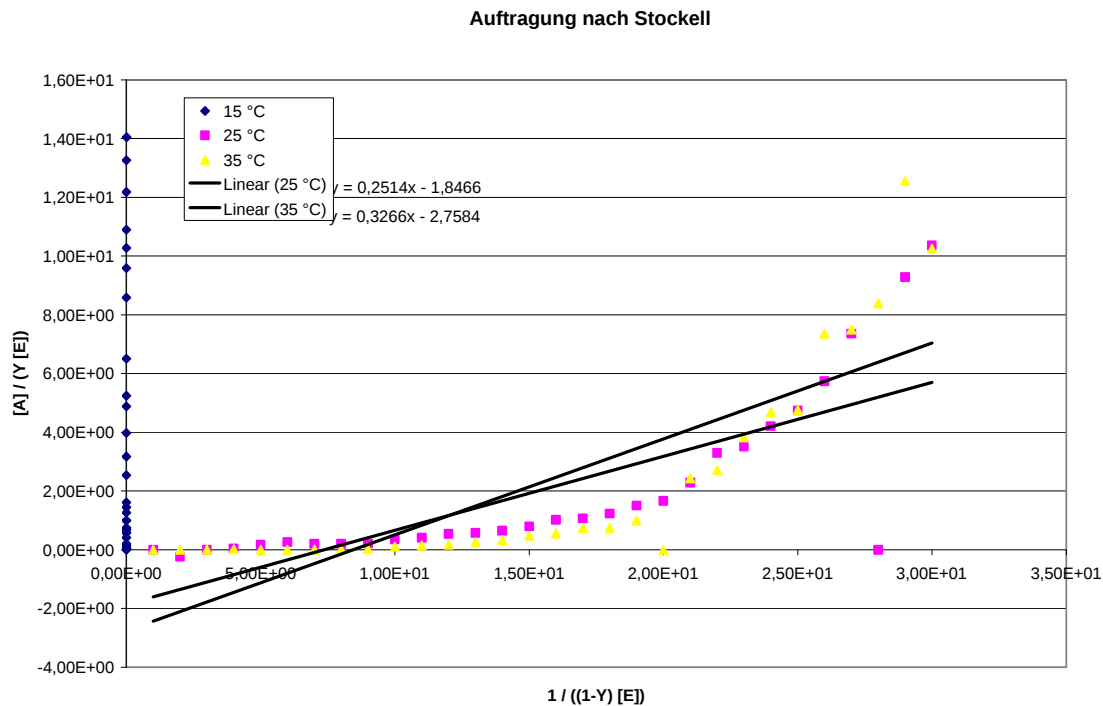


Abbildung 24: Auswertung nach Stockell, 25 °C und 35 °C

Die Diagramme weichen stark vom linearen Verlauf ab. Es ist bekannt, dass das Linearisierungsverfahren nach Stockell sehr empfindlich auf systematische Fehler reagiert. Obwohl keine ausreichende Genauigkeit gegeben scheint, werden die erhaltenen Dissoziationskonstanten in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse der Auswertung nach Stockell

Temperatur	n	n / K_D	K_D
15 °C	1,9698	9,31 E-04	2115 nM = 2,1 μ M
25 °C	negativ (-1,8466)	(-7,35)	(5,50 nM)
35 °C	negativ (-2,7584)	(-8,45)	(5,69 nM)

Für die Bestimmung der Reaktionsenthalpie werden nun der Mittelwert aus Scatchard und Stockell bei 15 °C ($K_D = 1,8 \mu$ M), sowie der nach Scatchard ermittelte Wert bei 25 °C (2 μ M) eingesetzt. Bei 35 °C liegen keine verwendbaren Messwerte vor.

Aus Gleichung (4) folgt:

$$\ln\left(\frac{2}{1,8}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{8,314 \text{ J/molK}} \cdot \left(\frac{1}{15} - \frac{1}{25}\right) \text{ 1/K} \quad (5)$$

$$\Delta H^\circ = 32,84 \text{ J/mol} \quad (6)$$

Dieser Wert würde einer endothermen Reaktion entsprechen. Ein Literaturwert liegt nicht vor. Dennoch ist zu erwarten, dass auf Grund der beobachteten Fehlerstreuung kein realistisches Ergebnis erhalten wurde.

5 Literatur

Bisswanger, Hans: Enzymkinetik. Theorie und Methoden. (Wiley-VCH)