

Praktische Einführung in die Chemie

Integriertes Praktikum:

Versuch 1-3 (RKE)

Reaktionskinetik-Enzyme: Aktivität und Stabilität

Versuchs-Datum:	18. April 2012
Gruppennummer:	8
Gruppenmitglieder:	Domenico Paone Patrick Küssner Michael Schmid
Assistent/-inn:	Frau Durmus

Inhaltsverzeichnis

1 Theorie	3
1.1 Proteine	3
1.2 Enzyme	3
1.3 Physiologische Bedeutung der Lactathydrogenase	3
1.4 Grundlagen der Reaktionskinetik	3
2 Aufgabenstellung	4
3 Versuchsaufbau	4
4 Versuchsdurchführung	4
4.1 Allgemeine Vorbereitung:	5
4.2 Versuch mit intakter LDH	5
4.3 Versuch mit erhitzter LDH	5
5 Beobachtungen	6
6 Reaktionsgleichung	6
7 Versuchsauswertung	6
8 Zusatzaufgaben	9
8.1 Theoretischer Teil	9
8.2 Messergebnisse	10
8.3 Reaktionsgleichungen	11

1 Theorie

1.1 Proteine

Proteine sind wichtige Funktionseinheiten der Zelle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind und über Peptidbindungen verkettet sind. Aminosäuren besitzen Seitenketten, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (zum Beispiel sauer, basisch...). Proteine nehmen schraubenartige oder geschichtete Strukturen an, wodurch sie eine genau definierte dreidimensionale Struktur aufweisen. Diese Struktur nennt man Nativstruktur und sorgt dafür, dass Proteine nur in dieser Struktur ihre biologischen Aufgaben erfüllen können. Dennoch sind Proteine relativ labil, wodurch ihre native Struktur leicht zerstört werden kann und ihre biologische Aktivität verloren geht.

1.2 Enzyme

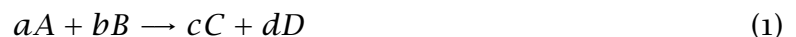
Enzyme sind Proteine die als hocheffiziente Biokatalysatoren in der Zelle wirken (sie beschleunigen chemische Reaktionen und ermöglichen so die Umsetzung von Stoffen). Neben Peptidketten enthalten sie oft Cofaktoren (komplexe organische Moleküle oder Metallionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+}) die für den Katalysemechanismus wichtig sind. Dauerhaft an das Enzym gebundene Cofaktoren bezeichnet man als prosthetischen Gruppen, für kurze Zeit gebundene als Coenzyme. Enzyme sind wichtig für den Metabolismus und Regulation zellulärer Prozesse.

1.3 Physiologische Bedeutung der Lactathydrogenase

Die Lactathydrogenase ist ein sehr wichtiges Enzym für den Energiestoffwechsel in den Zellen, da sie die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und die Reduktion von NAD^+ zu $NADH$ katalysiert. Dieser Vorgang findet in der Leber statt (beispielsweise in der Regenerationsphase nach dem Sport).

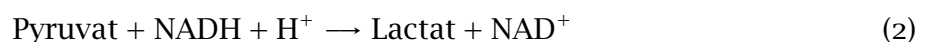
1.4 Grundlagen der Reaktionskinetik

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit definiert und ist ein Maß für den zeitlichen Ablauf von chemischen Reaktionen. Bei einer Reaktion vom Type:



nimmt die Konzentration der Stoffe A, B während der Reaktion ab und die Konzentration der Stoffe C, D zu. Da es im Prinzip egal ist welchen Stoff man betrachtet (Abnahme von A, B oder Zunahme von C, D) wählt man den Stoff, dessen Konzentration am einfachsten zu bestimmen ist.

