

Enzymatischer Test

A.3

Kursprotokoll – Josef Riedl (Gr. 7) – 11/2003

Sinn des Versuches

Zur Bestimmung des Reaktionsumsatzes von Enzymen wird in der Regel die Konzentration eines Substrates, die auf irgendeinem Wege leicht zu bestimmen ist, zeitlich verfolgt. Bei optisch aktiven Substanzen bietet sich ein optischer Test bei entspr. Wellenlänge an. Vor allem bei sehr kleinen Reaktionsumsätzen ist aber eine deutlich empfindlichere Messmethode erforderlich. Hier ist der Einsatz von Radioisotopen zur Markierung sinnvoll, da die Radioaktivität in einer bestimmten Fraktion des Ansatzes messtechnisch leicht z.B. im Szintillationszähler ermittelt werden kann. (Voraussetzung ist, da die radioaktiven Atome unabhängig von der Reaktion erhalten bleiben, dass Reaktionsprodukte und verbleibende Edukte zuverlässig getrennt gemessen werden können.) Auch Versuch A.2 zeigt bereits das Prinzip einer solchen Messung. Im vorliegenden Experiment wurde konkret ein normaler Enzymtest (Verfolgen des Zeitverhaltens der Reaktion; K_M -Wert-Bestimmung) der DolP-Mannosyl-Transferase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktion, die im Zusammenhang mit der Proteinglycosylierung bedeutsam ist:



GDP-Man dient als aktivierte Form der Mannose für diese Reaktion; DolP-Man stellt die aktivierte Form von Mannose für die folgenden Glycosylierungsschritte dar.
 Die Radioaktivität wurde in Form von C-14-markierter Mannose (Edukt) eingebracht und tritt nach Ablauf der Reaktion im Produkt auf. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass das Edukt wasserlöslich, das Produkt aber lipidlöslich ist und die beiden Radioaktivitäts-Pools leicht über Phasentrennung separat gemessen werden können.

Arbeitsschritt	Bedeutung
<p>Prämix Ansatz von: 1.25 µg DolP 180 µl Triton X-100 180 µl Tris-HCl pH 7.2 360 µl Wasser 180 µl GDP-*Man Mischen</p> <p>Vorbereitung von Fiolax-Gläschen mit je 60 µl Prämix</p>	<p>Vorbereitung eines Prämix für alle Proben = Edukt = Detergens, Durchmischung der Substrate = Puffer, Stabilisierung des pH = wässrige Phase (Lipidphase s.u.) = markiertes Substrat; 0,025 µCi; C-14-Aktivität 296 µCi/µmol</p> <p>geeignet für Zentrifugation, Lösungsmittel-Abblasevorrichtung etc.</p>
<p>Reaktion Zugabe von 10 µl Membranen</p> <p>Inkubation bei RT, Zeiten variabel</p>	<p>enthält Enzym; Start der Reaktion</p> <p>Zeiten siehe einzelne Versuchsteile</p>
<p>Zugabe von 2 ml Chloroform/Methanol (Volumen 3:2)</p>	<p>Stop der Reaktion durch Enzym-Denaturierung</p>

Mischen

Phasentrennung

Zugabe von 0,4 ml MgCl₂ (4 mM)
Mischen
Zentrifugation (2 min)

Absaugen der Upper Phase

Zugabe von 1,5 ml Upper-Phase-Lösung
Mischen
Zentrifugation (2 min)
Absaugen der Upper Phase
Zweimalige Wiederholung

Weiterbehandlung je nach Fragestellung

Verdeutlichung der wässrigen Phase; Emulsion
Phasentrennung:
Upper phase - Wasser / MgCl₂ mit GDP, GDP-Man (Edukt)
Lower Phase - zugegebenes C/M mit Dol, DolP, DolP-Man (Produkt)
Interphase (evtl.) mit Protein

Nur das Produkt wird weiter verfolgt.

synthetische Lösung, entspricht Zusammensetzung der Upper Phase ohne Verunreinigung
nochmalige Extraktion von Verunreinigungen aus der organischen Phase,
Reinigung (Waschen)

