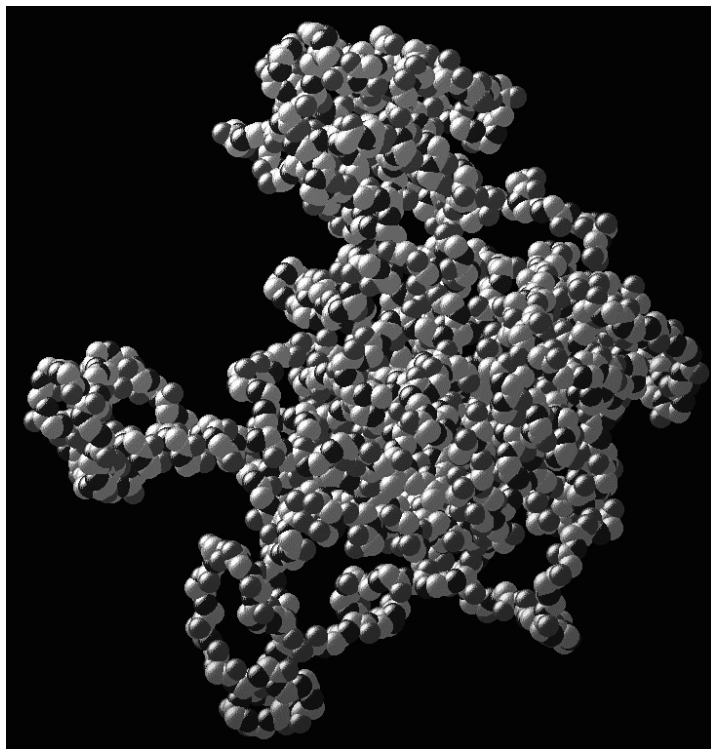


Enzympräparation: *Katalase*



Januar 2000

Inhalt

Zusammenfassung und grundsätzliche Theorie.....	3
Reaktionzyklus der Katalase.....	3
Charakteristika.....	4
Theorie der angewandten Methodik.....	5
Michaelis-Menten Kinetik.....	5
Inhibitoren.....	7
Reinheitzahl nach Theorell.....	8
Gelelektrophorese.....	8
Elektrophorese.....	8
Gelelektrophorese.....	9
Polyacrylamidelektrophorese.....	9
Röhrchengel.....	9
Flachbettgel.....	9
SDS-Page.....	10
Nachweis von SH-Gruppen mit Ellman´s Reagen.....	10
Gelchromatografie (Gel- und Anionenaustauscher Säulen).....	11
Gelfiltration mit Sephacryl S-30.....	11
Anionenaustauschchromatografie mit DEAE-Sepharose CL-6B.....	11
Durchführung und Messergebnisse.....	13
Fließschema.....	13
Messergebnisse.....	15
Präparation der Katalase.....	15
Kinetische Charakterisierung.....	16
Absorptionsspektren.....	19
Reinheitzahl nach Theorell.....	23
Bestimmung von SH-Gruppen mit Ellman-Reagenz.....	23
Proteinbestimmung über UV-Extinktion.....	25
Abschließende Bewertung.....	25
Anhang 1: Literaturliste.....	26
Anhang 2: Dokumentation der Gelelektrophoresen.....	26

Zielsetzung:

In diesem Versuch geht es darum, zu demonstrieren, wie man ein Enzym präpariert und charakterisiert. Dazu werden verschiedene Methoden angewendet, wie z.B. Zentrifugation, Fällung, Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie, Michaelis-Menten-Kinetik, SH-Gruppen-Bestimmung etc.

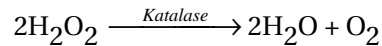
Die Michaelis-Menten-Kinetik lieferte einen K_m -Wert von 0.01 mmol/ml.

Die Inhibierung mit Cyanid konnte als kompetitive Hemmung charakterisiert werden.

Die Anzahl der SH-Gruppen als 962 bestimmt – dieser Wert ist allerdings höchst fraglich.

Zusammenfassung und grundsätzliche Theorie

Das Enzym Katalase (Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase, EC 1.11.1.6) katalysiert die Reaktion:

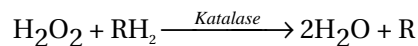


Diese katalytische Aktivität kann in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen sowie äroben Mikroorganismen (bes. in den Peroxisomen der Leber und Erythrocyten) nachgewiesen werden, wobei Katalase zu den Enzymen mit der höchsten molaren Aktivität zählt. Bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen wirkt sie als Peroxidase

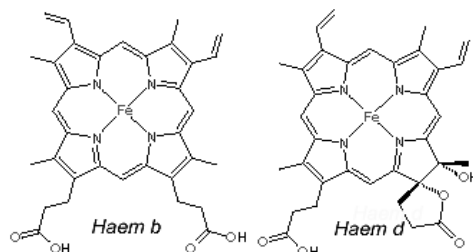
Wie Peroxidase ist Katalase ein mit H_2O_2 Übergangszustände bildendes Hämoprotein, wobei H_2O_2 als Substrat sowie als Wasserstoffakzeptor (d.h. es werden keine Radikale frei) verwendet wird (wohingegen Peroxidase einen separaten Wasserstoffakzeptor benötigt). Daher werden Katalase und Peroxidase (als keimabtötendes Reagens) kommerziell oft zusammen verwendet, wie z.B. zum Entfernen der H_2O_2 aus pasteurisierter Milch (Enzymaktivität von Milchsäurebakterien mit häm- oder manganhaltiger Katalase).

Im Organismus spielt Katalase eine wichtige Rolle beim Abbau des Zellgiftes H_2O_2 , welches z.B. bei der Fettsäureoxidation in den Peroxisomen (Verkürzung der Fettsäuren zu C8 oder länger) als Nebenprodukt anfällt, sowie bei der DNA-Synthese (Ribonukleotid-Reduktase setzt indirekt H_2O_2 frei). In Pflanzen dient es zum Abbau des bei der Photorespiration freiwerdenden H_2O_2 .

Darüber hinaus ist Katalase in der Lage, weitere Giftstoffe abzubauen (als peroxidative Reaktion, s.o.), wie Phenole, Ameisensäure, Formaldehyd und Alkohole (RH_2 -Verbindungen):

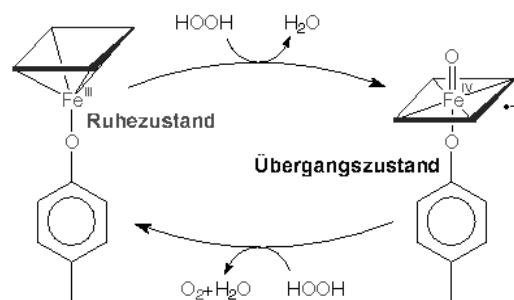


In den meisten Katalasen fungiert *Häm b* als prosthetische Gruppe, bei einigen Pilz- und Bakterien-Katalasen jedoch auch *Häm d*.



Auffällig ist die Ähnlichkeit zum Hämoglobin, mit dem Unterschied, daß das distale Histidin des Hämoglobins durch ein Tyrosin ersetzt ist.

Reaktionszyklus der Katalase

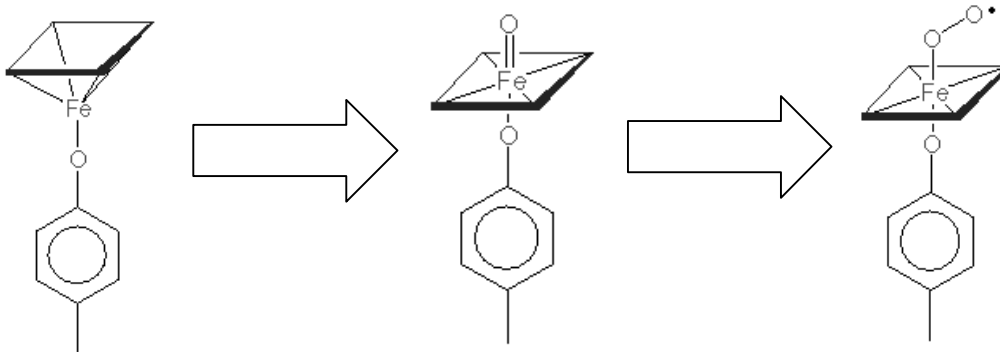


Der Reaktionszyklus beginnt mit der reversiblen Oxidation eines Fe^{III} -Atoms (aktives Zentrum) zum Intermediat I (Fe^{IV} enthaltendes Porphyrin π -Kation) unter Freisetzung eines Wasser-Moleküls.

Bei der irreversiblen Wiederherstellung des Ruhezustandes wird ein weiteres Wasserstoffperoxid zu Wasser und einem Sauerstoff-Molekül umgesetzt.

Der Phenolring unterstützt die Redoxvorgänge am Eisen und stabilisiert die Übergangszustände:

Die Konformationsänderung im Übergangszustand ist notwendig, da das H_2O_2 im Ruhezustand keinen direkten Zugang zum aktiven Zentrum hat (durch Histidin 74 und Asparagin 147 versperrt). Das H_2O_2 überträgt ein Proton auf das (basische) Histidin, durch dessen Bindung der Eisenkomplex kurzzeitig reduziert wird. Das freiwerdende Proton reagiert mit einem Sauerstoff-Atom zu Wasser, wodurch der Eisenkomplex im oxidierten Zustand (Fe^{IV}) vorliegt. Das zweite Sauerstoff-Atom reagiert mit dem in der Rückreaktion freiwerdenden zu einem Sauerstoff-Molekül, wodurch der Eisenkomplex wieder als Fe^{III} vorliegt.



Für die Enzympräparation wurde die Katalase aus Rinderleber gewonnen („BLC“ = Bovine liver catalase), sie kann jedoch auch von Mikroorganismen produziert werden (z.B. *Penicillium*, *E. coli*, *Aspergillus niger*, *Mikrococcus lysodeikticus*). Die mikrobiologisch gewonnenen Katalasen können zusätzlich eine terminale C-Domäne aufweisen.

Charakteristika

Gefahrenhinweise	S.24/25 (Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden)
Molekulargewicht	$M_r \sim 245.000\text{D}$
Bau	Tetrameres Hämprotein, 4 Häm-Untereinheiten (je 670 Aminosäuren; 60.000D) gleicher Größe (Ferriprotoporphyrin IX [Fe(III)])
pH-Optimum	$\sim \text{pH } 6,8$
Isoelektrischer Punkt	$\sim \text{pH } 5,4$
Inhibierung	Ascorbat, auch mit Cu^{2+} ; O^{2-} , H_2S , HCN, Flouride, Azide (NaN_3), Hydroxylamin Inaktivierung durch Einfrieren, Lyophilisation (Gefriertrocknung)
Aktivierung	Keine Aktivierung notwendig, NADPH als Kofaktor zur e^- -Übertragung
Spezifische Aktivität	$5 \cdot 10^{-6} \text{ U/mMol}$; $\sim 65.000 \text{ U/mg Protein}$ ($\sim 20\text{mg/ml}$)
Stabilität	Präparationen sind bei 4°C für 6 -12 Monate beständig (flüssige Präparationen nicht einfrieren)
Assay	Spektralphotometrische Bestimmung bei $\lambda=240\text{nm}$ 1U = Enzymmenge, die von $1 \mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ in 1 Minute abgebaut wird (25°C , pH 7)

Theorie der angewandten Methodik

Michaelis-Menten Kinetik

Die Katalysegeschwindigkeit von Enzymen V , die als die pro Sekunde entstehenden Mole des Produkts P definiert ist, variiert mit der Substratkonzentration $[S]$. Bei konstanter Enzymkonzentration ist das Verhältnis zwischen V und $[S]$ bei kleinem $[S]$ annähernd linear. Bei hohem $[S]$ ist V von $[S]$ allerdings nahezu unabhängig (vgl. V/S -Diagramm).

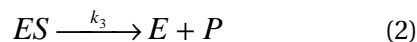
Das Modell von Leonar Michaelis (1875-1949) und Maud Menten (1879-1960) ist das einfachste Modell, mit dem man sich die kinetischen Eigenschaften vieler Enzyme veranschaulichen kann.