Reaktionsgeschwindigkeit oder Reaktionsrate r wird als die Änderung der Konzentrationsrate mit der Zeit definiert. Im Praktikumsversuch wird dies bei folgender Reaktionsgleichung genutzt:



Der Reaktionsverlauf wird mit Hilfe eines Photometers durch die Reaktion von $NADH$ zu NAD^+ bestimmt. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird anhand der Änderung der

Extinktion gemessen. Es gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon \cdot d \cdot c \quad (3)$$

I_1 Intensität des austretenden Lichtes, I_0 Intensität des eingestrahlt Lichtes, ϵ Extinktionskoeffizient, d Schichtdicke der Lösung, c Konzentration des absorbierenden Stoffes. Mit der Steigung der Messkurve kann man die Geschwindigkeit v der Abnahme von NADH bestimmen. Dieses direkte Maß für die vorhandene Enzymmenge wird als Volumenaktivität A_v bezeichnet.

(3) nach c auflösen:

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

somit folgt für $v = \frac{dc}{dt}$

$$v = A_v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d}$$

Da aber die Enzymeaktivität der Probe gesucht ist muss die Verdünnung mit eingerechnet werden (V_T : Testvolumen, V_P : Probevolumen):

$$A_v = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d} \cdot \frac{V_T}{V_P}$$

2 Aufgabenstellung

Aufgabe des Versuches ist es, die thermische Zersetzung der LDH und die damit zusammenhängende Aktivität auf die Reduktion von Pyruvat zu Lactat zu untersuchen.

3 Versuchsaufbau

Der Versuch besteht aus zwei wichtige Teilen. Zum einen muss man den LDH-Aktivitätstest durchführen, zum anderen ist es notwendig die LDH thermisch zu denaturieren. Um die Aktivität des Enzyms zu untersuchen benötigt man einen Spektrometer, der auf den Nullwert geeicht ist und im abs-Modus(absorbance) betrieben wird. Als erstes misst man die Extinktion der Pyruvat-NADH-Lösung. Durch Zugabe de LDH-Probeflösung startet die Reaktion, wodurch die Extinktion abnimmt. Die Abnahme der Extinktion wird über den ganzen Versuch mit Hilfe des Schreibers verfolgt. Erhitzt wird die LDH-Lösung in einem 55°C heißen Thermoblock. Dadurch verliert das Enzym seine Nativstruktur und wird inaktiv.

4 Versuchsdurchführung

Der eigentliche Versuch besteht in der Regel aus zwei wichtigen Schritten, nämlich das Messen der Reaktionsaktivität das LDH (Lactatdehydrogenase) im intakten Zustand (ca. Raumtemperatur, da es zuvor auf Eis aufbewahrt wird) und im erhitzten Zustand (55°C).

4.1 Allgemeine Vorbereitung:

Um den Versuch überhaupt beginnen zu können, wird als erstes durch Zugabe von 67ml Phosphatpuffer (pH 7.2) eine NADH-Lösung der Konzentration $11 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ und Pyruvat-Lösung der Konzentration $2.75 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ hergestellt. Es wird eine Masterlösung aus Pyruvat-,NADH- und Pufferlösung hergestellt Diese Lösung dient einerseits dazu, möglichst identische Messungen zu erhalten, also auch die Küvetten mit den gleichen Stoffinhalt zu erhalten. Dazu füllt man 9.4 ml Phosphatpuffer in einen dafür geeigneten Behälter und gibt jeweils $200\mu\text{l}$ der Pyruvatlösung und der NADH-Lösung dazu. Die so hergestellte Masterlösung wird anschließend in 9 Küvetten gefüllt (jeweils $980\mu\text{l}$ je Küvette). Das Spektrometer wird auf *abs*-Modus eingestellt und an einen Schreiber angeschlossen, so wird die Extinktion gemessen und gleichzeitig am Schreiber ausgewertet.

