



---

# BIOZYME ØVELSE 1

## ENZYMKINETIK

BIO LINK

# FORMÅL OG BAGGRUND

Formålet med øvelsen er at bestemme de enzymkinetiske parametre, der knytter sig til enzymet  $\beta$ -lactamases omdannelse af substratet CENTA. Dvs. den maksimale hastighed  $V_{\max}$ , Michaelis-Menten konstanten  $K_m$  og ligevægtskonstanten for omdannelsen  $k_{\text{cat}}$ , som beskriver enzymets katalytiske kapacitet. Altså hvor mange molekyler substrat et molekyle enzym kan omdanne i sekundet eller minuttet.

Da omdannelsen af substratet CENTA fører til en forøgelse af absorbansen ved 405 nm, indledes øvelsen med en række absorbansmålinger ved forskellige koncentrationer af CENTA målt over tid (minutter). Ud fra disse målinger er det muligt at beregne de ovennævnte parametre.

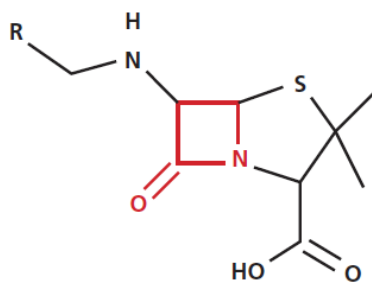
## $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTIKA OG $\beta$ -LACTAMASER

### Faktaboks 2

#### $\beta$ -LACTAM-RINGEN

$\beta$ -lactam-ringe er firlede ringe, som udgør den funktionelle struktur i størstedelen af den antibiotika, der bruges i dag, inklusiv penicillin. Se figur 1.

Antibiotika bruges til at bekæmpe bakterielle infektioner.  $\beta$ -lactam antibiotika virker ved at hæmme de enzymer, der er ansvarlige for dannelse af bakteriens cellevæg. Disse enzymer hedder **transpeptidaser**. Ved at hæmme transpeptidaserne bliver trykforskellen mellem cellens indre og ydre så stort, når den vokser, at cellen lyserer, dvs. den ”springer i luften”, og bakterien dør.  $\beta$ -lactam antibiotika indeholder alle en  $\beta$ -lactam-ring, som er den funktionelle del, der binder til det aktive site i transpeptidase. Se figur 1 og faktaboks 2.



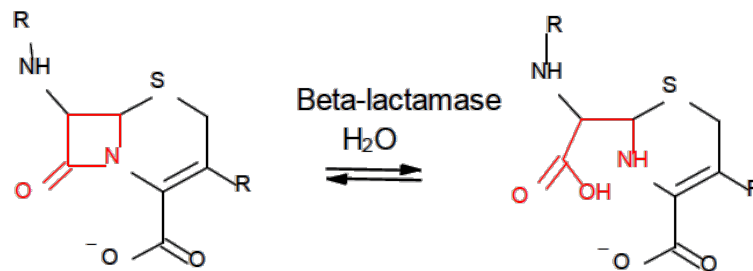
Figur 1. Grundstrukturen af penicilliner. R er den del af penicillin, der kan variere.  $\beta$ -lactam-ringen er fremhævet i rød.

### Faktaboks 1

#### HYDROLYSE OG HYDROLASER

Når et molekyle **hydrolyseres**, spaltes det i to under tilstedeværelse af et vandmolekyle (af latin, *hydro* = vand og *lysere* = spalte). Et enzym der katalyserer en hydrolyse, hedder en **hydrolase**. Den spontane hydrolyse (uden enzym) af  $\beta$ -lactamer er meget langsom. For at have bedre chancer for at overleve antibiotika har visse bakterieceller derfor udviklet enzymer, der kan hydrolysere  $\beta$ -lactam-stofferne, før de når at gøre skade. Disse enzymer hedder  **$\beta$ -lactamaser**.  $\beta$ -lactamaser er altså en underklasse af hydrolaserne.

Mutationer af de bakterielle gener for enzymklassen  **$\beta$ -lactamaser** har givet bakterierne et forsvar mod  $\beta$ -lactam antibiotika. En  $\beta$ -lactamase katalyserer hydrolysen af  $\beta$ -lactam-ringen, **figur 2**. Derved åbnes den firleddede ring. Når  $\beta$ -lactam-ringen først er hydrolyseret, har antibiotikummet mistet dets virkning og kan derfor ikke længere hæmme transpeptidaserne, **faktaboks 1**.