Das Enzym E bildet mit dem Substrat S zuerst über eine reversible Bindung den Enzym-Substrat-Komplex ES aus. k_1 und k_2 sind hierbei die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. der Rückreaktion.

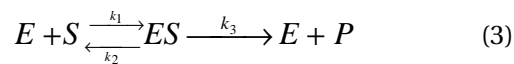


In einem zweiten langsameren Schritt zerfällt der ES -Komplex in das freie Enzym und das Reaktionsprodukt P .

k_3 ist die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion.



Die Kinetik einer Gesamtreaktion wird von ihrem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bestimmt, d.h. der Teilreaktion, die mit der langsamsten Geschwindigkeit abläuft.



In diesem Fall besteht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt also in der Zerfallsreaktion des Enzymsubstrat-komplexes in das freie Produkt und das freie Enzym.

Als Ansatz dient folgende Gleichung:

$$V = k_3 \cdot [ES] \quad (4)$$

ES wird nun durch bekannte Größen ausgedrückt. Die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten für ES sind gegeben durch:

$$\text{ES-Bildungsgeschwindigkeit} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (5)$$

$$\text{ES-Zerfallsgeschwindigkeit} = (k_2 + k_3) \cdot [ES] \quad (6)$$

Uns interessiert die Katalysegeschwindigkeit unter Gleichgewichtsbedingungen, also wenn die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes gleich groß sind. Ist dies der Fall kann man jeweils die rechte Seite von Gleichung (5) und Gleichung (6) gleichsetzen.

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) \cdot [ES] \quad (7)$$

Auflösen nach $[ES]$ ergibt:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{(k_2 + k_3) / k_1} \quad (8)$$

Diese Gleichung kann vereinfacht werden, indem man definiert: $(k_2 + k_3) / k_1 = K_M$ (9)
Hierbei ist K_M die sogenannte Michaelis-Menten-Konstante. Gleichung (9) in Gleichung (8) ergibt:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M} \quad (10)$$

Nun macht man folgende Annahmen :

Man geht davon aus, daß die Enzymkonzentration klein gegenüber der Substratkonzentration ist. In diesem Fall liegt die Konzentration an ungebundenem Substrat [s] sehr nahe bei der Substratgesamtkonzentration (gebundenes Substrat + ungebundenes Substrat). Die Konzentration des freien Enzyms [E] ergibt sich aus der Differenz der Enzymgesamtkonzentration $[E_T]$ und der Konzentration des ES-Komplexes:

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (11)$$

Gleichung (11) in Gleichung (10) ergibt:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{K_M} \quad (12)$$

Nach [ES] aufgelöst ergibt sich:

$$[ES] = [E_T] \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (13)$$

Setzt man nun Gleichung (13) in Gleichung (4) ein, so ergibt sich für die Katalysegeschwindigkeit:

$$V = k_3 \cdot [E_T] \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (14)$$

Die maximale Geschwindigkeit, die erreicht werden kann, tritt bei völliger Sättigung des Enzyms auf, dann also, wenn [S] viel größer ist als K_M und der Bruch aus Gleichung 14 gegen 1 strebt. Dann gilt:

$$V_{\max} = k_3 \cdot [E_T] \quad (15)$$

Einsetzen von Gleichung (15) in Gleichung (14) ergibt schließlich die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (16)$$

Man kann K_M etwas anschaulicher erfassen. Bei $[S] = K_M$ gilt nämlich: $V = V_{\max}/2$. Somit entspricht K_M *der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes annimmt.*

Die Konstante hat noch eine weitere Bedeutung :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_1} = K_{diss} + \frac{k_3}{k_1}$$

K_{diss} ist dabei die Dissoziationskonstante des Komplexes, bezogen auf Enzym und Edukt.

Ist dieser Wert klein, so ist die Affinität des Enzyms zum Substrat groß. Daraus ergibt sich, daß K_M auch ein Maß für die Affinität darstellt. Da k_3 als geschwindigkeitsbestimmende Konstante der Reaktion viel kleiner ist als k_2 gilt näherungsweise:

$$K_M \approx K_{Diss} \quad , \text{ wenn } k_3 \ll k_2$$

Graphisch läßt sich K_M wie folgt ermitteln : Man mißt die Anfangsgeschwindigkeit V_o , die im allgemeinen das Fließgleichgewicht widerspiegelt, der jeweils untersuchten Reaktion bei unterschiedlicher Substratkonzentrationen, und trägt dann V_o gegen $[S]$ auf, so läßt sich K_M bei $\frac{1}{2} V_{max}$ bestimmen. V_{max} ist wiederum die Asymptote des Graphen. Man nennt diese Auftragung auch Michaelis-Menten-Plot.

Eine weitere Methode zur Ermittlung von v_{max} und K_M stellt die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk dar. Hierzu verwendet man die reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Hieraus ergibt sich bei der doppelt reziproken Auftragung eine Gerade, aus deren Ordinatenabschnitt man V_{max} (Kehrwert) und aus deren extrapolierten Schnittpunkt mit der Abszissenwert K_M (negativer Kehrwert) graphisch ermittelt werden kann (Lineweaver-Burk-Plot). Der Nachteil dieser Messung liegt darin, daß die Konzentrationen von Substrat und Enzym genau gewählt sein müssen, da es sonst zu großen Ungenauigkeiten kommt.

Inhibitoren

Enzyme können mit bestimmten Molekülen, sogenannten Inhibitoren gehemmt werden.

Es gibt zwei große Klassen von Inhibitoren: reversible und irreversible.

Bei der kompetitiven Hemmung handelt es sich um einen Typ der reversiblen Hemmung. Ein kompetitiver Inhibitor konkurriert mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms. Das Enzym kann entweder den Inhibitor oder das Substrat binden, aber niemals beide zusammen. Bindet der Inhibitor, findet im allgemeinen keine Reaktion statt. Das Enzym ist dann für das Substrat blockiert.

Kompetitive Inhibitoren gleichen oft dem Substrat und gehen mit dem Enzym einen EI-Komplex ein. Durch die reversible Bindung an das Enzym läßt sich die Wahrscheinlichkeit der Inhibition durch das Erhöhen der Substratkonzentration verringern, da der EI-Komplex durch eine schnelle Dissoziation gekennzeichnet ist.

Ein kompetitiver Inhibitor verringert also die Katalysegeschwindigkeit, indem er den Anteil der Enzymmoleküle mit gebundenem Substrat verringert.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt sich im Vergleich zur Messung ohne Inhibitor eine Änderung der Steigung bei gleichbleibendem Ordinatenabschnitt. Dies zeigt, daß der Inhibitor V_{max} (Kehrwert des Schnittpunkts mit der Ordinate) nicht verändert. Die Gleichung der Gerade mit Inhibitor lautet:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \cdot \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

mit $[I]$: Inhibitorkonzentration und K_i : Dissoziationskonstante de EI-Komplexes.

Nichtkompetitive Hemmungen sind ebenfalls reversibel. Allerdings können hier im Unterschied zur kompetitiven Hemmung sowohl Inhibitor als auch Substrat an ein und dasselbe Enzym binden, was bedeutet, daß die Bindungsstellen nicht identisch sind. Eine Erhöhung der Substratkonzentration kann die Inhibition nicht aufheben, da keine Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat auftritt.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm verringert sich V_{max} zu V_{max}^i , was einer Vergrößerung des y-Achsenabschnitts gleichkommt. K_m wird durch diese Hemmung jedoch nicht beeinflusst, d.h., daß der Abszissenabschnitt mit dem der Messung ohne Inhibitor übereinstimmt. Da sich die Steigung der Gerade im Lineweaver-Burk-Diagramm aus K_m und V_{max} zusammensetzt (K_m/V_{max}) haben die Geraden der Messung mit und ohne nichtkompetitiven Hemmstoff unterschiedliche Steigungen.

Die Geradengleichung bei der nichtkompetitiven Hemmung lautet:

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{1}{V_{max}^i} + \frac{1}{[S]} \cdot \left(\frac{K_M}{V_{max}^i} \right) \right) \cdot \left(1 + \frac{K_i}{[I]} \right)$$

mit V_{\max}^i : Maximalgeschwindigkeit in Gegenwart eines nichtkompetitiven Inhibitors, $[I]$: Inhibitor-Konzentration und K_i : Dissoziationskonstante des EI-Komplexes

Desweiteren gibt es unkompetitive Inhibitoren, die auch an anderer Stelle als das Substrat an das Enzym binden, jedoch nur an den ES-Komplex. (Der nichtkompetitive Inhibitor bindet auch noch an das freie Enzym.)

Reinheitszahl nach Theorell

Dieses Reinheitskriterium ergibt sich dem Quotienten aus der Extinktion bei 405 nm (Absorptionsmaximum der Katalase) und 280 nm nach Theorell. Dabei macht man sich die Absorption der Aminosäurereste Trp, Phe und Tyr bei 280 nm zu Nutze. Die Reinheitszahl nimmt im Falle der Katalase maximal einen Wert von 3,5 an, wobei es sich dann um das völlig reine Protein handelt. In den meisten Fällen liegt man aber unter diesem Wert.

Gelelektrophorese

Elektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese basiert auf der Eigenschaft geladener Moleküle, im elektrischen Feld zu wandern.

Da Proteine durch elektrophoretische Methoden häufig inaktiviert werden, wird die Elektrophorese meist nicht zur Reinigung von Proteinen wohl aber zur Analyse derselbigen verwendet. Der Vorteil der Elektrophorese liegt darin, daß Proteine sowohl sichtbar gemacht, als auch getrennt werden können, was eine rasche Abschätzung der Anzahl in einer Mischung vorliegender Proteine ermöglicht. Desweiteren ermöglicht die Elektrophorese die Bestimmung des isoelektrischen Punktes sowie der ungefähren molaren Masse.

Die die Makromoleküle (z.B. Protein, DNA, RNA) bewegende Kraft bei der Elektrophorese ist das elektrische Potential. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Moleküls bei einer trägerfreien Elektrophorese in Lösungsmitteln ist gegeben durch:

$$v = \frac{Q \cdot F}{f} \quad \text{mit} \quad f = 6\pi\eta r$$

Hierbei sind: v : Wanderungsgeschwindigkeit [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Q : Nettoladung des Moleküls [C]

F : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

f : Reibungskoeffizient [$\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$]

η : Viskosität der Mediums [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]

r : Radius des Teilchens [m]

Bei Wanderung in Gelen kommen Einflüsse der Gelmatrix hinzu, die sich einer allgemeinen einfachen Beschreibung entziehen.

Unter definierten Bedingungen (pH, Ionenstärke, Temperatur etc.) ist für ein bestimmtes Teilchen die Wanderungsgeschwindigkeit von der Spannung abhängig, wegen:

$$F = \frac{U}{d} \quad \text{mit} \quad U: \text{an den Elektroden anliegende Spannung [V]}$$

d : Abstand der Elektroden [m]

F : Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

Die auf die Feldstärke bezogene Wanderungsgeschwindigkeit hängt dann nur noch von der Eigenschaft des Teilchens ab:

$$\mu = \frac{v}{F} \quad \text{mit} \quad \mu: \text{elektrophoretische Beweglichkeit} [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit wächst also proportional zur angelegten Spannung. Bei zunehmender Spannung wächst aber nach dem Ohmschen Gesetz: $R = \frac{U}{I}$ (mit R: Widerstand [Ω], U: Spannung [V], I: Stromstärke [A]) auch die Stromstärke. Leistet der Strom keine mechanische oder chemische Arbeit, so wird die von der Stromquelle über die Zeit aufgenommene Energie als Wärme freigesetzt.

$$W = U \cdot I \cdot t = I^2 \cdot R \cdot t \text{ mit } W: \text{ abgegebene Wärmemenge [J]}$$

Das Abführen der Wärme ist selbst bei aktiver Kühlung nur begrenzt möglich. Es empfiehlt sich deshalb nicht, bei zu hohen Volt- und somit auch Amperezahlen zu arbeiten, da eine starke Erwärmung die Trennschärfe der Elektrophorese herabsetzt. Zu hohe Temperaturen können außerdem zu ungewünschten Denaturierungen von Proteinen und Nukleinsäuren führen. Es gilt: Je dünner die Gelschicht ist, desto besser kann die Joulesche Wärme abgeführt werden.