4.2 Versuch mit intakter LDH

Der Versuch beginnt, indem man eine gefüllte Küvette in das Spektrometer einlegt und Schreiber und Spektrometer gegen Luft eicht. Ist dies getan, nimmt man die Küvette, fügt $20 \mu\text{l}$ LDH-Probelösung hinzu, vermischt die Lösung gut und stellt sie in das Spektrometer zurück. Anschließend schaltet man den Schreiber ein, damit er zu zeichnen beginnt und stellt das Spektrometer auf *rate*-Modus. Man erkennt, das der Schreiber beginnt eine Gerade zu zeichnen, hat diese etwas mehr als die Höhe von 6 cm erreicht, bricht man den Versuch ab und kann die gezeichnete Kurve ausmesse und die Enzymaktivität über die Steigung zum Zeitpunkt $t = 0$ errechnen.

4.3 Versuch mit erhitzter LDH

Die LDH wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 55°C in einen Thermoblock gestellt. Nach jeweils 8 verschiedenen Zeitpunkten in einem Gesamtzeitintervall von 30 min nimmt man jeweils $20 \mu\text{l}$ der immer wärmer werdenden LDH heraus und gibt sie in immer eine neue Küvette, und wiederholt den selben Schritt wie oben beschrieben (Spektrometer eichen, Schreiber eichen, LDH in die Küvette, gut mischen, Kurve zeichnen lassen). Man erhält so verschiedene Geraden mit unterschiedlicher Steigung. Im Idealfall nimmt die Steigung nach jedem zu messenden Zeitpunkt zu, bis am Schluss nur noch eine parallele zur y-Achse (keine Enzymaktivität) übrig bleibt. Man erhält so insgesamt neun verschiedene Enzymaktivitäten die in ein Diagramm der Auftragung gegen Zeit und ein Diagramm der Auftragung $\log(\text{Aktivität})$ gegen Zeit eingetragen werden. Beim ersten Diagramm versucht man eine Approximation der Messergebnisse durch eine Logarithmusfunktion zu bestimmen und im Zweiten Diagramm eine Approximation mit einer Geraden. Mit der Logarithmusfunktion kann man so auch die Halbwertszeit mit der Formel:

$$T_{1/2} = \left| \frac{\ln(2)}{k} \right| \quad (4)$$

errechnen. Die Variable k ist dabei die Steigung der Geraden.

5 Beobachtungen

Es kann beobachtet werden, wie die Extinktion der Lösung sinkt sobald das LDH hinzugefügt wird. Sehr interessant ist, dass die zwei Lösungen welche einzeln hergestellt werden, keine vernünftigen Messwerte liefern (siehe Küvetten 4 und 5). Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um Pipettierfehler handelt. Deshalb sind diese Messwerte unbrauchbar für die Versuchsauswertung.

Fehlerhafte Werte sind im Allgemeinen zurückzuführen auf Messfehler des Spektrometers bei nicht gerechter Handhabung (die Küvette wird nicht richtig in die Halterung eingeführt) oder die Ungenauigkeit des Schreibers selbst, der plötzlich anfängt die Messkurven zu verfälschen

6 Reaktionsgleichung

(siehe Abschnitt: Zusatzaufgaben)

7 Versuchsauswertung

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$A_v = \frac{\Delta E}{\Delta t \epsilon d} \cdot \frac{V_T}{V_P} \quad (5)$$

Dabei ist ΔE die Extinktionsänderung, Δt die Zeitänderung in min, d der Lichtweg durch die Küvette, ϵ der Extinktionskoeffizient, V_T das Testvolumen und V_P das Probevolumen. Folgende Werte werden für die Variablen verwendet:

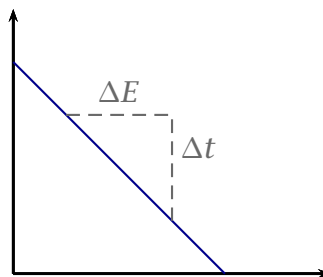
$$V_T = 1000 \mu\text{l}$$

$$V_P = 20 \mu\text{l}$$

$$\epsilon = 3.3 \frac{\text{ml}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

ΔE erhält man wenn man den gemessenen x-Anteil der Steigung der gezeichneten Geraden mit 0.05 multipliziert, Δt wurde von uns immer mit 1 min gleich gewählt. Die Skizze soll ein Beispiel solch eines vom Schreiber gezeichneten Graphen mit einem eingezeichneten Steigungsdreieck darstellen.



