



ADDITIVE Whitepaper

Nutzung von Origin in der Enzym-Kinetik

Ausgangssituation

Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktionen bei vorgegebener Enzymkonzentration aber verschiedener Substratkonzentration berechnen und grafisch darstellen.

Fragestellung

Für die Berechnung der dafür eingesetzten Gleichung, der so genannten "Michaelis-Menten-Gleichung" werden mathematische Funktionen zur linearen und nicht-linearen Regression benötigt.

Lösung

Einlesen der unterschiedlichen Daten, die verschiedene Substratkonzentrationen festlegen, Erstellen und Berechnen der Gleichung, grafische Darstellung mittels Liniendiagramm.

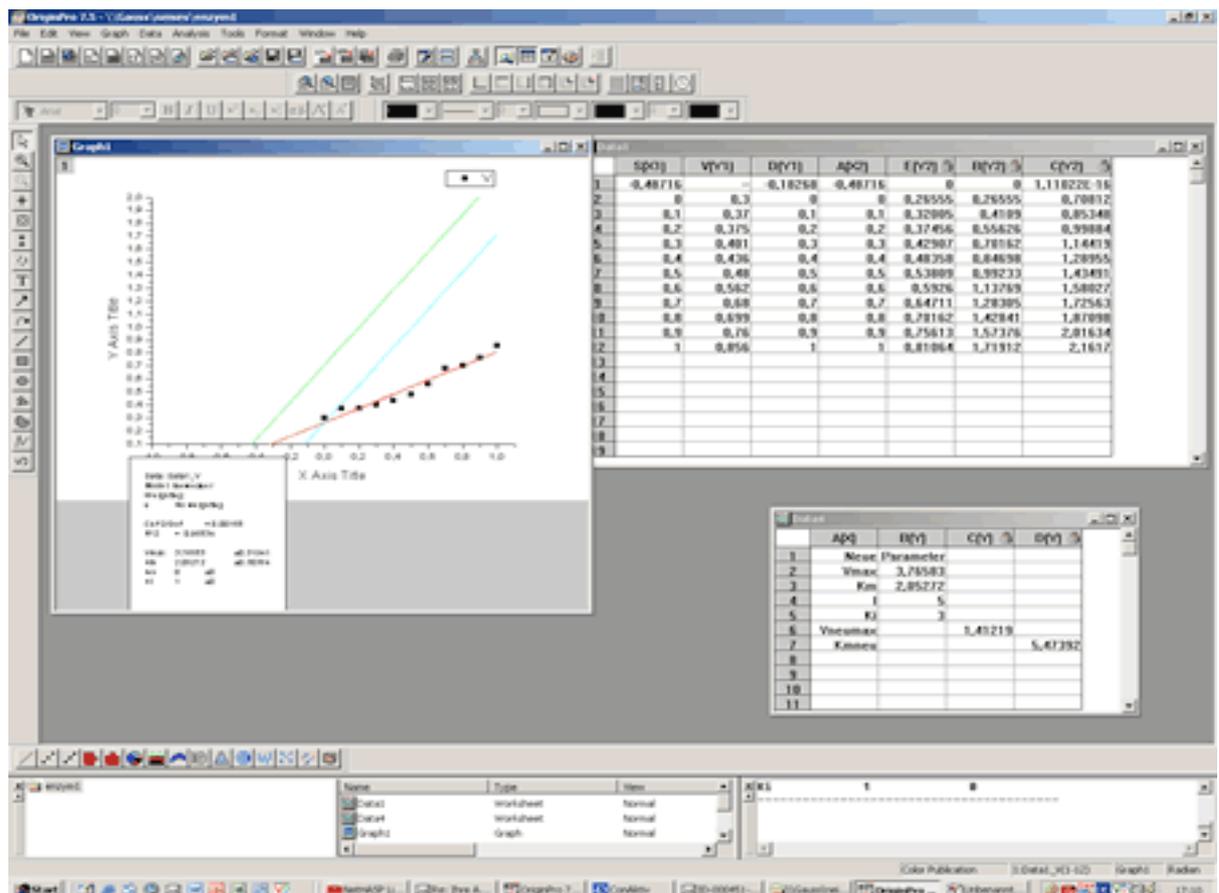


Abb. Origin Benutzeroberfläche



ADDITIVE Whitepaper

Ein Beispiel: Enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit

Die sog. Michaelis-Menten-Kinetik beantwortet die Frage:

„Mit welcher Geschwindigkeit verläuft eine enzymatische Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, wenn eine bestimmte Enzymkonzentration vorgegeben wird.“

Zur Bestimmung dieser Geschwindigkeit gibt es die sog. Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = v$$

Abb. 2 Formel der Michaelis-Menten-Gleichung

Wobei V_{\max} die höchste erreichbare Geschwindigkeit, K_m die Michaelis-Konstante und $[S]$ die Substratkonzentration ist.