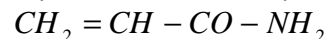
Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese werden als Trägermaterialien Papier, Celluloseacetatfolie, Stärke-, Agarose- oder Polyacrylamidgel verwendet. Hierbei sind die Gelelektrophoresen im Vergleich zu den beiden anderen genannten Elektrophoresetypen variabler und sehr viel leistungsfähiger.

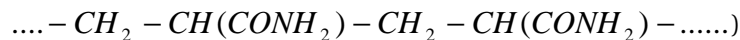
So kann der Vernetzungsgrad der Gelstruktur variiert werden, so daß die Maschenweite der Gele an die Größe der zu trennenden Makromoleküle angepaßt werden kann.

Polyacrylamidelektrophorese

Polyacrylamidgelle entstehen durch Polymerisation von Acrylamid



und Vernetzung der linearen Polymere



durch N,N'-Methylenbisacrylamid



Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumperoxodisulfat (Ammoniumpersulfat) $(NH_4)_2S_2O_8$, das leicht Radikale bildet, gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Sauerstoff inhibiert die Polymerisation. Über die Konzentration des eingesetzten Acrylamids kann die Länge der Polyacrylamidketten, über die Konzentration der Bisacrylamidkonzentration der Vernetzungsgrad reguliert werden. Beide Konzentrationen zusammen bestimmen die Porengröße, die Elastizität und die Dichte des Gels.

Die Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) wird entweder mit Flachbettgelen oder Röhrengelen durchgeführt.

Röhrengel

Die Röhrengelapparatur besteht aus einem oberen und einem unteren Pufferreservoir, in dem sich Kathode bzw. Anode befinden. Die mit dem Gel bestückten Röhren sind so eingefügt, daß der obere Abschnitt des Röhrens sich im oberen Reservoir und der untere Abschnitt im unteren Reservoir befindet. Die zu messende Probe wird mit Glycerol versetzt, um die Durchmischung mit dem Elektrodenpuffer herabzusetzen und anschließend mit einer Pipette auf das Gel aufgetragen. Als Frontmarker wird der Probe vor dem Auftragen des weiteren Bromphenolblau zugegeben.

Flachbettgel

Das Gel wird hierzu in eine Gelkassette gefüllt, deren zwei Glasplatten durch Spacer auf Abstand gehalten werden. Mit einem Kamm werden die Probeauftragetaschen definiert. Nach der Polymerisation des Gels werden Kamm und Spacer entfernt. Die Kassette wird in die Elektrophoresekammer montiert, die anschließend mit Elektrodenpuffer bestückt wird. Die analog zur Röhrengelgelelektrophorese behandelten Proben werden nun auf die Geltaschen pipettiert, und die Elektrophorese wird begonnen.

Die einfachste Form der PAGE ist die kontinuierliche Zonenelektrophorese. Hierbei ist der Puffer in Gel und Elektrodokammern gleich. Die Trennung erfolgt über Ladung und Größe des Makromoleküls, wobei die Ladung mit der Wahl des Puffers festgelegt ist. Liegt der pH-Wert des Puffers höher als der isoelektrische Punkt des Makromoleküls so ist dieses negativ geladen und wandert zur Anode, liegt der pH hingegen unterhalb des isoelektrischen Punktes, so ist das Molekül positiv geladen und wandert zur Kathode.

Je nachdem ob man eine anodische oder kathodische PAGE durchführen will, muß man also den geeigneten Puffer wählen.

Über die kontinuierliche Zonenelektrophorese kann das Molekulargewicht nativer Proteine nach Ferguson bestimmt werden:

$\log R_f = \log Y_0 - K_R \cdot C_T$ mit: R_f : relative Mobilität, C_T : Gesamtkonzentration an Acrylamid und Bisacrylamid.

Y_0 : Maß für die Nettoladung des Proteins, K_R : Maß für die relative Molmasse des Proteins.

Diese Gleichung gilt, wenn Puffer, Temperatur und Bisacrylamidkonzentration konstant gehalten werden.

Trägt man nun $\log R_f$ gegen C_T auf, so kann man K_R als negativen Wert der Steigung bestimmen. Unter Verwendung von Eichproteinen läßt sich aus K_R die relative Molmasse M_R bestimmen.

SDS-Page

Am weitesten verbreitet ist die PAGE in Gegenwart von SDS (sodium dodecyl sulfate [Natriumdodecylsulfat]).

Die SDS-PAGE trennt die Untereinheiten von Proteinen ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. SDS bindet mit ca. 1.4g SDS/g Protein an Proteine und denaturiert diese in der Weise, daß deren Quartär-, Tertiär- und bisweilen auch die Sekundärstruktur verloren geht und eine weitgehendst einheitliche Form angenommen wird. Eine Mischung von 2% SDS und 5% 2-Mercaptoethanol im Auftragspuffer bewirkt bei einer Inkubation von wenigen Minuten bei 100°C die Denaturierung der Proteine sowie die Spaltung der Disulfidbrücken.

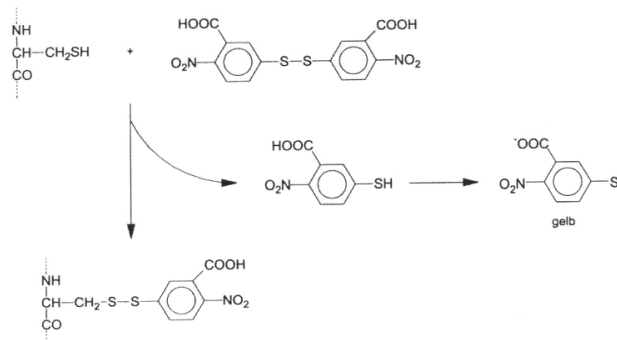
Die halblogarithmische Auftragung von M_r eines Proteinstandards gegen dessen Wanderungsstrecke ergibt eine Eichgerade, mit deren Hilfe man die relative Molmasse eines Proteins bzw. seiner Untereinheiten bestimmen kann.

Zur Anfärbung der PAGE wird Coomassie Brilliant Blue in saurer Lösung (Essigsäure) bei erhöhter Temperatur verwendet. Hierbei werden die Proteine fixiert und positiv geladen und binden in dieser Form den Farbstoff. Aufgrund hydrophober Effekte lagert sich zusätzlicher Farbstoff an das Protein und proteingebundenen Farbstoff an. Insgesamt kommt es zu einer Bindung von 1g Farbstoff/g Protein.

Nachweis von SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz

Die Cystein-Sulphydrylgruppen (freie SH-Gruppen) können in Proteinen unter Zuhilfenahme von Ellman's Reagenz [DTNB: 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)] nachgewiesen werden.

Bei der Reaktion der DTNB mit Cystein wird die Disulfidbindung im DTNB unter Ausbildung einer Disulfidbindung mit dem Cystein gespalten. Übrig bleibt die intensiv gelb gefärbte 2-Nitro-5-thiobenzoessäure.



Über die Absorption bei 412 nm kann die Konzentration der 2-Nitro-5-thiobenzoessäure bestimmt werden. Diese entspricht dann der Konzentration der Cystein-Sulfhydrylgruppen. Die SH-Gruppen-Konzentration wird also indirekt über das Nebenprodukt der Reaktion von DTNB mit Cystein bestimmt.

Durch Denaturierung der Disulfidbrücken mit Natriumdodecylsulfat (SDS) kann die Gesamtzahl der SH-Gruppen bestimmt werden. Diese errechnet sich nach:

$$\text{Anzahl der SH-Gruppen} = \frac{\text{Mole SH - Gruppen (lt. Eichgerade)}}{\text{eingesetzte Mole Protein}}$$

Gelchromatografie (Gel- und Anionenaustauscher Säulen)

Die Gelchromatografie ist eine als Säulenchromatographie durchgeführte Flüssigkeitschromatographie, bei der die stationäre Phase aus Perlen mit einem heteroporösen gequollenen Netzwerk besteht, dessen Porengrößenverteilung über mehrere Größenordnungen variiert, so daß die Fraktionierung nach Molekülgröße (Molekularsieb-Effekt) erfolgt, was die rasche Bestimmung der molekularen Größenverteilung gestattet.

Häufig benutzte Materialien sind Dextran, Agarose, andere modifizierte Polysaccharide (Sephadex, Sepharose), Kieselgele, Polyethylenglykoldimethylacrylat, mit Divinylbenzol vernetzte Styrolgele, poröses Glas (z.B. CPG) sowie Polyacrylamide.

Die flüssige Phase mit den gelösten Polymeren wird durch das Gel gegeben, wobei die Polymer-Moleküle in alle Teile des Netzwerkes diffundieren, die ihnen aufgrund ihrer Größe versperrt sind. Folglich dringen die kleineren Moleküle des Gelösten tiefer ein und werden länger in der Säule zurückgehalten als die größeren Moleküle.

Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelkörner nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei; sie verlassen die Säule zuerst.

Die Moleküle erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße. Da die Molekülgröße allgemein der Molmasse proportional ist, bietet die Gelchromatografie die Möglichkeit zu Trennung und Reinigung von Substanzen verschiedener Molmassen sowie zur Molmassenbestimmung.

Gel	Matrix	Partikeldurchmesser	Bereich
Sephacryl S-300	Dextran	25-75µm	10-1.500kD
Sepharose CL-6B	Agarose	45-165µm	10-4.000kD

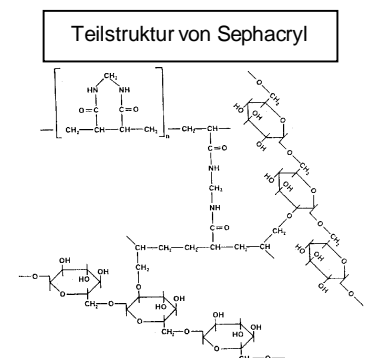
Gelfiltration mit Sephacryl S-300

Das hydrophile Sephacryl-Gel besteht aus dreidimensional vernetzten, linearen Dextran-Ketten mit N,N'-Methylenbis(acrylamid). Es ist für die Gelfiltration in Wasser und organischen Lösemitteln geeignet, die Größe der Poren ist vom Vernetzungsgrad abhängig

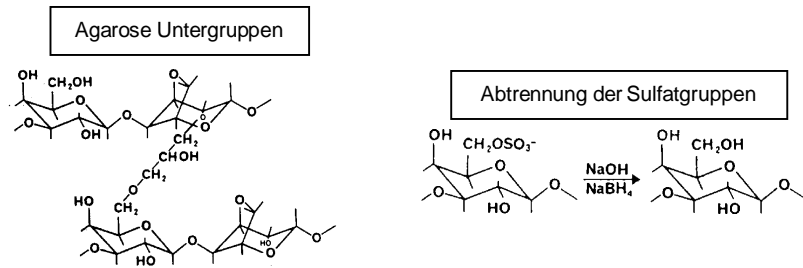
Es sind verschiedene Sephacryl-Typen für die Fraktionierung von Biomolekülen im Bereich von Molmassen 5000–8000000 erhältlich.

Anionenaustauschchromatografie mit DEAE-Sepharose CL-6B

Hierbei handelt es sich um ein perlförmiges Gel zur Chromatographie in wässrigen Lösungen auf Basis modifizierter Agarose, deren Polysaccharid-Ketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. Unter den Sepharose-Typen, die wegen ihrer inerten Matrix für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden, befinden sich sowohl aktivierte Typen zur einfachen Einführung individueller Liganden (z.B. Antikörper) als auch fertige Medien mit Spezifität für verschiedene Gruppen von Biomol. (z.B. Blaue Sepharose, Con A-Sepharose). Quervernetzte Sepharose (z.B. mit Dibrompropanol) findet als Sepharose CL (cross linked) und Sepharose FF (fast flow) wegen der äußerst stabilen Matrices in der Ionenaustauschchromatographie Verwendung; hier sind Austauscher mit den gleichen funktionellen Gruppen wie für Sephadex erhältlich (QAE, DEAE, SP, CM). Als Matrix für die Gelfiltration sind Sepharose-Typen weitgehend durch entsprechende Sephacryl-Typen ersetzbar.