Beispielrechnung

Aus der Messkurve sind folgende Werte abzulesen (Küvette 1):

$$\Delta E = 3.2(\text{cm}) \cdot 0.05$$

$$\epsilon = 3.3$$

$$V_1 = 1000\mu\text{l}$$

$$\Delta t = 1\text{min}$$

$$d = 1\text{cm}$$

$$V_2 = 20\mu\text{l}$$

Einsetzen in die Gleichung (5) liefert:

$$\begin{aligned} A_v &= \frac{\Delta E}{\Delta t \epsilon d} \cdot \frac{V_T}{V_P} \\ &= \frac{3.2 \cdot 0.05}{1 \cdot 3.3 \cdot 1} \cdot \frac{1000}{20} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{ml}} \\ &= 2.42 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{ml}} \end{aligned}$$

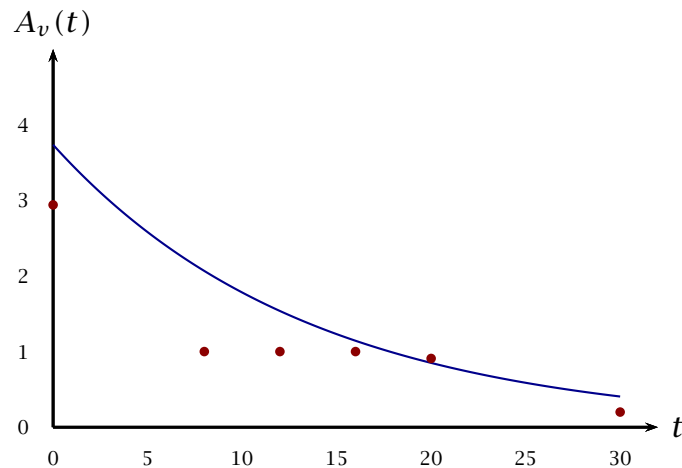
Alle in der Tabelle aufgeführten Werte lassen sich mit der oben genannten Formel (5) und der aus den Steigungsdreiecken der unterschiedlichen Messgraphen abgelesenen Werten errechnen.

Küvettennummer	Zeit (wie lange LDH erhitzt wurde) in min	$\Delta E \cdot 0.05$	Δt in min	A_v in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{ml}}$
1	$t = 0$	-	-	-
2	$t = 0$	$3.2 \cdot 0.05$	1	2.42
3	$t = 0$	$3.9 \cdot 0.05$	1	2.95
4	$t = 2$	$0.9 \cdot 0.05$	1	1.364
5	$t = 5$	-	-	-
6	$t = 8$	$2.5 \cdot 0.05$	1	1.89
7	$t = 12$	$2.5 \cdot 0.05$	1	1.89
8	$t = 16$	$2.3 \cdot 0.05$	1	1.742
9	$t = 20$	$1.2 \cdot 0.05$	1	0.909
10	$t = 25$	$3.5 \cdot 0.05$	1	2.61
11	$t = 30$	$0.2 \cdot 0.05$	1	0.151

Aktivitäts-Zeit-Diagramm:

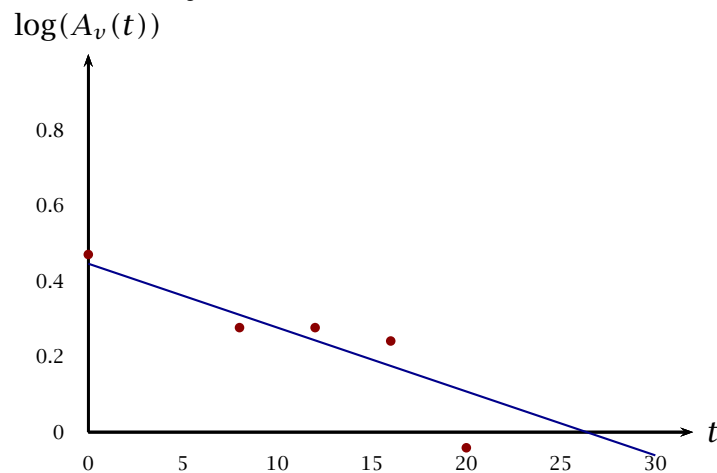
Die ermittelten Werte werden nun in ein Diagramm eingetragen und eine Rekursionskurve ermittelt. Im ersten Diagramm wird mit einer Exponentialfunktion $f(t) = ae^{bt}$ eine Rekursionskurve ermittelt (z.B. mit Excel oder GnuPlot). Zum ermitteln der Rekursionskurve wurden aber nur die Küvetten 3, 6, 7, 8, 9 und 11 verwendet, die anderen Messergebnisse konnten aufgrund verschiedener Probleme (technische und menschliche) nicht verwendet werden. Die Formel der ermittelten Rekursionkurve lautet:

$$f(t) = 3.735 \cdot e^{-0.074 t}$$



Für das zweite Diagramm benötigt man die $\log(A_v(t))$ Werte und legt dieses mal eine Rekursionsgerade durch die aufgetragenen Punkte. Zum ermitteln der Rekursionsgeraden wurden aber nur die Küvetten 3, 6, 7, 8, 9 und 11 verwendet. Folgende Rekursionsgerade wurde ermittelt:

$$f(t) = -0.0169 t + 0.4455$$



Mit der Steigung der Geraden ($k = -0.0169$) und (4) lässt sich somit auch die Halbwertszeit bestimmen:

$$\begin{aligned} T_{1/2} &= \left| \frac{\ln(2)}{k} \right| \\ &= \left| \frac{\ln(2)}{-0.0169} \right| \\ &= 41.014 \text{ min} \end{aligned}$$

8 Zusatzaufgaben

8.1 Theoretischer Teil

Wie sind Proteine aufgebaut

Proteine bestehen aus mehreren Aminosäuren. Diese sind über Peptidbindungen zu Ketten verknüpft. Die Proteinstruktur lässt sich auf 4 Betrachtungsebenen beschreiben.

- Primärstruktur:
Die Sequenz der Aminosäuren in einem Protein wird durch die DNS definiert.
- Sekundärstruktur:
Im wässrigem Medium entfalten sich die Peptidketten in definierte Strukturen (α -Helix oder β -Faltblätter).
- Tertiärstruktur:
Genau definierte Dreidimensionale Struktur. Hydrophober Bereich nahe im Kern und polare, geladene Gruppen sind in Richtung Lösungsmittel exponiert und vermitteln Bindungen: (Ionische Bindung, Van-Der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken). Sie dienen zur Stabilisierung der Peptidketten.
- Quartärstruktur:
Peptidketten können sich zu Proteinkomplexen zusammen lagern.

Was ist ein Enzym

Enzyme sind Proteine, die in den Zellen als hocheffiziente Biokatalysatoren wirken. Also die Chemischen Vorgänge beschleunigen.

Welche Bedingungen sind von Bedeutung für die Stabilität eines Proteins?

Proteine besitzen eine Nativstruktur, die relativ instabil ist. Unter bestimmten Bedingungen zum Beispiel durch pH-Wert-Veränderungen, Temperaturänderungen, mechanische Kräfte, ... kann diese native Struktur zerstört werden.

Stabilisiert wird die Nativstruktur durch VAN-DER-WAALS-Kräfte, Wasserstoffbrücken

Reaktion erster Ordnung

Bei einer Reaktion 1.Ordnung handelt es sich um einen katalytischen Zerfallsprozess. Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des zerfallenden Stoffes abhängig.