**Figur 2.** Hydrolyseringen af  $\beta$ -lactam ringen katalyseret af  $\beta$ -lactamase.

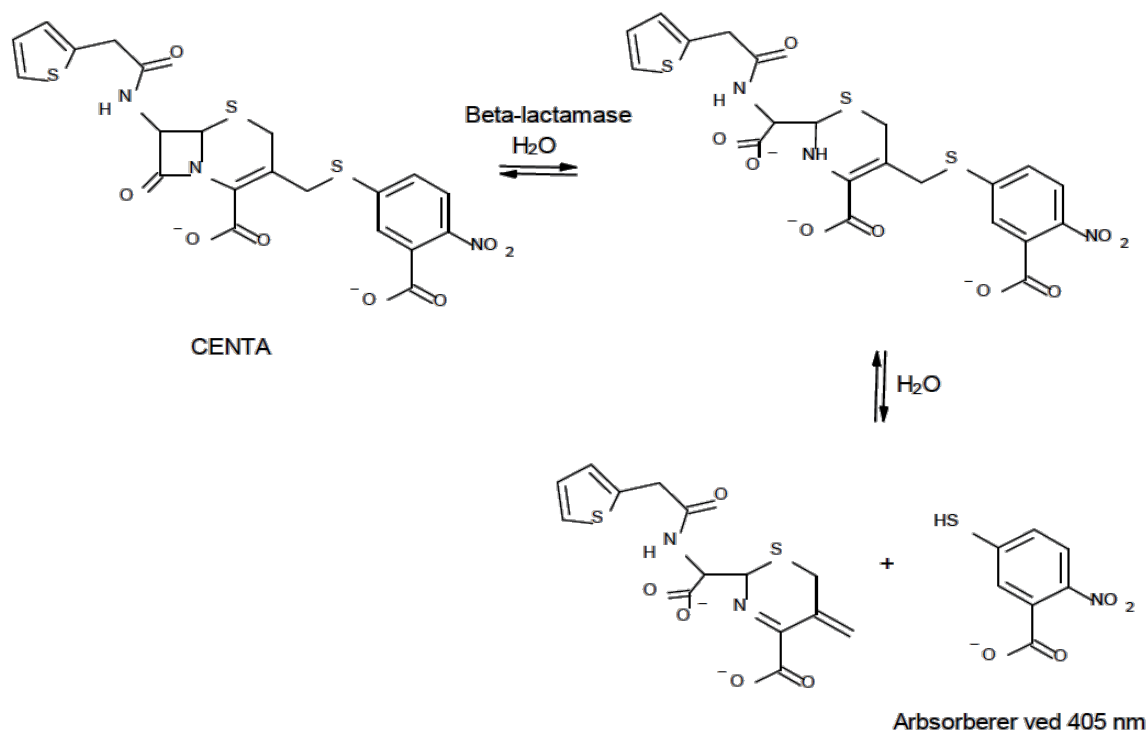
Det er ikke alle bakterier med  $\beta$ -lactamaser, der er såkaldte **patogene bakterier**, dvs. at de udgør en sygdomstrussel. Vi ved dog, at alle patogene bakterier har  $\beta$ -lactamaser.

For at bekæmpe patogene bakterier forsøger man konstant at udvikle nye typer af antibiotika. Patogene bakterier er desværre i stand til at forsvare sig mod sådanne tiltag ved at tilpasse de gener, der koder for  $\beta$ -lactamaser til at kunne modstå antibiotika. Herved bliver også de proteiner, der bliver udtrykt af de ændrede gener, tilpasset til at kunne nedbryde disse nye antibiotika. En sådan tilpasning sker enten ved hjælp af mutationer i det  $\beta$ -lactamase gen bakterien allerede har eller ved genoverførsel af plasmider fra en bakterie til en anden (**horisontal gentransfer**). De nye muterede  $\beta$ -lactamaser har en ændret substratbindingsprofil, hvorved bakterier hurtigt kan tilpasse sig nye miljøer. Bakteriernes primære forsvar mod antibiotika er altså dannelsen af nye  $\beta$ -lactamaser.

Evnen til hurtigt at danne nye  $\beta$ -lactamaser skyldes det evolutionære pres (**selektionspres**), der påhviler bakterierne for at overleve – *survival of the fittest bacterium!* Det er smart for bakterien, men ikke smart for vores behandlingen af bakterielle infektioner. Ved at danne nye  $\beta$ -lactamaser bliver bakterierne resistente overfor flere typer af antibiotika, der før kunne afhjælpe en infektion. Hvis en bakterie bliver resistent overfor et bredt spektrum af antibiotika, siges den at være **multiresistent**. Multiresistente bakterier er et stort problem på bl.a. hospitaler, da vi uden mulighed for behandling med antibiotika, ikke har andre lettilgængelige muligheder for behandling af bakterielle infektioner såsom hals- og lungebetændelse.