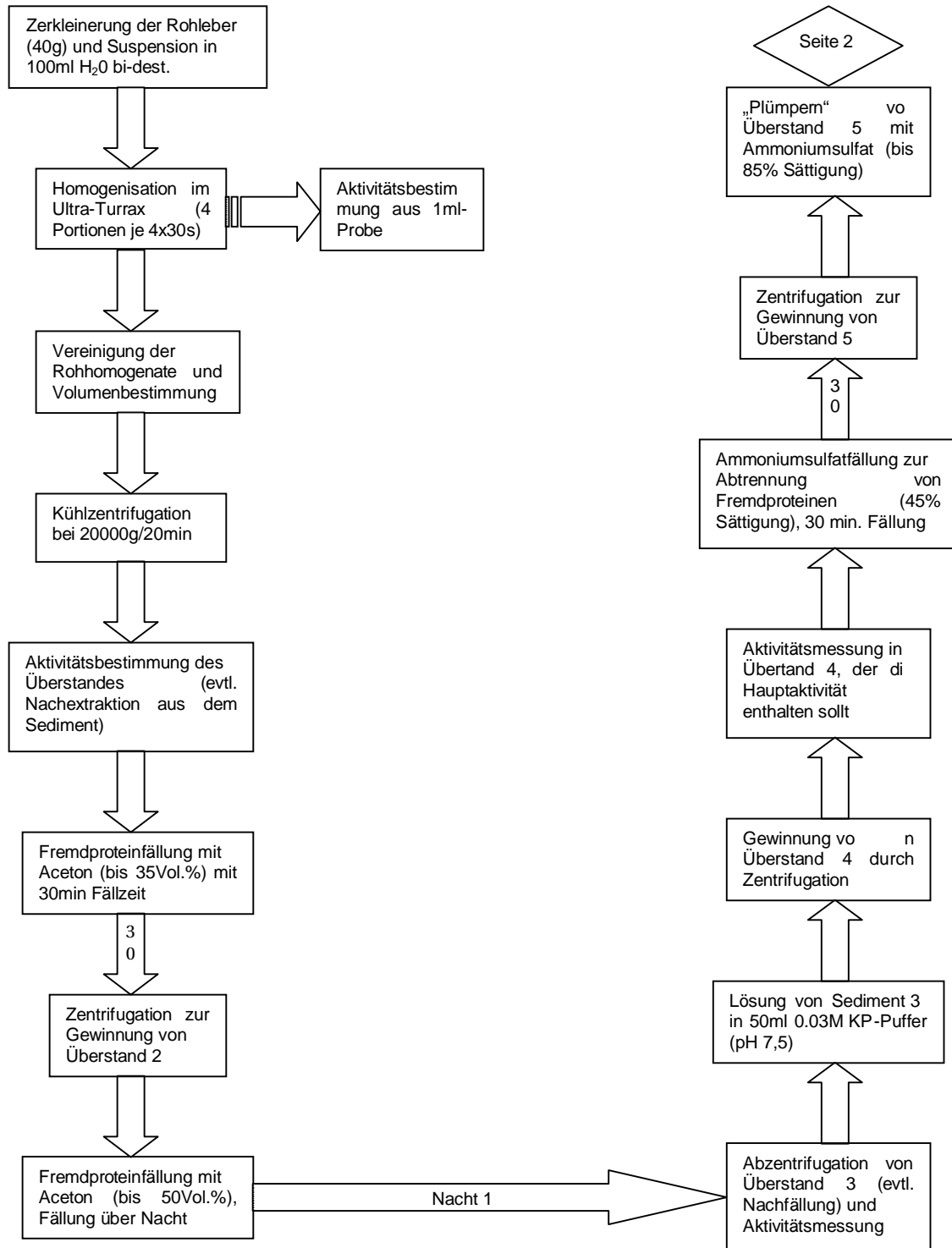
Sephrose CL wird durch die Reaktion von Sepharose mit 2,3-dibromopropanol unter alkalischen Bedingungen hergestellt, wodurch die thermische und chemische Stabilität bei Erhaltung der Porosität erhöht wird. Die Reduktion ionisierbarer Gruppen wird mit der anschließende abtrennung von Sulfatgruppen durch alkalische Hydrolyse erreicht.

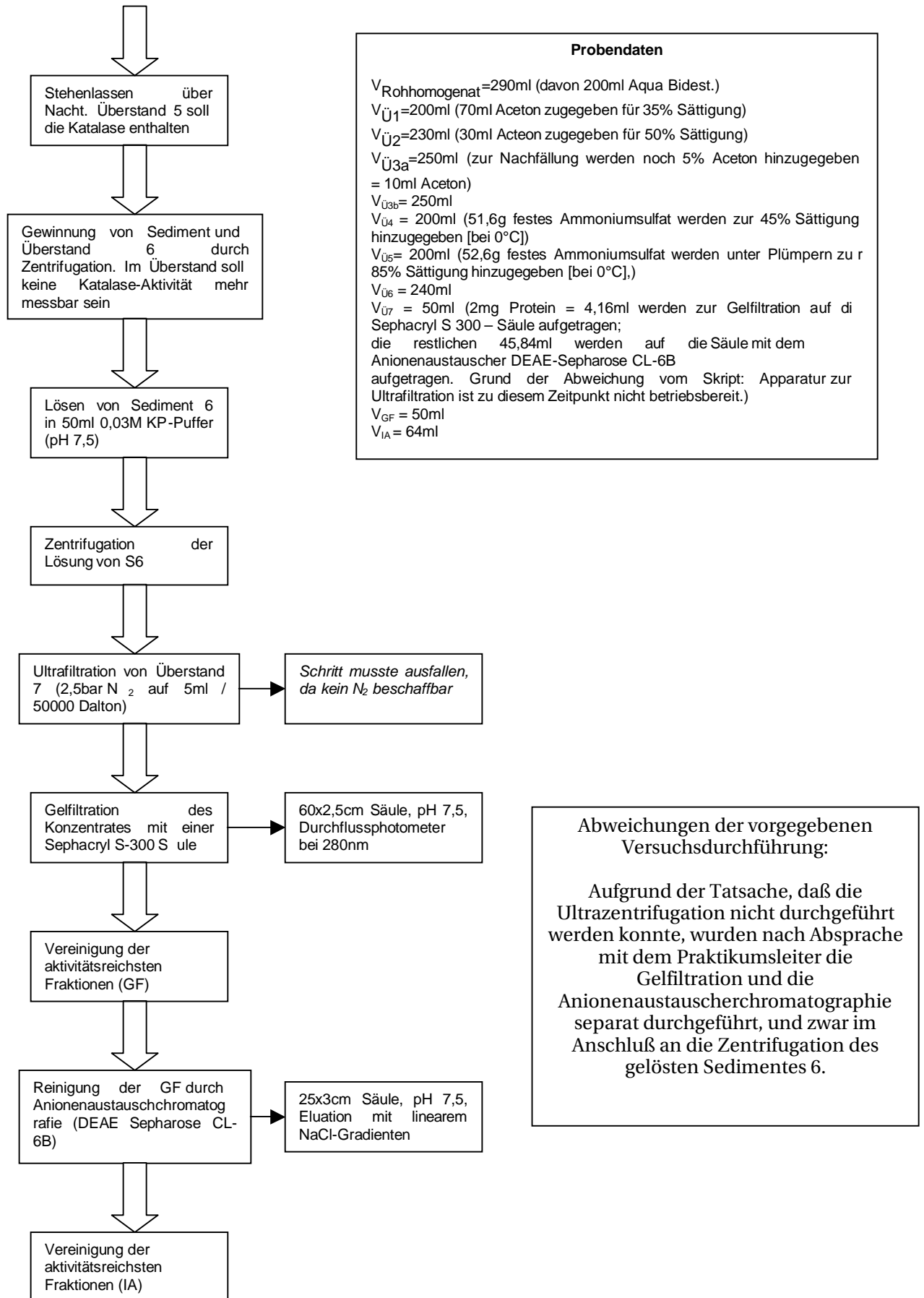


Durchführung und Messergebnisse

Fließschema

- Sämtliche Aufreinigungsschritte sind im 4°-Kühllabor (bzw. Eiskühlung) durchzuführen





Messergebnisse

Präparation der Katalase

Im folgenden Versuchsabschnitt soll die Katalase aus der Rinderleber isoliert werden.

Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen werden über die Messung am Photometer mit Wasserstoffperoxid als Substrat bei 240nm bestimmt:

Die konzentrierte 30%ige H_2O_2 wird hierzu im Verhältnis 1:64 mit destilliertem Wasser verdünnt, so daß man eine Lösung mit einem H_2O_2 -Gehalt von 150 mmol/l erhält. Der genaue H_2O_2 -Gehalt wird vor den Messungen photometrisch bei 240 nm geprüft. Im allgemeinen muß die H_2O_2 -Lösung allerdings täglich neu angesetzt werden. Als Puffer wird ein 0,05 M K-Phosphatpuffer mit dem pH-Wert 7,0 verwendet.

Aus den Extinktions-Meßwerten werden Volumenaktivität, Gesamtaktivität und die Ausbeute berechnet.

Die Volumenktivität der Katalase berechnet sich nach:

$$v = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_{\text{küv}} \cdot \text{Verdünnung}}{\epsilon \cdot d_{\text{küv}} \cdot V_{\text{Probe}}}$$

Mit: $V_{\text{küv}} = 2.72\text{ml}$ Verdünnung 1:10
 $V_{\text{Probe}} = 0.02\text{ml}$ $d_{\text{küv}} = 1\text{cm}$
 $\epsilon = 0.036 \text{ l} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ $v = \text{Umsatzgeschwindigkeit [U/ml]}$

Die Einheit [U] ist durch IUPAC/IUB als diejenige Menge an Enzym definiert, die pro Minute 1 μmol Substrat umsetzt.

Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte für $\Delta E/\text{min}$ sind die sinnvollen Mittelwerte der jeweiligen Einzelmessungen der einzelnen Fraktionen

Probe	Rohhom.	Ü1	Ü2	Ü3a	Ü3b	Ü4	Ü5	Ü6	Ü7	GF	IA
Verdünn.	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	---	1:10	1:10	1:10
$\Delta E/\text{min}$	0.137	n/a	0.130	0.067	0.076	0.158	n/a	0.091	0.547	0.084	0.319
Fraktionsvolumen [ml]	290	200	230	250	250	200	200	240	50	50	64
v [U/ml]	5176	n/a	5453	2531	2871	6627	n/a	344	20664	3173	12051
A/U	1500911	n/a	1254190	632750	717750	1325400	n/a	82560	1033200	158650	771264

Es wurde versäumt von \ddot{U}_1 und \ddot{U}_5 Proben zur Aktivitäts- und späteren Proteinbestimmung zu nehmen.

Über die Volumenaktivität und das Gesamtvolumen der Fraktion kann durch Multiplikation die Gesamtaktivität der jeweiligen Fraktion bestimmt werden.

Fraktion	$\Delta E/\text{min}$	Verd.fakt.	Probevol. [ml]	Küv.vol. [ml]	Vol.akt. [U/ml]	Frakt.vol. [ml]	Gesamtaktiv. [U]	Ausbeute [%]
Rohhom.	0.137	10	0.02	2.72	5176	290	1500911	100
\ddot{U}_1			0.02	2.72		200		
\ddot{U}_2	0.130	10	0.02	2.72	5453	230	1254190	84
\ddot{U}_{3a}	0.067	10	0.02	2.72	2531	250	632750	42
\ddot{U}_{3b}	0.076	10	0.02	2.72	2871	250	717750	48
\ddot{U}_4	0.158	10	0.02	2.72	6627	200	1325400	88
\ddot{U}_5			0.02	2.72		200		
\ddot{U}_6	0.091	---	0.02	2.72	344	240	82560	6
\ddot{U}_7	0.547	10	0.02	2.72	20664	50	1033200	69
GF	0.084	10	0.02	2.72	3173	50	158650	11
IA	0.319	10	0.02	2.72	12051	64	771264	51

Die Ausbeute wird über die Gesamtaktivitäten berechnet und zwar so, daß das Verhältnis der Gesamtaktivität der jeweiligen Fraktion zu der Gesamtaktivität des Rohhomogenats gebildet wird.

