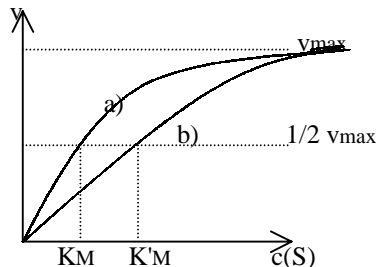


## Block Enzymkinetik

- 1.) Was versteht man unter kompetitiver Hemmung? Skizzieren Sie den Kurvenverlauf  
a) ohne Inhibitor b) bei Anwesenheit eines Inhibitors

Als kompetitive Hemmung bezeichnet man die Konkurrenz eines Substrates und eines Inhibitors um das aktive Zentrum eines Enzyms, wobei der Inhibitor vom Enzym nicht umgesetzt werden kann. Die Menge des Umsatzes ist dabei abhängig von der Konzentration des Inhibitors UND des Substrats.



- 2.) a) Definieren sie den Begriff "katalytische Konzentration"  
b) Sie bestimmen bei Versuch 2 (= Xanthinoxidase), ausgehend von 50  $\mu\text{l}$  Probe, einen Substratumsatz von 0,015  $\mu\text{mol} / \text{min}$ . Errechnen Sie hieraus die katalytische Konzentration der Xanthinoxidase-Probe.
- a) Der Begriff existiert in keinem mir bekannten Lehrbuch, nur im Protokollheft. Aufgrund der dort angeführten Einheit handelt es sich am ehesten um die "Wechselzahl": das ist die Menge an Substrat, die in einer bestimmten Zeit von einer definierten Menge Enzym umgesetzt wird. Die Einheit ist U/l, wobei eine Unit U = 1  $\mu\text{mol}$  Umsatz / 1 min.  
b) Substratumsatz = 0,015  $\mu\text{mol} / \text{min}$  = 0,015 U, bei 50  $\mu\text{l}$  Probe ergibt sich:  
0,015U /  $5 \cdot 10^{-5} \text{l}$  = 300 U/l
- 3.) Legen Sie kurz dar, unter welchen Annahmen und Bedingungen die Michaelis-Menten-Gleichung Gültigkeit hat.
- die enzymatische Reaktion darf nur von der Konzentration EINES Reaktionspartners abhängig sein (deshalb wird in Versuch 2 Pyruvat im Überschuß zugegeben, damit die Reaktion nur von der Konzentration des NADH abhängt)
  - die Rückreaktion vom Produkt P zum Substrat S ( $P \rightarrow S$ ) kann vernachlässigt werden, da nur die Anfangsphase der Reaktion betrachtet wird (in der noch (fast) kein Produkt vorliegt).
  - Die Teilreaktion  $ES \rightarrow EP$  erfolgt so schnell, daß dies die Reaktionsgeschwindigkeit nicht beeinflusst. Damit ergibt sich als vereinfachte Reaktionsgleichung:  $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ . Geschwindigkeitsbestimmend bei dieser Reaktion ist der Schritt  $ES \rightarrow E + P$
  - die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  ist nur möglich, wenn alles Enzym durch Substrat besetzt ist und freiwerdendes Enzym sofort wieder durch Substrat besetzt wird. Es muß also ein Substratüberschuß vorliegen.
- 4.) Skizzieren Sie die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration (S). Beschriften sie das Diagramm.

Siehe Aufgabe 1) Kurve a

- 5.) Welche Größen sind Bestandteil der Michaelis-Menten-Gleichung? Legen sie kurz dar, unter welchen Annahmen und Bedingungen sie Gültigkeit hat.

$$\text{M-M-Gleichung: } v = (v_{\text{max}} * c(S)) / (K_M + c(S))$$

Größen: v = Reaktionsgeschwindigkeit

$v_{\text{max}}$  = Reaktionsgeschwindigkeit bei 100% Umsatz

c(S) = Substratkonzentration

$K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante

Gültigkeit: siehe 3.)

6.) Was ist der Unterschied zwischen Coenzym (=Cosubstrat) und Prosthetischer Gruppe? Geben sie jeweils 2 Beispiele an.