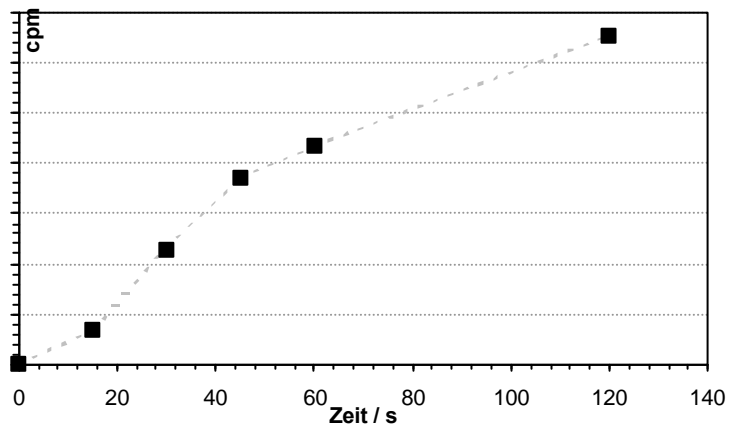
Endprodukt: gereinigte Lower Phase mit r.a. DolP-Man (Produkt).

Zeitliche Verfolgung des Reaktionsablaufes

Es wurden 6 Proben nach obigem Schema behandelt. Die Inkubationszeiten lagen bei 0, 15, 30, 45, 60, 120 Sekunden. Die nach Ablauf der Reaktion und Reinigung erhaltene Lipidphase mit DolP-Man (radioaktiv) wurde durch Abblasen eingetrocknet, um Quencheffekte durch das organische Lösungsmittel zu minimieren, und jeweils im Szintillationszähler gezählt. Die gemessene Radioaktivität, als Maß für die entstandene Produktmenge, wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ergab sich folgender Zeitverlauf:

R.a. in der Lipidphase	
Zeit / sec	cpm
0	42
15	1360
30	4601
45	7414
60	8682
120	13085

Radioaktivität in der Lipidphase



Wie erwartet stieg die gemessene Aktivität schon nach einer Anlaufphase von wenigen Sekunden an, in dem Maße, da Produkt gebildet wurde und die Reaktion nach rechts verlief. Nach einiger Zeit flacht jedoch die Steigung der Kurve ab, da entweder ein Edukt allmählich verbraucht wurde, ein stabiler Gleichgewichtszustand (im Sinne von Nettoaktionsfluss Null) erreicht wurde oder durch Zusammenspiel mit Folgereaktionen (das Enzym lag nicht in reiner Form vor) ein Fließgleichgewicht aufgebaut worden ist.

Bestimmung des apparenten K_M -Wertes

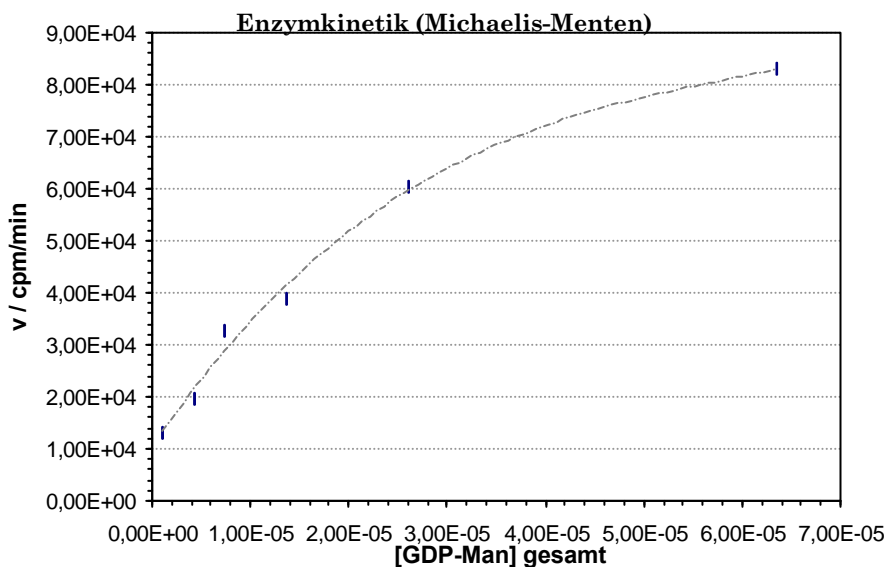
Zur Ermittlung des K_M -Wertes (bzw. des unter gegebenen Bedingungen apparenten Wertes) mußte die Umsatzrate des Enzyms in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen werden. Als Substrat wurde GDP-Man eingesetzt. Da die markierte Form (aus Kosten- und Entsorgungsgründen) nur in geringen Mengen verfügbar ist, wurden die höheren Konzentrationen durch Zugabe von nicht-markiertem Substrat erreicht. Dies muss selbstverständlich bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Weitere 6 Proben (#10-15) wurden für diesen Versuchsteil genau nach obigem Schema angesetzt. Zusätzlich zu Prämix und Start-Lösung wurden jedoch je 10 µl GDP-Man-Lösung (nicht markiert) in verschiedener Konzentration zugegeben. Die Inkubationszeit betrug überall nur 20 Sekunden.