Anhand der Meßergebnisse lassen sich die verlustreichsten Aufreinigungsschritte ermitteln, so scheint es, daß bei der Fremdproteinfällung mit Aceton (Ü3) ein nicht unbedeutender Anteil der Katalase mit gefällt wurde. Bei der Aufreinigung (Rohhomogenat → IA-Fraktion) gingen 49% der Ausgangsmenge Katalase verloren.

Bestimmung der GF-Fraktion $\lambda=280\text{nm}$

Die Aktivität der nach der Gelfiltration aufgefangenen Proben wird stichprobenartig untersucht, um die Proben mit niedriger Aktivität von denen mit hoher zu trennen.

Nr	1	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	40
ΔE	0.00	0.11	0.05	0.15	0.13	0.13	0.32	0.95	1.45	1.46	1.21	0.85	0.50	0.31	0.18	0.14	0.11	0.09	0.08	0.09

Die gesammelten Proben enthalten ein Einzelvolumen von ca. 5ml (100 Tropfen)

Die Proben 9-21 werden zur GF (Gelfiltrationsfraktion) vereingigt $V_{\text{ges}} = 50\text{ml}$

Bestimmung der IA-Fraktion $\lambda=280\text{nm}$

Es wird analog zur Bestimmung der GF-Fraktion verfahren:

Nr	3	6	13	17	18	19	20	25	27	28	29	30	31	32	33	37
ΔE	0.046	0.062	0.279	0.763	0.969	1.080	1.197	3.417	4.250	6.000	2.900	1.630	1.212	1.024	0.947	0.394

Die Proben 19-32 werden zur IA (Ionenaustauscherfraktion) vereingigt $V_{\text{ges}} = 64\text{ml}$

Kinetische Charakterisierung

a) Variation der Substratkonzentration

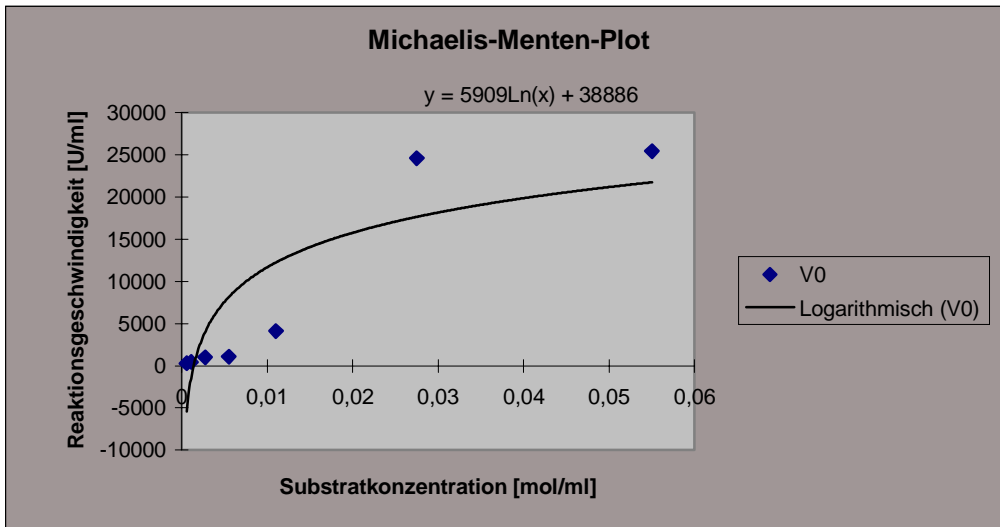
Als Ziele der kinetischen Charakterisierung werden der die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die Maximalgeschwindigkeit V_{max} der Reaktion von Katalase mit Wasserstoffperoxid bestimmt. Hierzu ist es notwendig, die Reaktion mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchzuführen.

Enzymvolumen: 0,02ml

$V(\text{H}_2\text{O}_2)$ [ml]	1.0	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01
$c(\text{H}_2\text{O}_2)$ [mol/l]	0.055	0.0275	0.011	0.0055	0.00275	0.0011	0.00055
$V(\text{Puffer})$ [ml]	2.0	2.5	2.8	2.9	2.95	2.98	2.99
$\Delta E/\text{min}$	6.067	5.864	2.981	0.547	0.326	0.134	0.072
v [U/ml]	25448	24596	12503	2294	1367	562	302

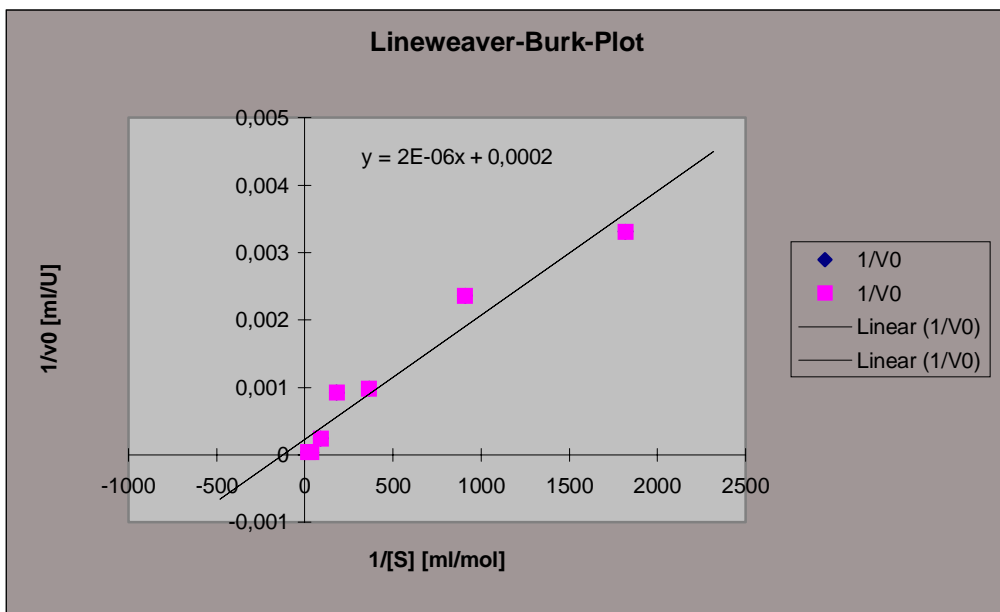
$$v = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_{\text{küv}} \cdot \text{Verdünnung}}{\epsilon \cdot d_{\text{küv}} \cdot V_{\text{Probe}}}$$

Mit: $V_{\text{küv}} = 3.02\text{ml}$ Verdünnung = keine
 $V_{\text{Probe}} = 0.02\text{ml}$ $d_{\text{küv}} = 1\text{cm}$
 $\epsilon = 0.036 \text{ l} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ $v = \text{Umsatzgeschwindigkeit [U/ml]}$



Aus dem Michaelis-Menten-Plot lassen sich V_{\max} und K_m nicht eindeutig bestimmen. V_{\max} wird bei 26000 U/ml ($1U=1\mu\text{mol}/\text{min}$) = $26000\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$

K_m liegt als x-Wert bei $y=13000$ U/ml. Das entspricht einem Wert von ca. 0,01 mmol/ml



Über das Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt sich für V_{\max} (Kehrwert des Ordinatenabschnitts $2\cdot 10^{-5}\text{ml}/\text{U}$) ein Wert von 50000 U/ml und für K_m (negativer Kehrwert des Abzissenabschnitts) ein Wert von 0,1 mmol/ml.

Darstellung	V_{\max} [U/ml]	K_m [mmol/ml]
Michaelis-Menten-Plot	26000	0,01
Lineweaver-Burk-Plot	50000	0,1

Die verwendete Literatur gibt über einen konkreten Wert für Katalase aufgrund des Verhaltens der Katalase gegenüber H_2O_2 keine Auskunft.

b) Inhibierung mit Cyanid (Hemmkinetik)

In diesem Versuchsteil soll die Hemmkinetik mit Cyanid-Ionen aufgenommen werden. Hierbei wird sowohl die Inhibitor- als auch die Substratkonzentration variiert.

Die Auswertung erfolgt nach Lineweaver-Burk und Dixon (Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration bei verschiedenen Substratkonzentrationen). K_m und V_{max} werden bestimmt.

Aus der IA-Fraktion werden 0.02ml Enzymlösung verwendet.

$cH_2O_2 = 0,01\text{mol/l}$

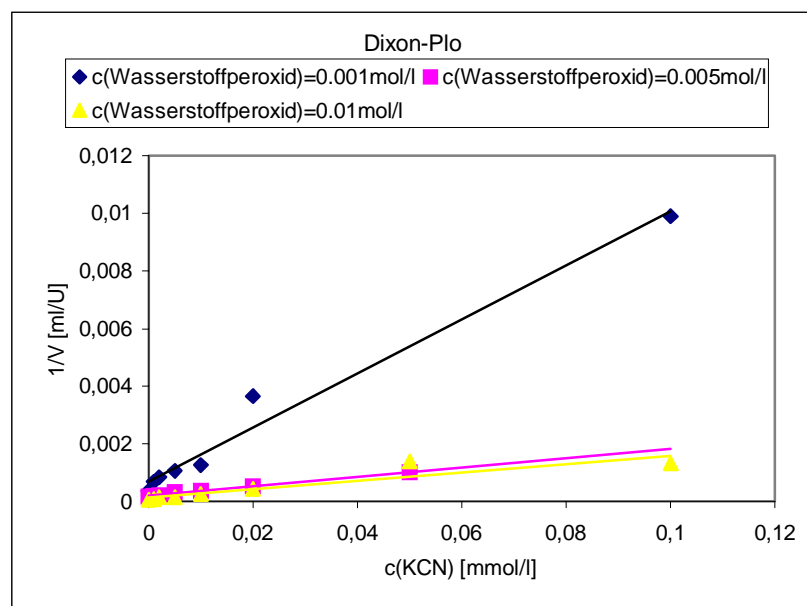
V(H ₂ O ₂)(150mmol/l) [ml]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
V(Puffer) [ml]	2.5	2.65	2.74	2.5	2.65	2.74	2.5	2.8
V(KCN) [ml]	0.3	0.15	0.06	0.3	0.15	0.06	0.3	0
V(Enzym)[ml]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
c(KCN)anfang [mol/l]	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
c (KCN)end [mol/l]	10 ⁻⁴	5•10 ⁻⁵	2•10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5•10 ⁻⁶	2•10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0
ΔE/min	0.179	0.171	0.549	0.902	1.531	1.714	2.766	3.420
v (U/ml)	751	717	2303	3783	6422	7189	11602	14345