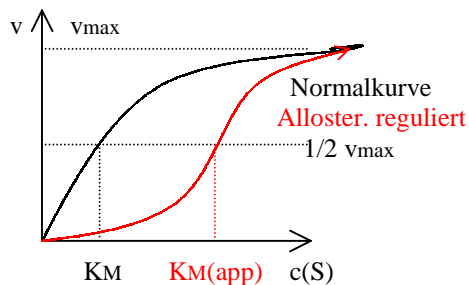
Coenzym:

- Ist nicht fest an den Proteinanteil des Enzyms gebunden, daher reversibel abspaltbar
- Wird bei der Reaktion "verändert" (ist also kein "echter" Katalysator)
- z.B. NADH, NADPH

Prosthetische Gruppe:

- Ist fest ans Enzym gebunden, Abspaltung ist irreversibel und führt zur Denaturierung des Enzyms
- Wird bei der Reaktion zwar auch kurzzeitig verändert, aber danach am SELBEN Ort wieder regeneriert (ist ein "echter" Katalysator)
- z.B. FAD, FMN (auch das HÄM des Hämoglobins ist eine Prosthetische Gruppe)

7.) Skizzieren Sie die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei einem Enzym, das durch allosterische Effektoren reguliert wird. Beschriften sie das Diagramm.



Allosterisch Reguliert heißt: Effektor tritt in Wechselwirkung mit der "regulatorischen" Untereinheit des Enzyms und bewirkt damit eine Strukturänderung der katalytischen Untereinheit. Die Substratbindung wird dadurch entweder erleichtert (Allosterischer Aktivator) oder erschwert (Allosterischer Inhibitor). Der  $K_M$  einer solchen Kurve wird als  $K_M$  (app) bezeichnet.

8.) Definieren Sie den  $K_M$ - Wert.

Der  $K_M$  - Wert entspricht derjenigen Substratkonzentration  $c(S)$ , bei der die enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Er stellt damit ein Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym dar.

Einheit: mol/l

Bedingung: Es muß eine Enzymkatalysierte Reaktion sein, die den M-M-Gleichungsbedingungen folgt.

9.) Was versteht man unter der Lineweaver-Burk-Transformation? Welchen Vorteil bietet diese Darstellung?

Sie ist eine doppelt reziproke Auftragung der Michaelis-Menten-Darstellung. Dazu wird die M-M-Gleichung in eine Geradengleichung ( $y=ax+b$ ) umgewandelt:

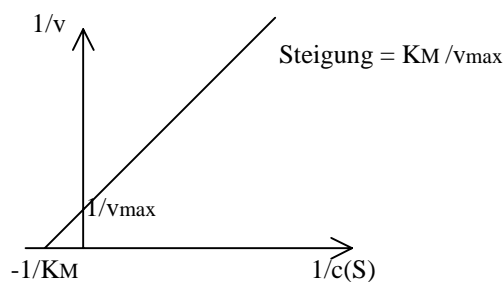
$$v = (v_{\max} * c(S)) / (K_M + c(S)) \quad | \ /(-1)$$

$$1/v = (K_M + c(S)) / (v_{\max} * c(S)) \quad | \text{ Umformung}$$

$$1/v = K_M / (v_{\max} * c(S)) + c(S) / (v_{\max} * c(S)) \quad | \text{ Aufräumen}$$

$$1/v = K_M / v_{\max} * 1/c(S) + 1/v_{\max}$$

Vorteil: die Darstellung als gerade ermöglicht die exakte Darstellung von  $v_{\max}$  und  $K_M$ .

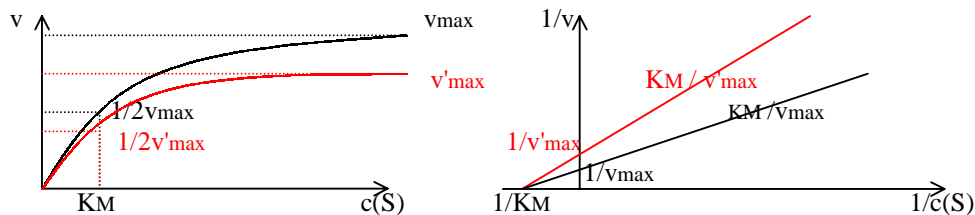


10.) Legen Sie anhand des Praktikumsversuches kurz dar, wie der  $K_M$  - Wert der Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt wird.