## ØVELSEN: $\beta$ -LACTAMASES OMDANNELSE AF SUBSTRATET CENTA

I denne øvelse skal I bestemme de enzymkinetiske parametre for  $\beta$ -lactamases omdannelse af substratet CENTA, [figur 3](#). CENTA har, ligesom  $\beta$ -lactam antibiotikaene, en  $\beta$ -lactam ring (fx penicillin), hvilket tillader  $\beta$ -lactamase at genkende CENTA, på samme vis som det ville genkende penicillin, og derved hydrolysere CENTA. Derfor kan vi bruge CENTA i vores forsøg, som en erstatning for antibiotika, til at undersøge hvordan  $\beta$ -lactamase arbejder.



**Figur 3.** Omdannelsen af CENTA katalyseret af  $\beta$ -lactamase.  $\beta$ -lactam-ringen i CENTA bliver hydrolyseret af  $\beta$ -lactamasen. Derefter hydrolyserer produktet spontant, og der frigives et kromofort molekyle, som absorberer ved 405 nm.

Som angivet i [figur 3](#) vil  $\beta$ -lactamase katalysere en hydrolyse af  $\beta$ -lactam ringen i CENTA. Produktet af denne reaktion har ingen absorbans af synligt lys, men fungerer i stedet som et intermediat i en større reaktion, hvor det spontant (dvs. uden udefrakommende påvirkning) vil hydrolysere sulfidbindingen som vist i figuren. Fra denne spontane hydrolyse dannes 2 produkter, hvoraf det ene produkt, som angivet, absorberer lys med en bølgelængde på 405 nanometer. Et sådant molekyle, der absorberer lys i det synlige område, kaldes en **kromofor**. Selvom det ikke direkte er åbningen af  $\beta$ -lactam-ringen, der måles på, så sker reaktionerne så hurtigt efter hinanden, at det på den tidsskala I skal arbejde, ingen betydning har. Dette repræsenterer således en let måde at følge hydrolysen af CENTA; jo højere absorption ved 405 nm, des mere CENTA er der omdannet og des mere aktivitet af enzymet.

Øvelsen indledes med en række absorptionsmålinger ved forskellige koncentrationer af CENTA og efter bestemte tidsintervaller. Ud fra disse målinger beregnes initialhastighederne. Herefter plottes data i et Lineweaver-Burke plot, hvorfra det er muligt at ekstrahere de enzymkinetiske parametre.

## FREMGANGSMÅDE

For at bestemme de enzymkinetiske parametre for  $\beta$ -lactamase skal I lave målinger af initialhastigheder for hydrolysen af CENTA katalyseret af  $\beta$ -lactamase.

### FORBEREDELSE OG BEREGNINGER

I måler reaktionshastigheden for  $\beta$ -lactamase ved syv forskellige koncentrationer af substrat, der ligger omkring  $K_m$  (70  $\mu\text{M}$ ). For at lette arbejdsgangen inddeles I på syv hold, der hver arbejder med en bestemt CENTA-koncentration. I skal således ikke alle lave alle enzymkinetiske målinger.

I skal måle ved følgende CENTA koncentrationer:

- 25  $\mu\text{M}$  CENTA
- 40  $\mu\text{M}$  CENTA
- 50  $\mu\text{M}$  CENTA
- 75  $\mu\text{M}$  CENTA
- 100  $\mu\text{M}$  CENTA
- 150  $\mu\text{M}$  CENTA
- 200  $\mu\text{M}$  CENTA

I dette forsøg startes reaktionen når enzymet ( $\beta$ -lactamase) tilsættes.

Slutkoncentrationen af  $\beta$ -lactamase skal være 11,5 nM.

Beregn, hvor stort et volumen, angivet i  $\mu\text{L}$ , som I skal bruge af den opløsning, I har fået udleveret, samt hvor stort et volumen af 1 mM CENTA opløsning I skal bruge. Til sidst kan I udregne hvor meget bufferopløsning, vi skal tilføje for at nå en slutvolumen ( $V_2$ ) på 1 mL. I dette forsøg bruger vi en bufferopløsning med pH 7 kaldet NaPi, hvilket står for natriumphosphat.