Durch geeignete Umformung dieser Gleichung kann man eine grafische Darstellung nach Lineweaver und Burk nutzen.

$$\frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{V_{\max} [S]} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

Abb. Umformung der Gleichung nach Lineweaver und Burk

Dies führt dazu, dass in der grafischen Darstellung, mittels einer linearen Regression, eine, den Messwerten entsprechende, sinnvolle Gerade entsteht deren Schnittpunkt mit der Y-Achse der Wert $1/V_{\max}$ ist.

Nachdem in einem Experiment, bei immer gleicher Enzymkonzentration, die jeweilige Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung für unterschiedliche Substratkonzentrationen gemessen wurden, kann man diese in Origin als Datenpunkte darstellen.



ADDITIVE Whitepaper

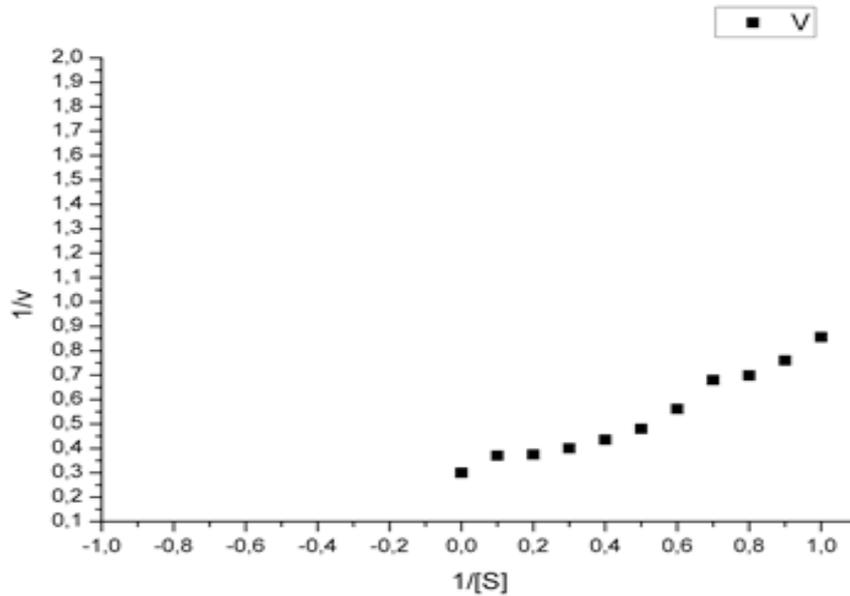


Abb. Erstellung einer Regressionsgerade

Für diese Datenpunkte kann man nun eine Regressionsgerade erstellen lassen. Dies geschieht mittels des Advanced Fitting Tool.

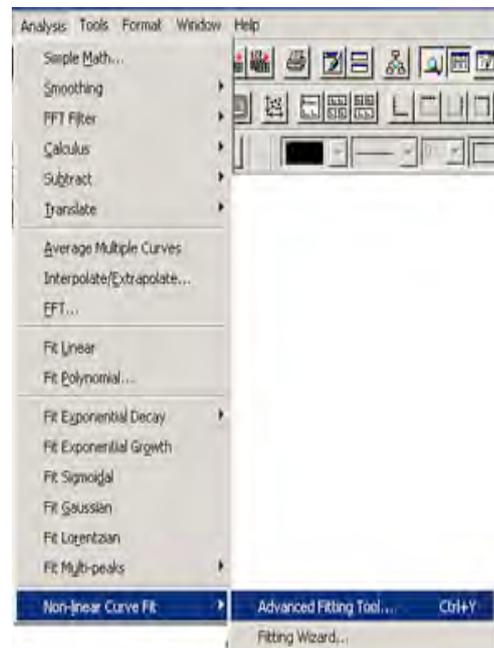


Abb. Origin-Auswahlmenü



ADDITIVE Whitepaper

Innerhalb dieses Tools gibt es viele verschiedenen Möglichkeiten sowohl eine lineare als auch eine nicht-lineare Regression durchzuführen. In diesem Beispiel wurde eine eigene Funktion zur Regression erstellt.