Nach Gewinnung der Lipidphase und Eintrocknen (wie oben) wurden auch hier 6 Messwerte für die Aktivität gewonnen. Alle wichtigen Daten sind in der Tabelle zusammengefaßt:

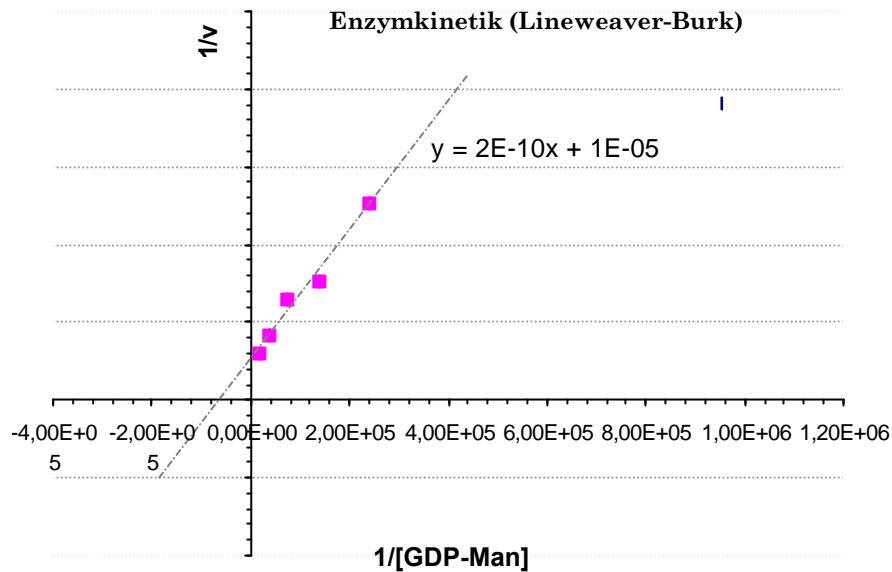
Enzymkinetik							
Ansatz	10	11	12	13	14	15	
GDP-Man-Zugabe	0	2,5E-10	5,00E-10	1,00E-09	2,00E-09	5,00E-09	mol
GDP-Man*-Zugabe	8,39E-11	8,39E-11	8,39E-11	8,39E-11	8,39E-11	8,39E-11	mol
[GDP-Man] ges.	1,05E-06	4,17E-06	7,30E-06	1,35E-05	2,60E-05	6,35E-05	mol/l
Anteil GDP-Man*	1,00E+00	2,51E-01	1,44E-01	7,74E-02	4,03E-02	1,65E-02	–
Aktivität	4381	1651	1,57E+03	1,00E+03	8,08E+02	4,56E+02	cpm
Aktivität (korrigiert)	4,38E+03	6,57E+03	1,09E+04	1,29E+04	2,01E+04	2,76E+04	cpm
Inkubationszeit	20	20	20	20	20	20	sec
v	1,31E+04	1,97E+04	3,27E+04	3,88E+04	6,02E+04	8,29E+04	cpm/min
1 / [GDP-Man]	9,54E+05	2,40E+05	1,37E+05	7,38E+04	3,84E+04	1,57E+04	l/mol
1 / v	7,61E-05	5,07E-05	3,06E-05	2,58E-05	1,66E-05	1,21E-05	min/cpm