Beregningerne kan laves på baggrund af ligningen:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

### MATERIALE & APPARATUR

- 10  $\mu\text{L}$  pipette & tilhørende spidser
- 200  $\mu\text{L}$  pipette & tilhørende spidser
- 1000  $\mu\text{L}$  pipette & tilhørende spidser
- Stopur (mobil)
- 1 mL kuvette
- Spektrofotometer, der kan måle absorptions ved 405 nm



## FREMGANGSMÅDE

### 1. Nulstil spektrofotometret ved at trykke på ”Blank”.

Tilsæt det beregnede volumen af NaPi buffer og CENTA til kuvetten.

**OBS:** Det er altid en god idé at pipettere det største volumen først (her bufferen), da det er nemmere at blande.

### 2. Tilsæt $\beta$ -lactamase til kuvetten med CENTA-opløsningen, tryk på ”Blank”, start stopuret.

Tilsæt det beregnede volumen af enzymet til CENTA-opløsningen mens kuvetten står klar i spektrofotometret, og pipetter dernæst hurtigt op og ud et par gange for at blande.

**OBS:** Reaktionen starter så snart enzymet tilsættes, derfor skal nedenstående ske hurtigt.

- **Nulstil spektrofotometret** – Inden I foretager jeres målinger på den givne CENTA-koncentration, skal I nulstille spektrofotometret. Dette gøres ved hurtigt at lukke låget på spektrofotometret og trykke ”Blank”. Spektrofotometret vil dernæst summe lidt og absorbansmålingen er startet, så snart displayet viser ”Abs 0,000”.
- **Start stopur** – I skal starte stopuret, så snart der står ”Abs 0,000” på spektrofotometret.

### 3. Noter absorbans.

Absorbansen skal noteres efter 30 sek., 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min og 10 min.

I kan bruge nedenstående tabel til at notere absorbansen:

30 sek.	1 min.	2 min.	3 min.	4 min.	5 min.	6 min.	7 min.	8 min.	9 min.	10 min.

### 4. Skriv målingerne af absorbans ind i det fælles Excel ark.

Ud fra vores fælles absorbansmålinger vil vores fælles Excel ark beregne de enzymkinetiske parametre, vi er interesseret i.

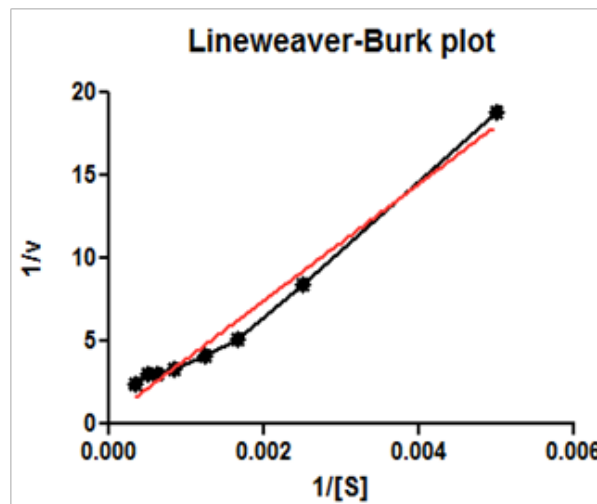
## DATABEHANDLING

Jeres observationer plottes ind i et fælles Excel ark (husk at brug komma og ikke punktum, ellers forstår Excel det ikke ☺).

For hver CENTA koncentration afbildes 405-absorbansen som funktion af tiden i minutter, og **initialhastighederne** for reaktionen bestemmes i første omgang som hældningen af hver graf.

Initialhastighederne omregnes nu fra *405-absorbansen/min* til  $\mu\text{M-CENTA/min}$  vha. ekstinktionskoefficienten  $\epsilon$  for CENTA ved 405 nm ( $\epsilon_{\text{CENTA}} = 6400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Til dette benyttes **Lambert-Beers lov**,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , hvor  $A$  er absorbansen ved 405 nm,  $l$  er længden af lysvejen målt i cm og  $c$  er koncentrationen i mol/L.

Nu kan jeres resultater afbildes i et **Lineweaver-Burke plot** (figur 4) og  $V_{\text{max}}$  og  $K_m$  kan beregnes.



**Figur 4.** Et Lineweaver-Burke plot. I et Lineweaver-Burke plot bliver de reciproke initialhastigheder ( $1/v$ ) plottet som en funktion af de reciproke substratkoncentrationer ( $1/[S]$ ). Stjernerne repræsenterer målepunkter, og den røde linje viser passningen af en lineær funktion til disse punkter.

Med de oplysninger der er givet i introduktionen (som I får på dagen af jeres BioLink undervisere), beregnes  $k_{\text{cat}}$ .

Vi vil på dagen gå gennem teorien for enzymkinetik sammen med jer ☺