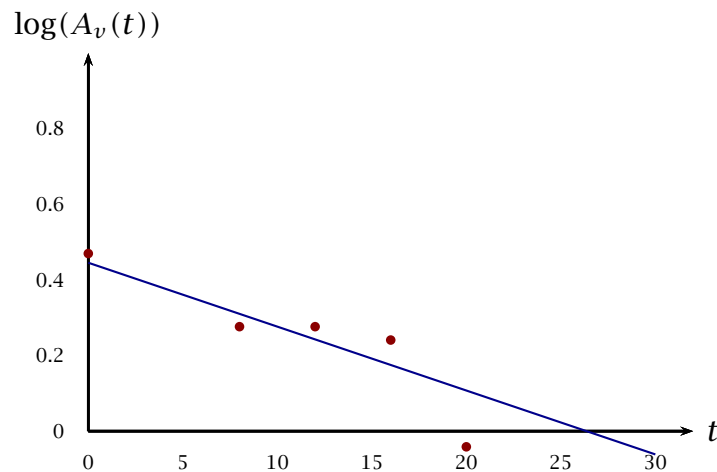
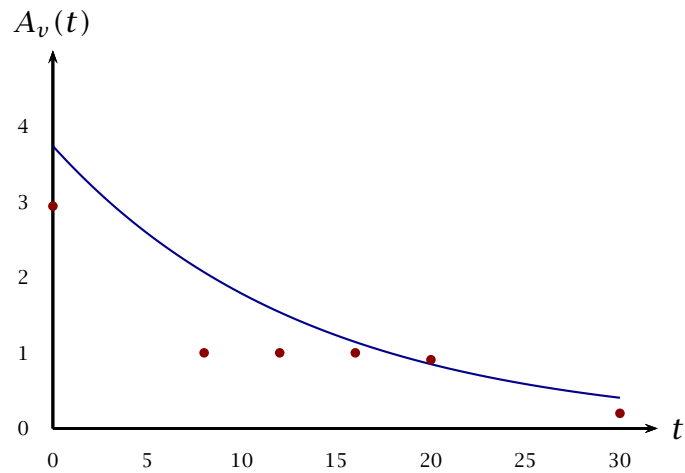
Aktivierungsenergie:

Die Aktivierungsenergie ist die Energie, die benötigt wird, damit eine chemische Reaktion anläuft.

Katalysator

Stoff, der in der Lage ist die Aktivierungsenergie zu verringern und durch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Der Katalysator kommt immer unverändert aus der Reaktion hervor.

8.2 Messergebnisse

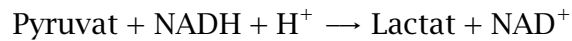


Halbwertszeit der Denaturierung:

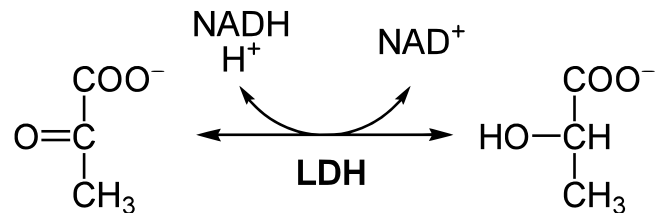
$$\begin{aligned} T_{1/2} &= \left| \frac{\ln(2)}{k} \right| \\ &= \left| \frac{\ln(2)}{-0.0169} \right| \\ &= 41.014 \text{ min} \end{aligned}$$

Diesen errechneten Wert sollte man jedoch eher kritisch hinterfragen, da eine gewisse Anzahl von Messfehlern ihn stark verfälschen können, was hier vermutlich zutrifft.

8.3 Reaktionsgleichungen



Strukturformel:



Oxidationszahlen

Linke Seite	Rechte Seite
O = -2	2 · H = 2 · (+1)
C = +2	O = -2
-	C = 0

Bei der rechten Seite sind die H's an der CH-Gruppe und HO-Gruppe gemeint. C hat vor der Reaktion die Oxidationszahl +2 und nach der Reaktion die Oxidationszahl 0, d.h. die Oxidationszahl verkleinert sich. Es handelt sich also um eine Reduktion. Links ist das Pyruvat, das Anion der Brenztraubensäure, rechts das Lactat, das Anion der Milchsäure.