Die Geschwindigkeit wurde als cpm pro min Inkubationszeit definiert. Damit konnte keine Maximalgeschwindigkeit in mol/min oder Wechselzahl ermittelt werden; für die Bestimmung des K_M -Wertes ist die Skalierung bzw. Einheit der Geschwindigkeit jedoch unerheblich. Für die Michaelis-Menten-Kinetik wurde die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die GDP-Man-Endkonzentration aufgetragen:



Es ergab sich der typische Verlauf der Michaelis-Menten-Kinetik. Wird als $v(\max)$ $9E04$ cpm/min angenommen, so ergibt sich ein $1/2v(\max)$ von $4,5E04$ cpm/min und ein zugehöriger Konzentrationswert von etwa $1,6E-05$ als Wert für K_M .

Für die Auftragung nach Lineweaver-Burk wurden die Kehrwerte zur Auftragung verwendet:



Ein Wert (ganz rechts) wurde wegen zu starker Abweichung von der Kurve nicht zur Auswertung verwendet. Es muß bei der Gewichtung der Aussagekraft einzelner Werte die Kehrwertbildung berücksichtigt werden, die im rechten Teil der Kurve aus sehr kleinen Meßabweichungen (zudem bei den kleinsten gemessenen, also fehleranfälligen, Konzentration) große Abweichungen im Diagramm erzeugt.

Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der 1/c-Achse liegt bei -50000. Daraus errechnet sich ein K_M -Wert von $2E-05$.

Charakterisierung der Reaktionsprodukte

Drei Proben (#7-9) wurden zunächst nach dem ganz oben angegebenen Schema behandelt. Die Lipidphase wurde jeweils mit Stickstoff zur Trockne abgeblasen. Diese so gewonnene „eingetrocknete Lipidphase“, die das von der Reaktion gelieferte radioaktive DolP-Man enthält, wurde jetzt in drei verschiedenen Ansätzen unterschiedlich weiterbehandelt:

7) Aufnahme in 20 µl Chloroform/Methanol (3:2) (=C/M)

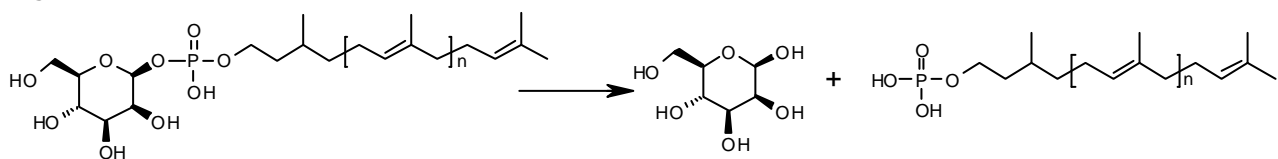
8) Aufnahme in 30 µl Propanol + 400 µl HCl (0.02 M), Inkubation 45 min bei 100°C; Zugabe von 2 ml C/M

9) Aufnahme in 30 µl Propanol + 200 µl NaOH (0.1 M), Inkubation 15 min bei 37°C; Zugabe von 2 ml C/M und 200 µl Wasser

Bei den Proben 8 und 9 bildeten sich je zwei Phasen, die getrennt und jeweils eingetrocknet wurden. Die Lipidphase (L) wurde in beiden Fällen in 30 µl C/M, die wässrige Phase in 30 µl MeOH (70%) aufgenommen. Die so erhaltenen Proben 7, 8L, 8U, 9L, 9U wurden auf einer Kieselgel-G-Platte aufgetragen und mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) chromatographiert.

Die radioaktiven Banden wurden mit einem Phospho-Imager abgebildet.