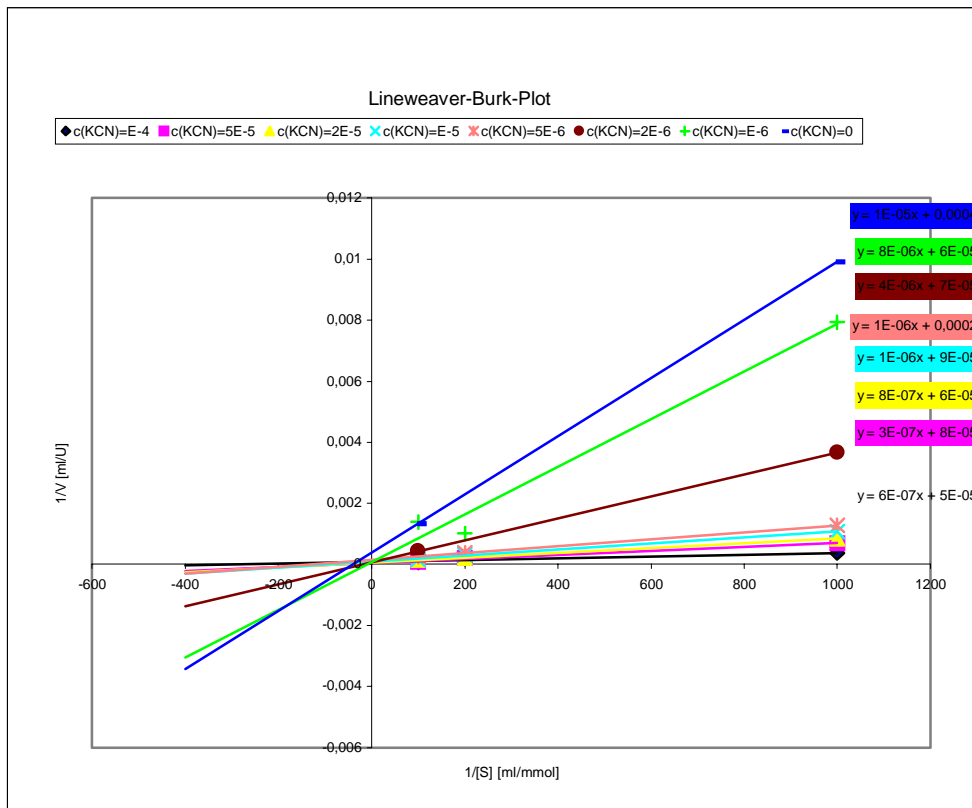
$cH_2O_2 = 0,005\text{mol/l}$

V(H ₂ O ₂)(150mmol/l) [ml]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
V(Puffer) [ml]	2.6	2.75	2.84	2.6	2.75	2.84	2.6	2.9
V(KCN) [ml]	0.3	0.15	0.06	0.3	0.15	0.06	0.3	0
V(Enzym)[ml]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
c(KCN)anfang [mol/l]	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
c (KCN)end [mol/l]	10 ⁻⁴	5•10 ⁻⁵	2•10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5•10 ⁻⁶	2•10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0
ΔE/min	0.043	0.237	0.450	0.624	0.740	1.135	1.170	1.290
v (U/ml)	180	994	1888	2617	3104	4761	4908	5411

$cH_2O_2 = 0,001\text{mol/l}$

V(H ₂ O ₂)(150mmol/l) [ml]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
V(Puffer) [ml]	2.68	2.83	2.92	2.68	2.83	2.92	2.68	2.98
V(KCN) [ml]	0.3	0.15	0.06	0.3	0.15	0.06	0.3	0
V(Enzym)[ml]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
c(KCN)anfang [mol/l]	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0
c (KCN)end [mol/l]	10 ⁻⁴	5•10 ⁻⁵	2•10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5•10 ⁻⁶	2•10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0
ΔE/min	0.024	0.030	0.065	0.188	0.222	0.285	0.345	0.653
v (U/ml)	101	126	273	789	931	1195	1447	2739





Im folgenden werden die K_m - und V_{max} -Werte für die einzelnen Inhibierungsstufen aufgelistet:

c(KCN)[mol/l]	0	10^{-6}	$2 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$2 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}
$1/V_{max}$ [ml/U]	$4 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
V_{max} [U/ml]	2500	16667	14286	5000	11111	16667	12500	20000
K_m [mmol/ml]	0.025	0,133	0.057	0.005	0.011	0.013	0.004	0.012

Anhand des Lineweaver-Burk-Diagramms kann man gut erkennen, daß der Schnittpunkt aller Geraden (mit Ausnahme der bei $c(\text{KCN})=0$ mol/l [Meßfehler]) nahezu derselbe ist, wohingegen die Steigung der Geraden unterschiedlich ist, was letztendlich zu unterschiedlichen Werten für K_m führt. Das Geradenbild ist typisch für eine kompetitive Hemmung (siehe Theorieteil). Das Cyanid konkurriert mit dem Wasserstoffperoxid um die Bindungsstelle am Enzym.

Aus dem Dixon-Plot wird deutlich, daß eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit V führt (bzw. zu einer Erniedrigung von $1/V$). Dies ist ebenfalls nur bei einer kompetitiven Hemmung gegeben.

Die Auftragung nach Lineweaver-Burk eignet sich zwar nur bedingt für die genaue Ermittlung von K_m und V_{max} , da ein kleiner Fehler beim Ermitteln des reziproken Wertes von $1/V$ und $1/[S]$ große Fehler für die gesuchten Größen mit sich bringt (siehe letzte Tabelle); die Untersuchung der Hemmkinetik von Enzymen läßt sich mit dieser Auftragsart allerdings gut veranschaulichen.

Absorptionsspektren

Bei der Aufnahme der Absorptionsspektren von Enzymen muss aufgrund der Konformationsänderung (Änderung des absorbierenden Elektronensystems) auf stringent reproduzierbare Versuchsbedingungen geachtet werden.

Die Messungen werden bei den H_2O_2 -Konzentrationen von 0, 0.01, 0.05 und 0.1 mol/l durchgeführt. Eine Messung bei 1 mol/l führt zu zu starker Blasenentwicklung in der Quarzküvette und wird deshalb nicht in Angriff genommen. Als dritte H_2O_2 -Konzentrationen wird deshalb 0.05 mol/l gewählt.

Absorptionsmessung ohne Zusatz eines Inhibitors

Wellenlänge [nm]	H ₂ O ₂ -Konzentration [mol/l]			
	0	0.01	0.05	0.1
400	0.0197	0.0373	0.0157	0.0126
410	0.0203	0.0369	0.0163	0.0130
420	0.0184	0.0344	0.0145	0.0111
430	0.0162	0.0299	0.0120	0.0084
440	0.0143	0.0268	0.0099	0.0062
450	0.0128	0.0248	0.0090	0.0051
460	0.0129	0.0240	0.0089	0.0054
470	0.0131	0.0231	0.0085	0.0052
480	0.0131	0.0216	0.0085	0.0051
490	0.0127	0.0207	0.0081	0.0050
500	0.0122	0.0194	0.0079	0.0049
510	0.0118	0.0185	0.0077	0.0047
520	0.0116	0.0173	0.0072	0.0045
530	0.0115	0.0161	0.0077	0.0044
540	0.0114	0.0152	0.0076	0.0043
550	0.0112	0.0133	0.0074	0.0043
560	0.0108	0.0124	0.0071	0.0041
570	0.0105	0.0116	0.0073	0.0041
580	0.0105	0.0105	0.0074	0.0041
590	0.0105	0.0097	0.0066	0.0035
600	0.0100	0.0087	0.0065	0.0031

Absorptionsmessung mit KCN-Lösung (0.15mg/ml)

Wellenlänge [nm]	H ₂ O ₂ -Konzentration [mol/l]			
	0	0.01	0.05	0.1
400	0.0052	0.0453	0.1663	0.0724
410	0.0068	0.0460	0.1512	0.0674
420	0.0067	0.0452	0.1313	0.0625
430	0.0043	0.0405	0.1142	0.0555
440	0.0017	0.0355	0.0972	0.0479
450	0.0003	0.0324	0.0813	0.0420
460	0.0005	0.0301	0.0689	0.0368
470	0.0006	0.0276	0.0805	0.0320
480	0.0007	0.0254	0.0881	0.0277
490	0.0004	0.0244	0.0768	0.0229
500	0.0006	0.0240	0.0647	0.0185
510	0.0005	0.0204	0.0552	0.0140
520	0.0003	0.0185	0.0461	0.0107
530	0.0005	0.0165	0.0382	0.0072
540	0.0008	0.0156	0.0309	0.0043
550	0.0008	0.0131	0.0243	0.0023
560	0.0007	0.0121	0.0179	0.0011
570	0.0006	0.0101	0.0128	0.0009
580	0.0007	0.0091	0.0084	0.0009
590	0.0014	0.0076	0.0056	0.0008
600	0.0070	0.0069	0.0039	0.0060

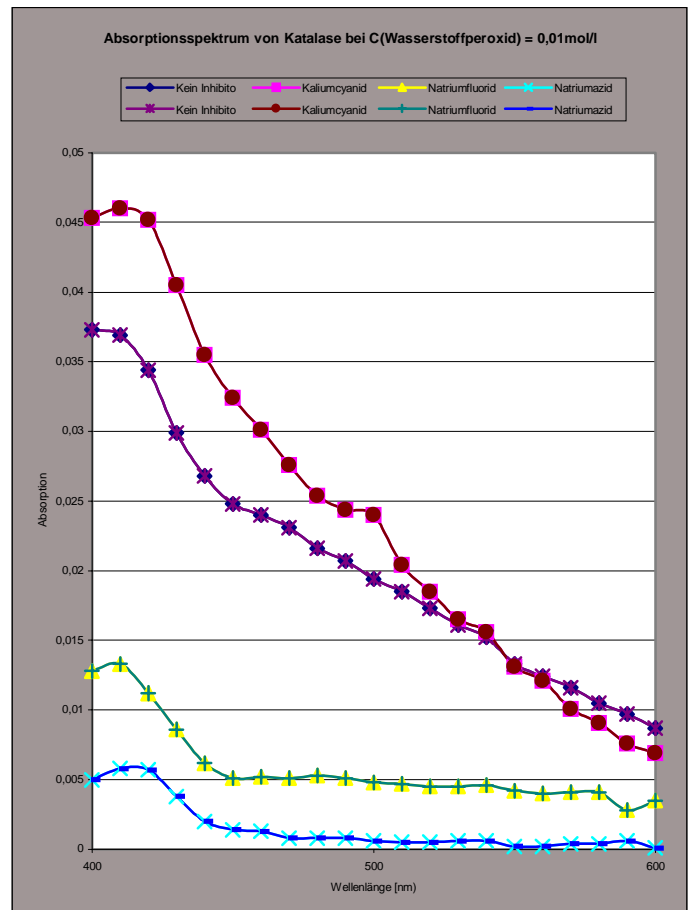
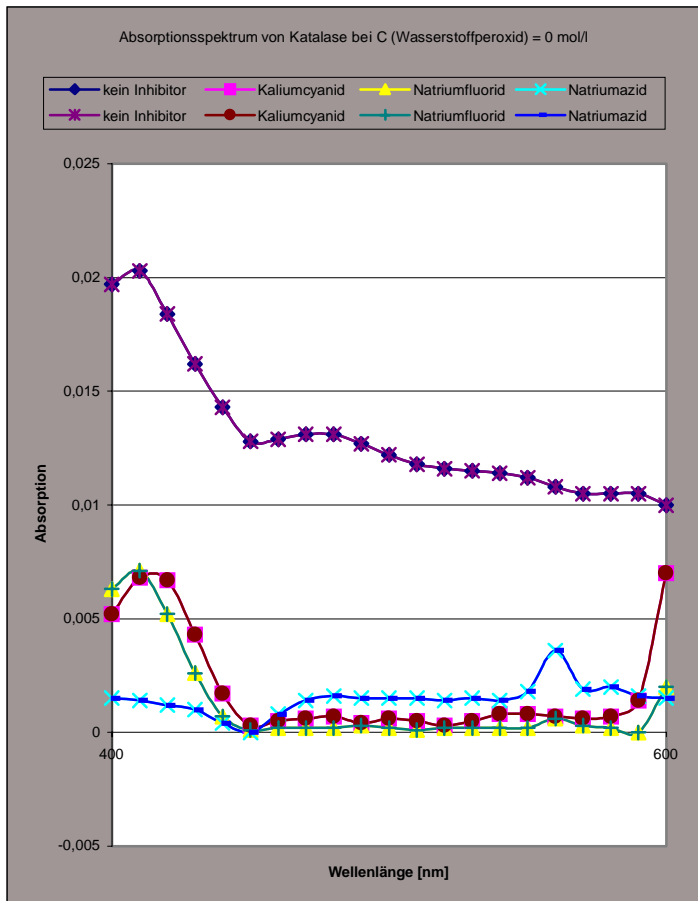
Absorptionsmessung mit NaF-Lösung (0.11mg/ml)

