

Kemi GFx- Laboratorieøvelse nr. 9
Ulla Christensen, Kemisk Laboratorium IV

ENZYMKINETIK

Formål:

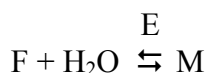
Steady state hastighedsmålinger og kinetisk analyse til undersøgelse af enzymkatalyseret reaktion. Der gøres rede for forudsætningerne for Michaelisligningen. De to sæt V_{\max} og K_m parameter-værdier, samt ligevægtskonstanten bestemmes for fumarat - L-malat omdannelsesreaktionen katalyseret af enzymet, fumarase.

Referencer:

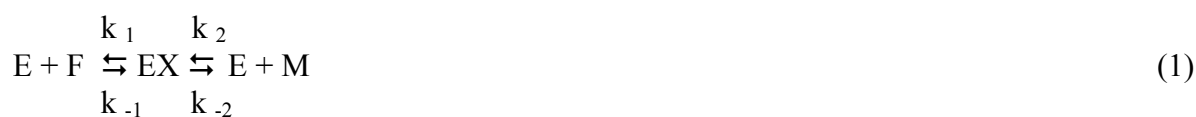
P.W. Atkins & J. de Paula: Physical Chemistry, 2002 (7. udg.) s. 909-912. Denne tekst er imidlertid ret lemfældig, derfor gives en forholdsvis grundig redegørelse her:

Teori:

Enzymer er proteiner med katalytisk funktion. I øvelsen undersøges enzymet, fumarase, som katalyserer en af reaktionerne i citronsyre cyclus, addition af vand til dobbeltbindingen i fumarat med resulterende dannelse af L-malat (æblesyre):



Den mest enkle model for en enzymkatalyserede reaktion antager at et enkelt enzymsubstrat kompleks, EX, er tilstrækkeligt til at beskrive en enzymkatalyseret reaktion, her:



EX er en slags sort kasse, hvor omdannelsen fra substrat til produkt foregår.

Modellen tager kun to reaktionstrin i betragtning, dannelse af et enzymsubstrat kompleks, EX, og det hastighedsbestemmende (langsomste) trin for omdannelsen af EX til enzym og produkt. En simplificeret beskrivelse af enzyms funktion som katalysatorer, siger at enzymet er i stand til at stabiliserer transition-state for substratets omdannelse til produkt (EX^\ddagger) hvorved aktiveringsenergien bliver mindre end for den ikke-katalyserede process. Da dette gælder begge veje er det naturligt at sige at enzymerne katalyserer processerne lige godt begge veje. Det betyder naturligvis ikke at reaktionshastighederne er ens begge veje, de vil afhænge af ligevægtens beliggenhed.

Her måles koncentrationen af fumarat som funktion af tiden for en række koncentrationer af

fumarat henholdsvis L-malat efter tilsætning af fumarase i fravær af det andet substrat.

Initialhastighederne, v , defineret som koncentrationsændringen pr. tidsenhed til tiden næsten nul, betsemmes. Michaelis-ligningen fittes til sammenhørende værdier af initialhastigheder og henholdsvis koncentrationen af fumarat og L-malat, så resultaternes overensstemmelse med Michaelisligningen kan undersøges.

Model 1, (såvel som mere realistiske modeller, der indeholder flere reaktionstrin), fører under visse betingelser til Michaelis hastighedsligningen.

Kravene er, at:

1. eksperimenterne udføres under betingelser, hvor der kan ses bort fra den tilbagegående reaktion (her: $k_{-2}[E][M] = 0$), når $[M]=0$ og $k_{-1}[E][F]=0$, når $[F] = 0$).

Dette opfyldes ved at sørge for at beregningerne baseres på den første del af de målte kurver, (substratkoncentration som funktion af reaktionstid), hvor der kun er dannet meget lidt af den reaktant som principielt skal have koncentrationen nul. Kurvens hældning i denne initiale fase, kaldes initialhastigheden, v , og er den hastighed Michaelis ligningen gælder for.

2. enzymkoncentrationen, $[E_0]$, skal være meget mindre end (negligibel i forhold til) substratkoncentrationen, $[S_0]$, hvor 0 står for i alt tilsat eller oprindelig.

I følge Model 1 haves:

$$d[EX]/dt = k_1[E][F] - k_{-1}[EX] - k_2[EX] + k_{-2}[E][M] \quad (2)$$

hvis f. eks. $[M]$ er nul fås:

$$d[EX]/dt = k_1[E][F] - (k_{-1} + k_2)[EX] = k_1[E_0][F] - (k_1[F] + k_{-1} + k_2) [EX]. \quad (3)$$

$$\text{idet } [E_0] = [E] + [EX], \quad (4)$$

og $[E]_0 \ll [F]_0$, vil $[F]$ kunne forblive næsten konstant ($= [F]_0$) i forhold til $[EX]$ i begyndelsen af reaktionsforløbet. Med konstant $[F]$ haves en simple løsning på ligning (3) :

$$[EX] = [k_1[E_0][F]/(k_1[F]+k_{-1}+k_2)][1-\exp(-(k_1[F]+k_{-1}+k_2) t)] \quad (5)$$

hvor t er reaktionstiden.