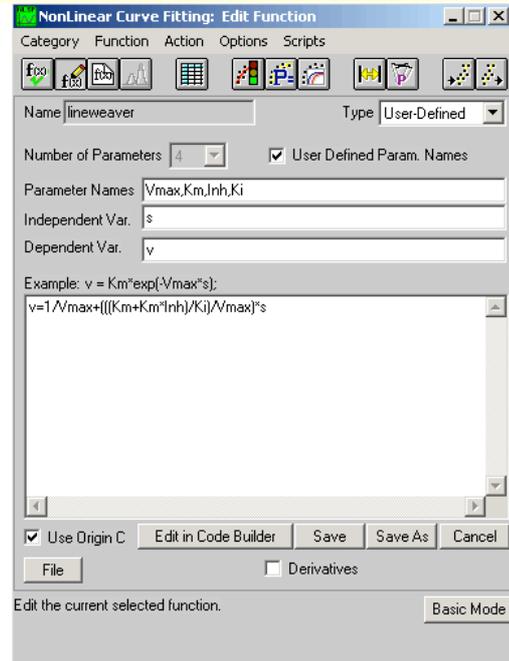


Abb. Dialogfenster des Nonlinear Curve Fitting Tools

Mittels dieser Regression werden auch die Werte V_{max} und K_m bestimmt und die Gerade wird in den Graphen eingezeichnet (im Graphen rot dargestellt).

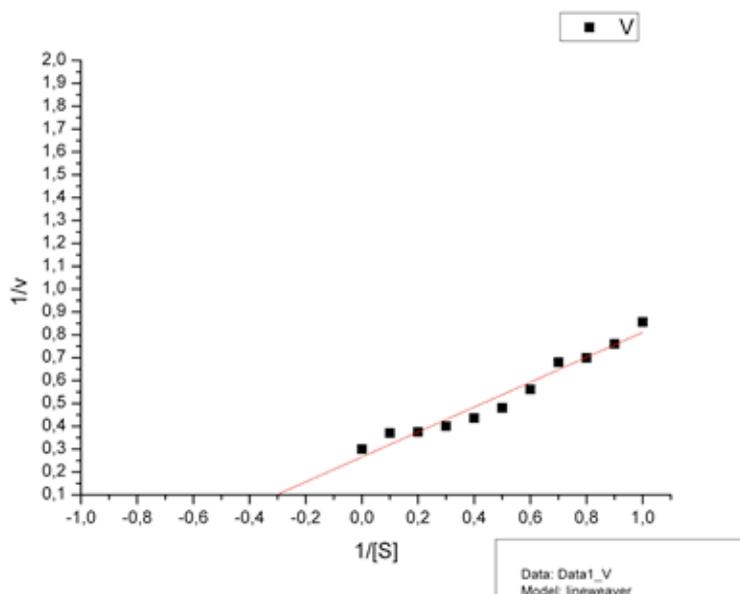


Abb. Grafische Darstellung von V_{max} und K_m



ADDITIVE Whitepaper

Kompetitive Hemmung des Enzyms

Bei der kompetitiven Hemmung eines Enzyms wird ein Hemmstoff verwendet, der große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat hat und somit mit dem Substrat um die Bindung mit dem Enzym konkurriert. Hierdurch verändert sich nicht die maximal erreichbare Geschwindigkeit V_{max} , sondern die

Affinität des Enzyms zum Substrat erniedrigt sich, so dass sich die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) scheinbar erhöht. Die dadurch erzielte Hemmung kann nur durch einen erhöhten Überschuss an Substrat kompensiert werden. Dadurch ergibt sich eine neue Steigung der Geraden:

Wobei $[I]$ für den Hemmstoff und K_i für die Konkurrenzreaktion steht (diese Werte sind bekannt)..

$$K_{mneu} = \frac{K_m + K_m \frac{[I]}{K_i}}{V_{max}}$$

Abb. Veränderung der Gleichung

Aufgrund dieser neuen Steigung kann man eine neue Gerade einzeichnen, die die kompetitiv gehemmte Reaktion darstellt.