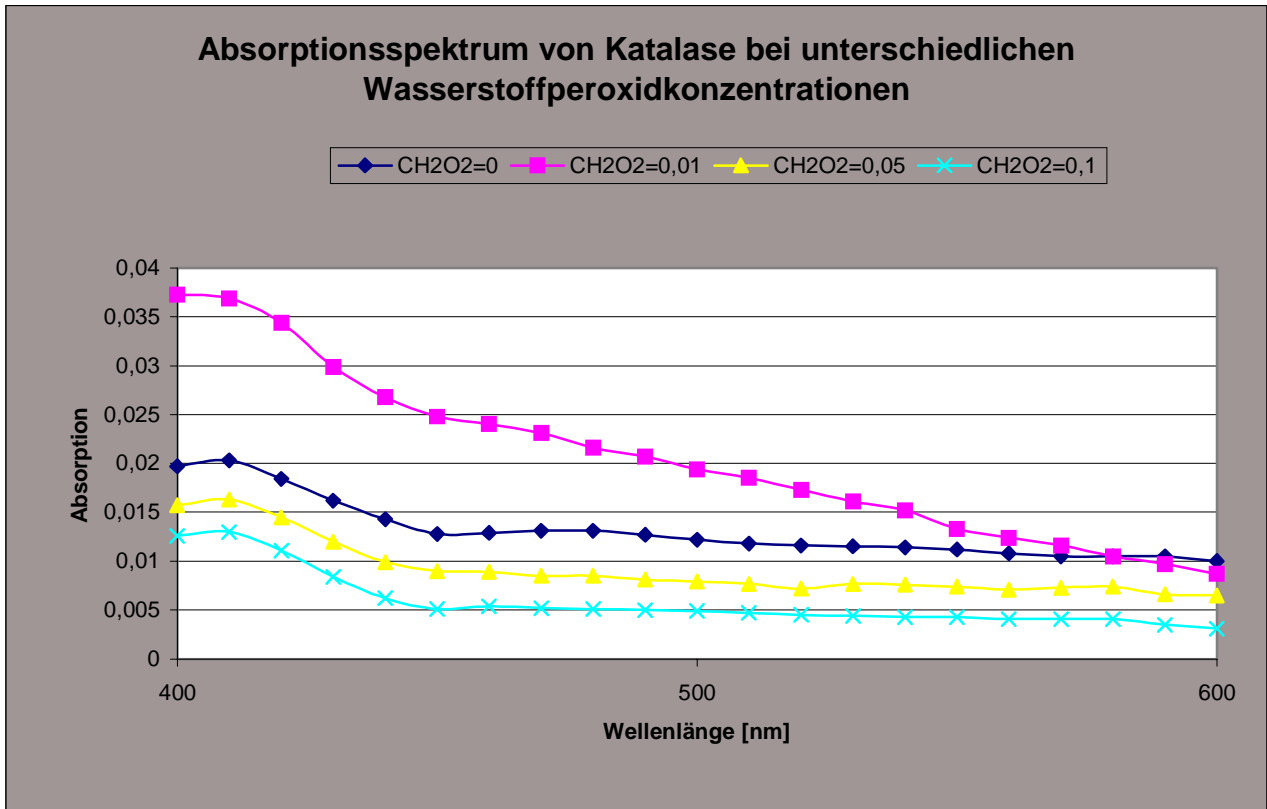
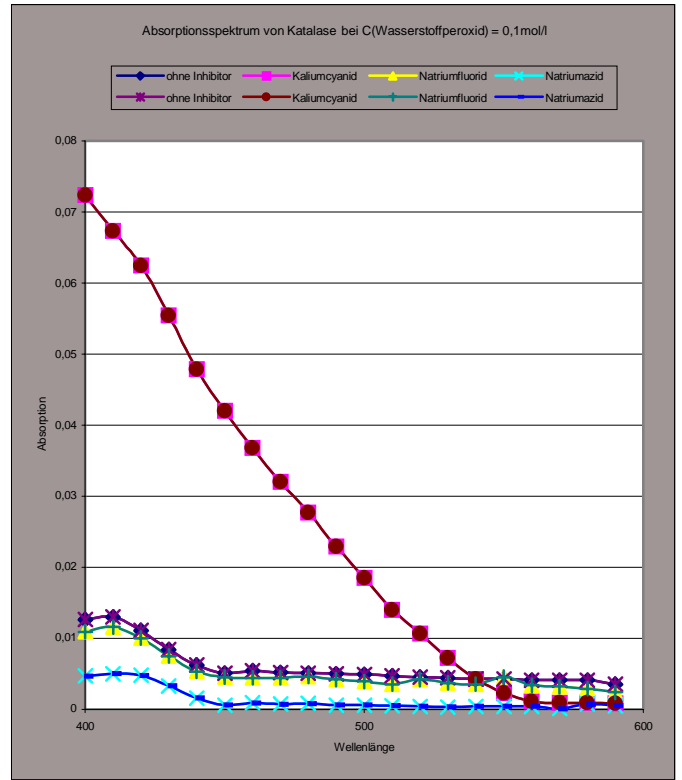
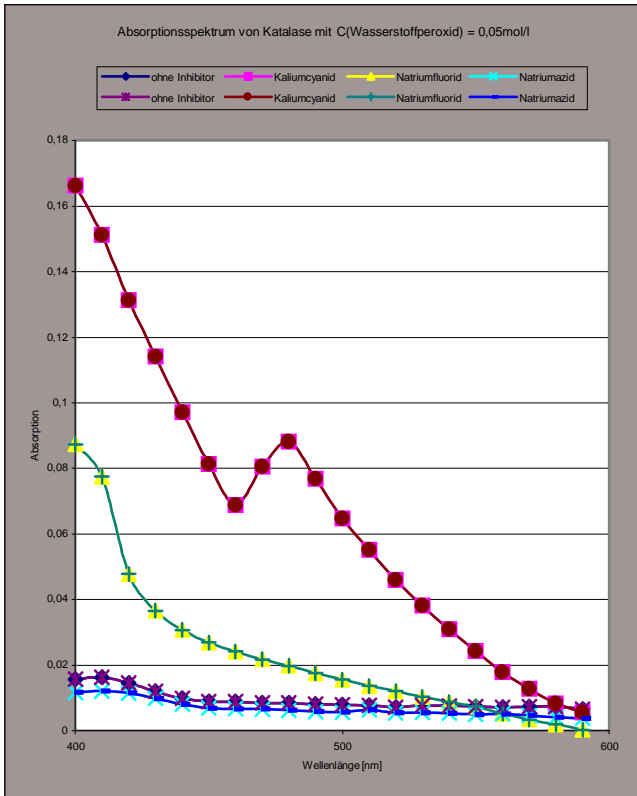
Wellenlänge [nm]	H ₂ O ₂ -Konzentration [mol/l]			
	0	0.01	0.05	0.1
400	0.0063	0.0128	0.0874	0.0109
410	0.0071	0.0133	0.0775	0.0116
420	0.0052	0.0112	0.0478	0.0100
430	0.0026	0.0086	0.0366	0.0075
440	0.0007	0.0062	0.0307	0.0053
450	0.0001	0.0051	0.0269	0.0045
460	0.0002	0.0052	0.0242	0.0044
470	0.0002	0.0051	0.0218	0.0044
480	0.0002	0.0053	0.0198	0.0046
490	0.0003	0.0051	0.0176	0.0042
500	0.0002	0.0048	0.0156	0.0039
510	0.0001	0.0047	0.0137	0.0035
520	0.0002	0.0045	0.0121	0.0042
530	0.0002	0.0045	0.0103	0.0037

540	0.0002	0.0046	0.0088	0.0035
550	0.0002	0.0042	0.0074	0.0045
560	0.0006	0.0040	0.0053	0.0034
570	0.0003	0.0041	0.0034	0.0032
580	0.0002	0.0041	0.0020	0.0029
590	0.0000	0.0028	0.0003	0.0024
600	0.0020	0.0035	0.0001	0.0034

Absorptionsmessung mit NaN_3 -Lösung (0.1mg/ml)

Wellenlänge [nm]	H_2O_2 -Konzentration [mol/l]			
	0	0.01	0.05	0.1
400	0.0015	0.0050	0.0117	0.0047
410	0.0014	0.0058	0.0121	0.0050
420	0.0012	0.0057	0.0115	0.0048
430	0.0010	0.0038	0.0099	0.0033
440	0.0004	0.0020	0.0081	0.0016
450	0.0000	0.0014	0.0069	0.0006
460	0.0008	0.0013	0.0067	0.0009
470	0.0014	0.0008	0.0066	0.0007
480	0.0016	0.0008	0.0062	0.0008
490	0.0015	0.0008	0.0059	0.0006
500	0.0015	0.0006	0.0057	0.0006
510	0.0015	0.0005	0.0064	0.0005
520	0.0014	0.0005	0.0055	0.0004
530	0.0015	0.0006	0.0056	0.0003
540	0.0014	0.0006	0.0054	0.0004
550	0.0018	0.0002	0.0050	0.0004
560	0.0036	0.0002	0.0052	0.0004
570	0.0019	0.0004	0.0047	0.0001
580	0.0020	0.0004	0.0041	0.0007
590	0.0016	0.0006	0.0038	0.0005
600	0.0015	0.0001	0.0039	0.0010





Hier wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums in Folge der Umwandlung der aktiven Katalase in die weniger aktive Form $\text{Cat}(\text{OH})_3\text{OOH}$ sichtbar. Daraus, daß das Absorptionsspektrum der Katalase bei einer H_2O_2 -Konzentration von 0.01 mol/l im Vergleich zum Absorptionsspektrum bei $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0$ mol/l deutlich höher liegt, läßt sich schließen, daß die aktive Katalase im Enzym-Substrat-Komplex „aktiver“ das Licht absorbiert, als wenn keine Substratbindung vorliegt.

Bei erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen zeigt sich eine Abnahme der Absorption, da die aktive Katalase bei höherer Substratkonzentration in ihre inaktivere Form gebracht wurde, die eine geringere Substrataffinität als die aktive Form aufweist.

Reinheitszahl nach Theorell

In diesem Versuchsteil soll die Reinheit des isolierten Enzyms festgestellt werden. Dies wird unter Zuhilfenahme der Reinheitszahl von Theorell bewerkstelligt. Hierzu wird die Absorption der Enzymlösung bei 450nm und 280nm gemessen. Anschließend wird der Quotient E_{405}/E_{280} gebildet.

Als Fraktionen werden die IA- sowie die GF-Fraktion verwendet.

Der Literaturwert beträgt 3.5, was für unser Enzym eine Reinheit von $(0.437/3.5 \times 100\%) = 12.5\%$ bedeutet. Eine Parallelmessung an einer Standard-Katalase unter denselben Bedingungen hätte einen Referenzwert gegeben. Solch eine Messung wurde allerdings versäumt, so daß sich die Reinheit nicht abschätzen läßt.

IA-Fraktion:

Wellenlänge [nm]	405	280	E_{405}/E_{280}
ΔE (unverdünnt)	0.126	0.263	0.479
ΔE (1:10 verdünnt)	0.067	0.141	0.475

Mittelwert: 0.477

GF-Fraktion

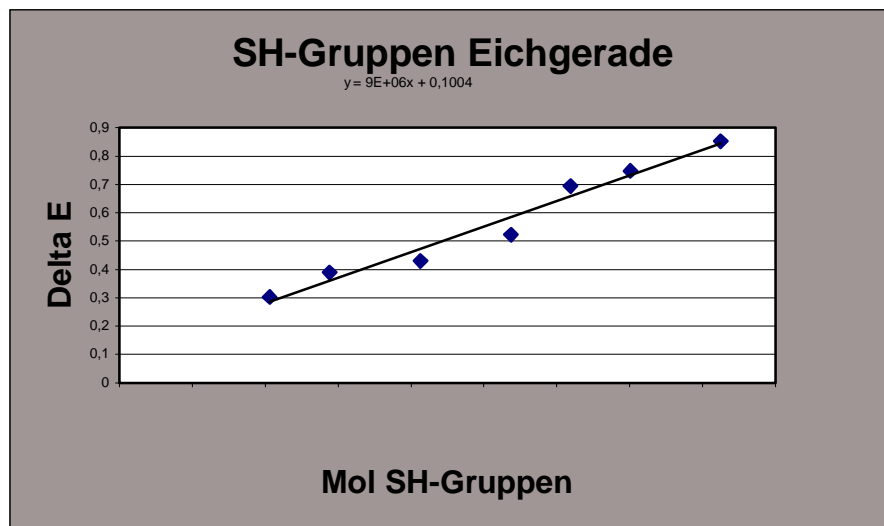
Wellenlänge [nm]	405	280	E_{405}/E_{280}
ΔE (unverdünnt)	0.282	0.641	0.440
ΔE (1:10 verdünnt)	0.026	0.060	0.433

Mittelwert: 0.437

Bestimmung von SH-Gruppen mit Ellman-Reagenz

Eichgerade: Zur Erstellung einer Eichgeraden wird Glutathion mit einer Konzentration von 0.25mg/ml als Eichlösung verwendet.