- LDH
- Reaktion:  $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus} \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^{\oplus}$
- Voraussetzungen: Bedingungen der M-M-Kinetik müssen erfüllt sein. Pyruvat muß im Überschuß vorliegen, damit die Reaktion nur von der Konzentration des NADH abhängt.
- Ablauf:
1. Pyruvat + Phosphatpuffer + NADH-Lösung zusammenrühren
  2. Extinktionsmessung d. NADH
  3. Je 100  $\mu\text{l}$  LDH dazugeben, vortexen
  4. Extinktionsmessung nach 5, 15, 30, 45, 60.....120 sek (Anhand der Extinktion kann man den Umsatz von NADH beobachten.)
  5. Auftragen der Extinktion gegen die Zeit, am Beginn der Kurve eine Tangente anlegen, die Steigung entspricht der Initialgeschwindigkeit der Reaktion.
  6.  $K_M$  -Wert ausrechnen, entsprechende Kurve(Gerade) in Lineweaver-Burk-Auftragung einzeichnen.

11.) Wie ist eine nicht-kompetitive Hemmung definiert? Fertigen Sie hierzu eine Skizze an.

Die Bindung des Inhibitors erfolgt nicht am aktiven Zentrum des Enzyms, sondern irgendwo außerhalb. Damit ist eine reversible Inhibitorbindung möglich, unabhängig davon, ob das Enzym schon Substrat gebunden hat oder nicht. Ein Komplex mit gebundenem Inhibitor ist natürlich katalytisch inaktiv oder wenig aktiv, es ist also bei einer nicht-kompetitiven Hemmung immer ein wenig Enzym gehemmt, die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt,  $v_{\text{max}}$  wird nie erreicht. Aber  $K_M$  bleibt genauso wie bei einer nicht gehemmten Reaktion, da die Affinität zwischen Substrat und Enzym nicht behindert ist!!!



12.) Was versteht man unter Isoenzymen? Geben Sie hierfür 2 Beispiele an.

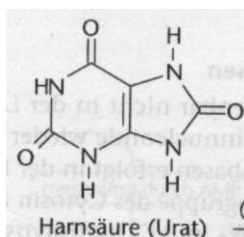
Isoenzyme katalysieren die gleiche Reaktion, haben aber einen unterschiedlichen Aufbau. Entstanden sind sie vermutlich durch Mutationen, da sie meist nur minimale Änderungen in der Primärstruktur aufweisen. Isoenzyme unterscheiden sich damit:

- In der Elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit (so auftrennbar)
- Im Isoelektrischen Punkt
- Manchmal in der Veränderten Substrataffinität

Beispiele:

- LDH besteht aus 4 Untereinheiten. Es bestehen aber 2 verschiedene Ketten (A+B), welche diese Untereinheiten ausmachen. Damit ergeben sich 5 verschiedene Isoenzyme: 4\*A, 3A1B, 2A2B, 1A3B, 4\*B
- Hexokinase; hier gibt es 3 Isoenzyme (HK1 - HK3)

13.) Geben sie die Strukturformel der Harnsäure an. Warum ist die Harnsäure eine Säure, obwohl sie keine Carboxylgruppe aufweist?



Säuren geben  $\text{H}^+$  Ionen ab. (In dieser Formel ist die Harnsäure vollständig oxidiert, vollständig reduziert besitzt jedes O auch ein H ;-))  
Da Harnsäure sekundäre OH-Gruppen besitzt, kann es relativ leicht  $\text{H}^+$  abgeben. Harnsäure ist also eine schwache Säure.

- 14.) a) was versteht man unter einer kompetitiven Hemmung?  
b) Skizzieren sie hierzu anhand einer Sättigungskurve den Kurvenverlauf  
- ohne Inhibitor  
- mit Inhibitor

Siehe 1.)

- 15.) Welche Reaktion wird durch die Lactatdehydrogenase katalysiert? Bitte Reaktionsgleichung angeben.