For $[M] = 0$ og ved $[F] \cong [F]_0 \gg E_0$ forsvinder eksponentialleddet meget hurtigt. Dette har vist sig at gælde i almindelighed for enzymkatalyserede reaktioner, idet den tilsvarende

hastighedskonstant, k (her: $= k_1[F] + k_{-1} + k_2$), uanset størrelsen af $(k_{-1} + k_2)$, sjældent kan bringes ned under $\text{ca. } 10^3 \text{ s}^{-1}$ selv ved små substratkoncentrationer, idet $[E]_0 \ll [S]_0$ jo skal overholdes og $[E]_0$ må have en vis størrelse for at give målelige hastigheder.

Efter nogle millisekunder (eller mindre) bliver situationen så:

$$[EX] = k_1[E_0][F] / (k_1[F] + k_{-1} + k_2) = [E_0] / (1 + (k_{-1} + k_2) / k_1[F]) \quad (\text{Steady-state}) \quad (6)$$

Michaelis-konstanten K_m defineres, som $K_m = [E][F] / [EX]$ ved steady-state, alment for et substrat S: $K_m = [E][S] / [EX]$.

$[S] / K_m$ -forholdet angiver altså steady-state-forholdet mellem $[EX]$ og $[E]$.

Af (4) ses at

$$[EX] / [E]_0 = [EX] / ([E] + [EX]) = 1 / ([E] / [EX] + 1) = 1 / (K_m / [S] + 1), \quad (7)$$

hvilket sammenholdt med (6) fører til (for den simple Model 1), at K_m bliver:

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1.$$

Forbliver $[S]$ rimelig konstant vil steady-state forholdet opretholdes og forbruget af $[S]$ i et tidsinterval vil være lig med produktionen af $[P]$. Så længe $[S] \sim [S]_0$ er betingelsen $[P] \sim 0$ også opfyldt, og reaktionens initial steady-state hastighed vil da være, v :

$$v = -d([S]) / dt = k_2 [EX] \quad (8)$$

eller (i følge (7)) Michaelis ligningen::

$$v = k_2[E]_0 / (1 + K_m / [S]) \quad (9)$$

idet grænseværdien for initial steady-state hastigheden for $[S]$ gående mod uendelig, hvor $[E]_0$ er grænseværdien for $[ES]$, kaldes den maksimale hastighed, er $V_{\max} = k_2[E]_0$.

De to parametre: den maksimalt opnåelige hastighed V_{\max} og Michaelis-konstanten K_m karakteriserer den enzymkatalyserede reaktions initialhastighed som funktion af substratkoncentrationen, $[S]$, ved de nævnte eksperimentelle betingelser.

Bemærk at K_m må have samme enhed som substratkoncentrationen og at V_{\max} må have enheden M/s.

De to parametre kan bestemmes ud fra en række bestemmelser af v ved forskellige kendte $[S]$.

Eksperimentelt:

!! Husk i også skal sætte en måling over til øvelse 10

Apparatur og reagenser:

Spektrofotometer med arbejdsstation (vejledning foreligger på arbejdsstedet).

Termostat, reagensglas, doseringspipetter, 1 cm semimikrokuvetter..

En 10.0 mM stamopløsning af fumarsyre og en 10.0 mM af L-malat, begge i 0.05M phosphatpuffer, pH = 7.0 udleveres.

Ved passende fortynding i 10 ml plastrør fremstilles en række **fumarsyreopløsninger**:

[F](mM) 0.25 - 0.50 - 1.00 - 2.00 - 4.00, og

L-æblesyreopløsninger:

[M](mM) 0.625 - 1.25 - 2.5 - 5.0 - 10.0(den udleverede).

Enzymopløsning: der udleveres en færdiglavet opløsning, der skal opbevares isafkølet. Den er fremstillet ud fra en suspension af 2.2 mg fumarase/ml, af hvilken en prøve på 20 μ l er udtaget og fortyndet med 1.50 ml af den ovennævnte phosphatpuffer.

Målinger:

Som nævnt undersøges her både kinetikken for den enzymkatalyserede omdannelse af fumarat, F, til L-malat (æblesyre), M, - og den modsatte reaktion.

Reaktionerne følges spektrofotometrisk ved bølgelængden 270 nm, hvor fumarsyre (men ikke æblesyre) absorberer. Absorbansen, A_{270} ($= -\log_{10}(I/I_0)$, hvor I_0 og I er lysintensiteten før og efter passage), er ifølge Lambert-Beer's lov en lineær funktion af de absorberende stoffers

$$A_{270} = \sum_B \epsilon_B [B] l = \epsilon_{270,F} [F] l \quad (10)$$

koncentrationer,

idet den molære absorption ϵ_{270} som sagt er nul for æblesyre og lysvejen er 1 cm.