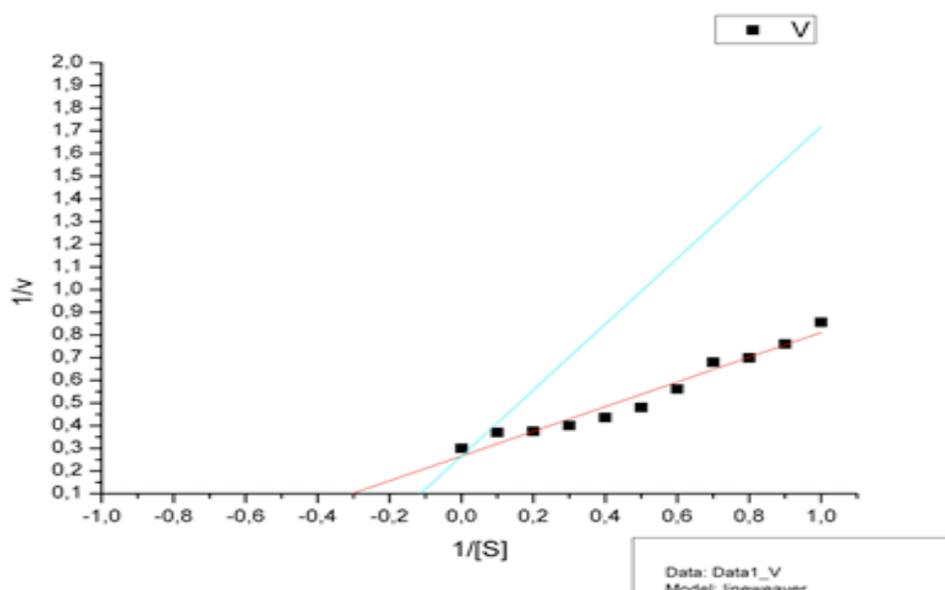


Abb. Grafische Darstellung der veränderten Reaktion

Hier Türkis dargestellt.



ADDITIVE Whitepaper

Nicht-kompetitive Hemmung des Enzyms

Ein Hemmstoff kann sich aber auch mit einer anderen Bindungsstelle des Enzyms verbinden und die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen. In diesem Fall wird die maximale Geschwindigkeit (V_{\max}) herabgesetzt, während sich die Affinität des Enzyms zum Substrat nicht verändert.

Dadurch verändert sich nicht nur die Steigung, sondern auch die Konstante der Geraden.

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

Wobei V_{\max} für die neue maximale Geschwindigkeit steht.

Aufgrund der neuen Steigung und der neuen Konstanten kann man die neue Gerade einzeichnen, die die nicht-kompetitiv gehemmte Reaktion darstellt.

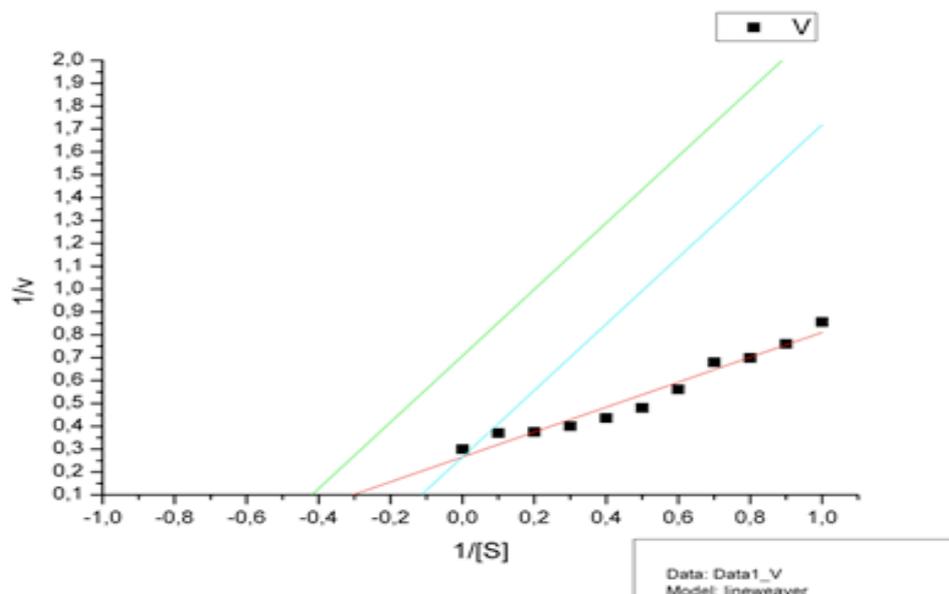


Abb. Liniendiagramm: Darstellung der nicht-kompetitiven Hemmung

Hier Grün dargestellt.