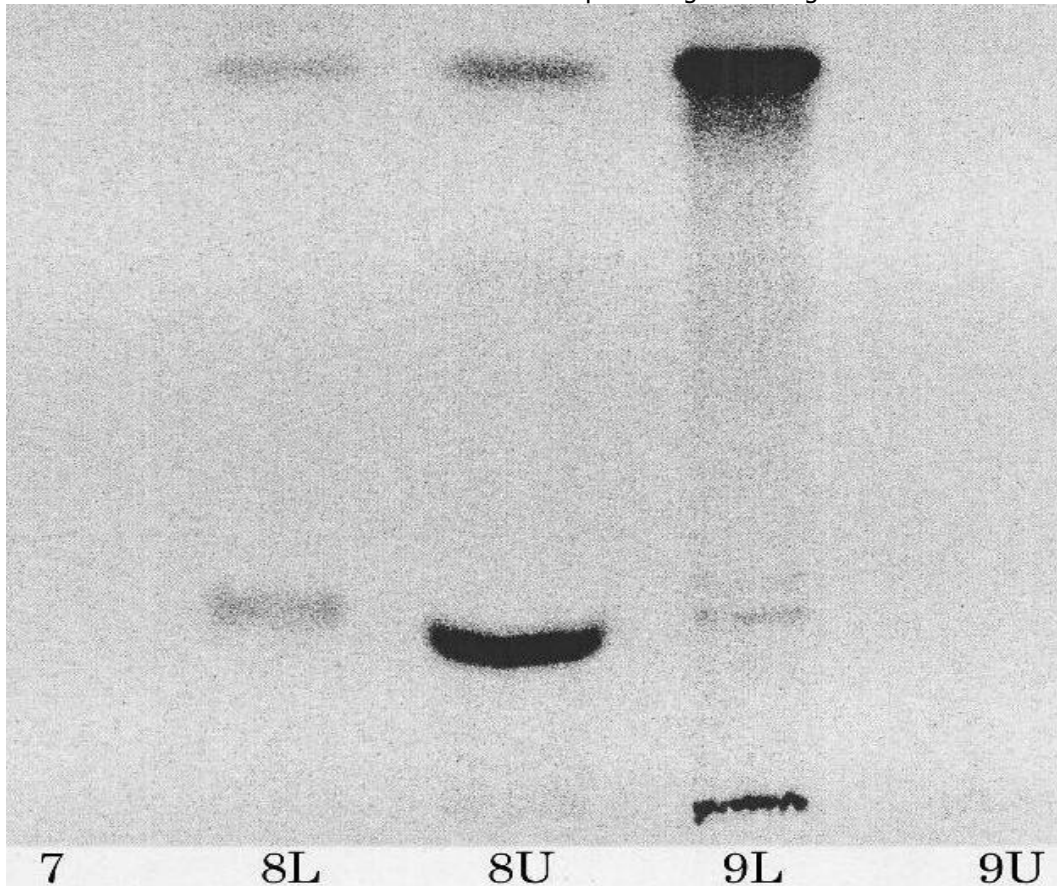
Die Bedingungen im Ansatz 8 und 9 entsprechen denen einer sauren bzw. basischen Hydrolyse. Dabei würde folgende Reaktion ablaufen:



Für die Auswertung der DC war zu berücksichtigen, daß

- nur das Edukt DolP-Man und das Produkt Mannose radioaktiv markiert war und im Imager sichtbar wurde;
- die markierte Spezies DolP-Man sich in der Lipidphase, die markierte Mannose sich in der wässrigen Phase befinden sollte.

Die DC-Platte stellte sich nach der Aufnahme durch den Phospho-Imager wie folgt dar:



Die Banden am oberen Rand (zunehmend hydrophob) entsprechen DolP-Man, die Banden im unteren Drittel entsprechen der hydrophilen Mannose.

Bei Ansatz 8 (saure Hydrolyse) trat in der wässrigen Phase (U) eine starke Mannose-Bande auf; die schwache Mannose-Bande in der Lipidphase entspricht einer Verunreinigung durch unsaubere Phasentrennung oder einer kleinen Menge Mannose aufgrund von Verteilungseffekten. Die Edukt-Bande trat auch auf (in der wässrigen Phase gleicher Störeffekt), war jedoch deutlich schwächer. Die saure Hydrolyse war in diesem Fall erfolgreich.

Bei Ansatz 9 (basische Hydrolyse) fällt die extrem starke Edukt-Bande in der Lipidphase und das Fehlen der Produktbande in der wässrigen Phase auf. Eine basische Hydrolyse ist also nicht erfolgt.

DolP-Mannose ist also unter sauren Bedingungen spaltbar, aber gegen eine basische Hydrolyse stabil.

Beim Ansatz 7 reichte die Probenmenge nicht aus, um auswertbare Banden zu erhalten. Es hätte sich sonst ein ähnliches Bild wie bei 9L ergeben müssen (nur Edukt).