V_{Puffer} [ml]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$V_{\text{Eil-Reag}}$ [ml]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
V_{Eichlsg} [ml]	0.025	0.035	0.05	0.065	0.075	0.085	0.1
$V_{\text{dest. Wasser}}$ [ml]	0.475	0.465	0.45	0.435	0.425	0.415	0.4
V_{gesamt} [ml]	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
ΔE	0.040	0.064	0.114	0.125	0.137	0.170	0.180



Die Geradengleichung lautet: $\Delta E = 10^7 \cdot n(\text{SH-Gruppen, frei}) + 0,1004$

Messung mit der IA-Fraktion

$V_{\text{Puffer}} [\text{ml}]$	0.5	0.5	0.5	0.5
$V_{\text{Eil-Reag.}} [\text{ml}]$	0.02	0.02	0.02	0.02
$V_{\text{IA-Frakt.}} [\text{ml}]$	0.056	0.05	0.025	0.2
$V_{\text{dest. Wasser}} [\text{ml}]$	0.4	0.45	0.475	0.3
$V_{\text{gesamt}} [\text{ml}]$	0.976	1.02	1.02	1.02
ΔE	0.163	0.140	0.069	0.514
Mol SH-Gruppen	$6,96 \cdot 10^{-9}$	$4,4 \cdot 10^{-9}$	$-3,49 \cdot 10^{-9}$	$4,60 \cdot 10^{-8}$

Dem ersten Wert liegt ein Pipettierfehler zugrunde. Er wird hier aufgeführt, da derselbe Fehler auch bei der Folgemessung begangen wurde.

Denaturierung mit Na-Dodecylsulfat

Zur Bestimmung der Gesamtmenge an SH-Gruppen müssen die vorhandenen Disulfidbrücken zuert denaturiert werden. Hierzu dient SDS (Natriumdodecylsulfat).

Der hierbei verwendete Puffer ist zu 1% an Natriumdodecylsulfat gesättigt.

$V_{\text{Puffer}} [\text{ml}]$	0.5	0.5
$V_{\text{Eil-Reag.}} [\text{ml}]$	0.02	0.02
$V_{\text{IA-Frakt.}} [\text{ml}]$	0.056	0.2
$V_{\text{dest. Wasser}} [\text{ml}]$	0.4	0.3
$V_{\text{gesamt}} [\text{ml}]$	0.976	1.02
ΔE	0.176	0.696
Mol SH-Gruppen	$8,4 \cdot 10^{-9}$	$6,62 \cdot 10^{-8}$

Die eingesetzte Volumenmenge an Enzymlösung enthält bei $V=0.056\text{ml}$

Die Bestimmung der Gesamtzahl der SH-Gruppen der Katalase berechnet sich nach:

$$\text{Anzahl der SH-Gruppen} = \frac{\text{Mole SH - Gruppen (lt. Eichgerade)}}{\text{eingesetzte Mole Protein}}$$

Hierzu muß zuerst der bei der Proteinbestimmung gemessene Proteingehalt (mg/ml) auf mol/ml umgerechnet werden.

Katalase besitzt das Molekulargewicht 240000 Dalton. 1 Dalton ist definiert als die Masse eines Atoms vom Atomgewicht 1 in der chemischen Atomgewichtsskala. Umgerechnet auf Gramm gilt die Beziehung:

$$1 \text{ Dalton} = 1,66018 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

Das Molekulargewicht der Katalase in Gramm beträgt somit $3.984 \cdot 10^{-16}$.

1 mol Katalase besteht aus $6.022 \cdot 10^{23}$ Molekülen Katalase (Avogadro), somit besitzt Katalase die Molmasse:

$$3.984 \cdot 10^{-16} \text{ g} \cdot 6.022 \cdot 10^{22} \text{ mol}^{-1} = 239916480 \text{ g/mol}$$

Die IA-Fraktion besitzt einen Proteingehalt von 3.74 mg/ml. Das sind also $0.00374 \text{ g/ml} : 239916480 \text{ g/mol} = 1.559 \cdot 10^{-11} \text{ mol/ml}$.

Für die Messung werden einmal a) 0.056ml und einmal b) 0.2ml eingesetzt.

Das entspricht a) $8.730 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$ und b) $3.118 \cdot 10^{-11} \text{ mol}$ Katalase.

Anzahl der SH-Gruppen = a) $8,4 \cdot 10^{-9} : 8.730 \cdot 10^{-12} = 962.2 \text{ SH-Gruppen}$

b) $6,62 \cdot 10^{-8} : 3.118 \cdot 10^{-11} = 2123.2 \text{ SH-Gruppen}$

1475.30 SH-Gruppen ohne SDS bei 0,2ml Enzymlösung

Deutlich zu sehen ist, daß die Konzentration an freien SH-Gruppen durch Behandlung mit SDS zunimmt, was bedeutet, daß im Protein noch Disulfidbindungen vorlagen, die nun durch SDS gespalten wurden.

Die genaue Anzahl an SH-Gruppen konnte mit dieser Methode leider nicht bestimmt werden. Möglicherweise wurde der Proteingehalt falsch berechnet. Fehler im Rechenweg sind bei solch einem Ergebnis auch nicht auszuschließen.

Ein Literaturwert, der genauen Aufschluß über die Anzahl der Disulfidbrücken in der Katalase gibt, konnte nicht ausfindig gemacht werden. Die ermittelten Werte scheinen uns allerdings viel zu hoch. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es für uns fraglich, ob die verwendete Methode im Falle der Katalase sinnvoll ist.

Proteinbestimmung über UV-Extinktion

Diese Methode basiert auf der Absorption der beiden Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280nm. Störungen durch Nukleotide und Nukleinsäuren werden durch Messung der Extinktion bei 260nm beseitigt.

Über die Formel von Warburg und Christian: $C_{\text{Protein}} \text{ (mg/ml)} = 1.55 \cdot E_{280} - 0.76 \cdot E_{260}$ läßt sich der Proteingehalt der jeweiligen Fraktion bestimmen.

UV-Extinktion (280/260 nm)

Frakt.	Rohh.	Ü ₂	Ü ₃	Ü ₄	Ü ₅	Ü ₆	Ü ₇	GF	IA
E ₂₆₀	1.857	1.602	0.672	0.104		0.137	0.493	0.571	0.222
E ₂₈₀	1.726	1.523	0.797	0.129		0.159	0.686	0.680	0.328
Verd.	1:100	1:100	1:100	1:100	1:10	1:10	1:10	Keine	1:10
C _{Prot.} [mg/ml]	1.264	1.143	0.725	0.121		0.142	0.689	0.620	0.340

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wird der Quotient aus Gesamtkativität und Gesamtproteingehalt gebildet.

Fraktion	Proteingehalt[mg/ml]	Frakt.vol. [ml]	Gesamt- Prot.[mg]	Ausbeute [%]	Spez. Akt. [U/mg]
Rohhom.	127.6	290	37023	100	40.56
Ü ₁		200			
Ü ₂	115.4	230	26552	72	47.24
Ü ₃	73.2	250	18306	49	36.90
Ü ₄	12.2	200	2444	6.6	542.31
Ü ₅		200			
Ü ₆	1.56	240	375	1.0	220.51
Ü ₇	7.579	50	377	1.0	2726.48
GF	0.62	50	31	0.08	5117.74
IA	3.74	64	239	0.65	3222.19

Abschließende Bewertung

Der Versuch hat gezeigt, daß die Untersuchung des Enzyms Katalase mit den hier verwendeten Methoden in einigen Fällen keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern konnte.

Ein Problem ergibt sich durch die Eigenschaften (extrem hohe Aktivität, Übergang der aktiven in die inaktive Form bei erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen) des verwendeten Enzyms.

Während einige Arbeitsmethoden anschauliche Ergebnisse lieferten (Michaelis-Menten-Kinetik mit und ohne Inhibition, Bestimmung der Aktivität über UV-Spektroskopie), brachten andere Methoden keine befriedigenden Erkenntnisse (SH-Gruppen-Bestimmung nach Ellman, Elektrophorese-Gele).

Während bei den Gelen von mangelnder Erfahrung der Studenten ausgegangen werden kann (weshalb diese hier nur exemplarisch im Anhang aufgeführt werden), stellt sich uns bei der SH-Gruppen-Bestimmung die Frage der Eignung der Methode für den Untersuchungszweck.

Trotz der nicht immer eindeutig interpretierbaren Ergebnisse hat der Versuch aufgrund der verschiedenen anzuwendenden Arbeitsmethoden ein besseres Kennenlernen dieser Methoden gefördert.

Anhang 1: Literaturliste

Stryer: Biochemie, 4. Auflage

Lehninger/Nelson/Cox: Prinzipien der Biochemie 2. Auflage

Pingoud/Urbanke Arbeitsmethoden der Biochemie

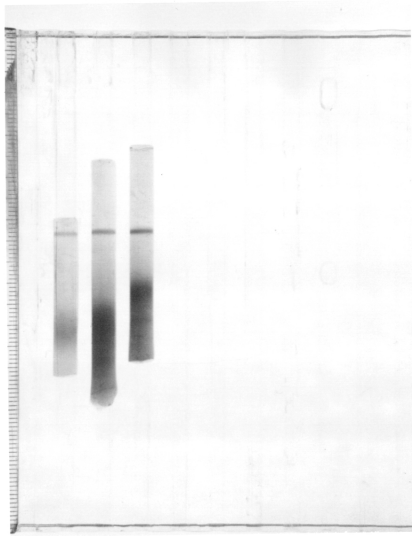
Diverse Websites wie www.catalase.com und weitere, deren URL leider nicht gebookmarkt wurde

Praktikumsskript

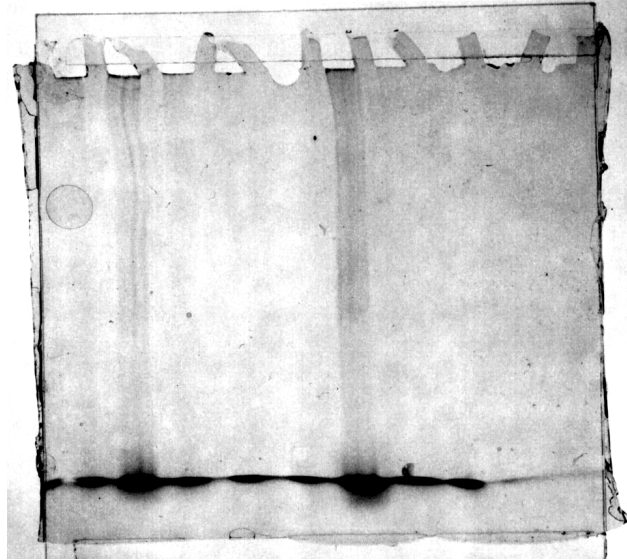
Römpp Chemielexikon, 9. Auflage

Anhang 2: Dokumentation der Gelelektrophoresen

1. Anodische PAGE



2. SDS-PAGE



Die hier gezeigten Gele lassen nur den Frontmarker deutlich erkennen. Einzelne Banden können auf beiden nicht ausgemacht werden. Dieses Ergebnis führen wir hauptsächlich auf mangelnde Erfahrung in der Anwendung von Gelelektrophorese zurück. So können hier nur drei von insgesamt zwölf Röhrchengelen gezeigt werden, da der Rest beim Herauslösen aus der Apparatur zerstört wurde. Auch bei der SDS-PAGE waren mehrere Anläufe nötig, um das Gel heil für die eigentliche Messung zu präparieren (Gießen, Überführen in die Meßapparatur, Laufzeitbestimmung, Entfärbung).