ADDITIVE Whitepaper

Das Gesamtbild in Origin sieht jetzt wie folgt aus:

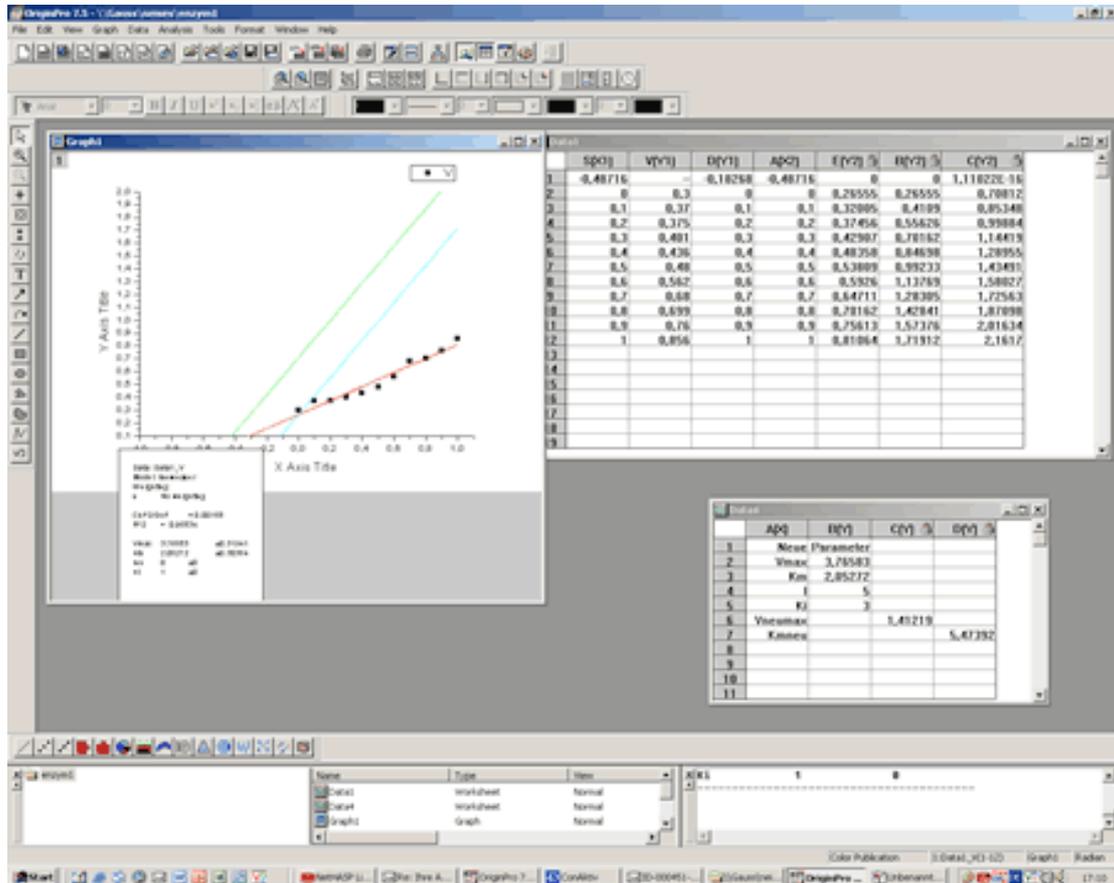
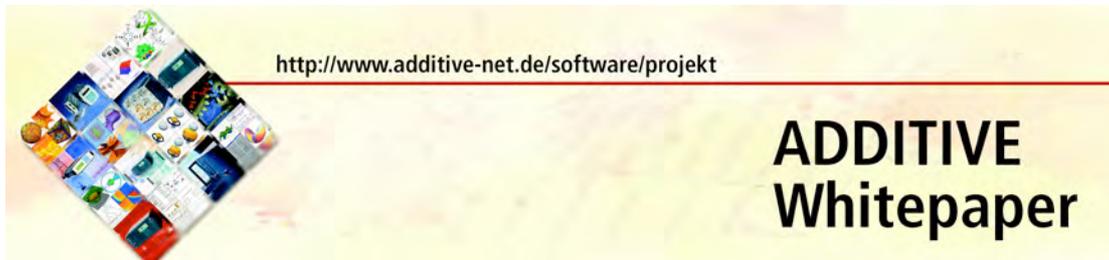


Abb. Origin Benutzeroberfläche

Damit sich die Datentabellen der einzelnen Geraden automatisch, bei anderen Werten von Vmax und Km, erneuern, sollte man die Spalten mit einer sich automatisch updatenden

Formel füllen. Das Menü hierfür können Sie mittels eines Rechtsklicks auf die entsprechende Spalte und der Auswahl Set Column Values erreichen.