Først bringes spektrofotometret til at vise $A = 0$ med ren pufferopløsning. Dernæst fremstilles en kalibreringskurve, idet absorbansen måles i kuvette med lysvej på 1 cm for rækken af opløsninger med kendt fumarsyreindhold. Absorbansen afbildes som funktion af koncentrationen af fumarsyre og hældningen, $\epsilon_{270,F}$, bestemmes ved lineær regression, så absorbans-værdier (og ændringer i absorbans-værdier) kan omregnes til substratkoncentrationer i følge (10) ved division med $\epsilon_{270,F}$.

Hastighedsforsøgene er tilrettelagt sådan, at der til lige store prøver af rækken af substratopløsninger (enten fumarsyre eller æblesyre) sættes samme (lille) dosis enzym, hvorefter absorbansen omgående registreres som funktion af tiden i 90 s.

Der måles initialhastighed to gange for hver substratkoncentration ved en og samme enzymkoncentration. Med pipetter overføres 1500 μ l substratopløsning og 50 μ l enzymopløs-

ning til et reagensglas, som rystes på mixer 2-3 s. **Umiddelbart efter** (det skulle gerne være initial steady-state hastigheden, der måles) overføres blandingen til kuvetten, der indsættes i spektrofotometret, samtidig med at målingen startes.

Ved at bestemme tangenthældningen $(dA/dt)/\epsilon_F = - (d[S]/dt)_{t=0}$ til tiden nul, (f.eks. 0-20s) kan man (via kalibreringskurven) beregne initialhastigheden. Husk korrekt enhed.

Med de kendte værdier af $[S]_0$ og de fundne initialhastigheder $v = -d[S]/dt$ bestemmes de kinetiske parametre ud fra et direkte fit til Michaelis ligningen ved anvendelse af et program f. eks. "Grafit" og grafen, $v = f([S])$, og de resulterende parameterverdier for hvert af substraterne udskrives.

Rapporten skal

- i) i **indledningen** gøre rede for øvelsens formål. (Tegn de to substrater)
- ii) i **teoriafsnittet** gøre rede for hvilke eksperimentelle betingelser, der er en forudsætning for at Michaelis ligningen kan gælde. Det skal fremgå at steady state ikke nødvendigvis opnås ligegyldigt hvilke eksperimentelle forhold der benyttes.
- iii) Hvis vejledningen vedlægges som bilag kan afsnittet eksperimentelt blot henvise til denne, bortset fra at eventuelle faktiske afvigelser i det udførte arbejde beskrives. Hvor lang måletid er anvendt til hastighedsbestemmelserne?
- iv) i **resultatafsnittet**, indeholde henvisninger og kommentarer til kalibreringskurven, $A_{270} = f([F])$ og de to hastighedsgrafer, som alle skal vedlægges. Den resulterende $\epsilon_{270,F}$ - værdi angives tydeligt \pm usikkerhed. Der skal laves en Tabel over de to sæt opnåede K_m og V_{max} - værdier incl. usikkerhed med korrekt angivelse af enheder. Udfra de kinetiske parameterverdier og Michaelis ligningen angives for $[F]_0 = 1 \text{ mM}$, hvor meget substrat, der blev brugt på 1 min, når hastigheden antages at have været konstant så længe. Hvor meget blev brugt i det tidsinterval hastigheden er baseret på? Holder forudsætningerne? Kommenter resultatet! Hvis enzymet var blevet fortyndet 10 gange for meget, hvor meget substrat ville da blive omsat? Kommenter resultatet! Ved antagelse om enzymkoncentrationer som angivet i øvelsvejledningen; Hvad bliver k_2 for de to reaktioner?
- v) Ligevægtskonstanten for fumarsyres omdannelse til æblesyre kan beregnes, ud fra

$$K_{eq} = [M]/[F] = k_{-1}k_2/k_1k_2 = V_{max,F}K_{M,M} / V_{max,M}K_{M,F}$$

K_{eq} -værdien og dens usikkerhed beregnes ud fra jeres egne resultater.

Usikkerheden, $\sigma_{K_{eq}}$, beregnes ved hjælp af den sidste formel i formel 13 i afsnittet om

måleusikkerhed forrest i øvelsesvejledningen til dette kursus (evt. først for de to V_{\max}/K_M -forhold og derefter for forholdet mellem disse, hvilket faktisk ender med:

$$(\sigma_{K_{eq}}/K_{eq})^2 = (\sigma_{V_{\max,f}}/V_{\max,F})^2 + (\sigma_{K_{m,m}}/K_{M,M})^2 + (\sigma_{V_{\max,m}}/V_{\max,M})^2 + (\sigma_{K_{m,f}}/K_{M,F})^2).$$

Og altså:

$$(\sigma_{K_{eq}})^2 = K_{eq}^2 [(\sigma_{V_{\max,f}}/V_{\max,F})^2 + (\sigma_{K_{m,m}}/K_{M,M})^2 + (\sigma_{V_{\max,m}}/V_{\max,M})^2 + (\sigma_{K_{m,f}}/K_{M,F})^2]$$

Husk at tage kvadratroden.