In diesem Menü können Sie eine Formel für die, sowohl ganze als auch, wenn dies gewünscht wird, einen Teil der gewählten

Spalte eingeben. Damit diese Spalte automatisch geupdated wird sollte ein Haken bei AutoUpdate sein.

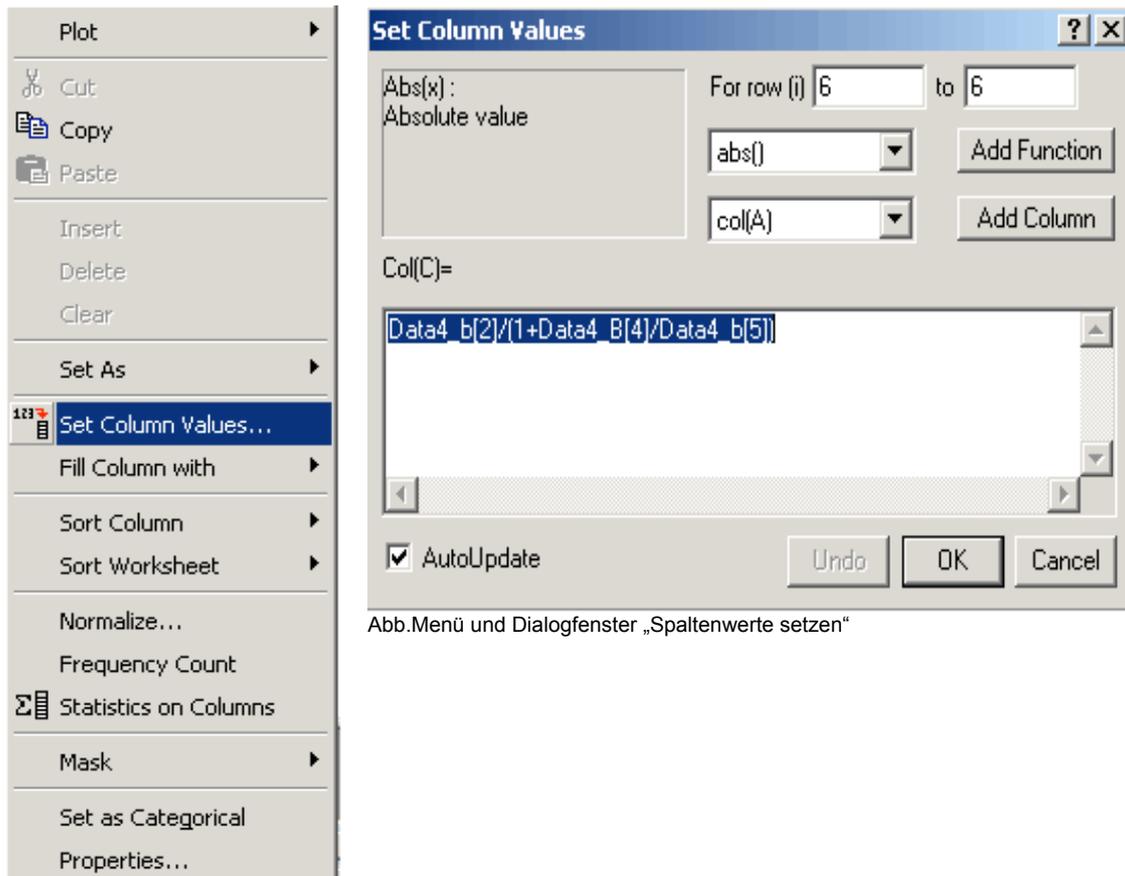


Abb. Menü und Dialogfenster „Spaltenwerte setzen“

Kontakt
 Gerne beraten wir Sie zu Ihrer individuellen Projektlösung, rufen Sie uns an unter
 Tel.: 06172-5905-30 oder kontaktieren Sie uns per E-Mail unter solutions@additive-net.de
 Mehrere Informationen zu Origin: <http://www.additive-net.de/origin>
 E-Mail: origin@additive-net.de