

Experiment

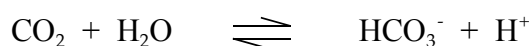
Isolierung, Aktivität und Hemmung der Carboanhydrase

1 Aufgabe: Partnerarbeit

- Bilden Sie selbständig Zweiergruppen.
- Studieren Sie zuerst die Einleitung.
- Legen Sie das Material bereit.
- Bereiten Sie in Vierergruppen die Lösungen vor (siehe 4.1).
- Isolieren Sie nun zu zweit gemäss Anleitung die Carboanhydrase aus den roten Blutkörperchen von Schweineblut (siehe 4.2).
- Messen sie die Aktivität des isolierten Enzyms ohne und mit Hemmer (siehe 4.3).
- Lösen Sie als Auswertung zu zweit die Aufgaben auf der letzten Seite.
- Die Besprechung wird in der Klasse erfolgen.
- Für das Experiment werden Sie ungefähr 80 min, für die Auswertung 15 min gebrauchen.

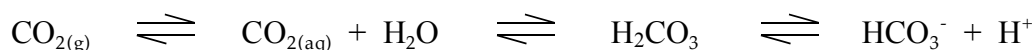
2 Einleitung

Die Wirkung und die Hemmung der Carboanhydrase lässt sich auf einfache Weise an einer Enzympräparation aus roten Blutkörperchen von Schweineblut beobachten. Kohlensäurehaltiges Mineralwasser dient als Substrat. Die bei der Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser frei werdenden Protonen führen zu einem Farbumschlag des Phenolrot-Indikators von violett nach hellgelb.



Als mögliche Enzymhemmer können die Sulfonamide Acetazolamid (im Medikament Diamox[®]), Sulfamethoxazol (Bactrim[®]) und Dorzolamid (Trusopt[®]) geprüft werden.

Kohlensäurehaltiges Mineralwasser enthält viel gelöstes CO₂. Öffnet man eine neue Flasche, entweicht ein Teil des gelösten CO₂ als gasförmige Blasen. Fälschlicherweise sagt man dem gelösten CO₂ „Kohlensäure“. Ein kleiner Teil des gelösten CO₂ (weniger als 1 Prozent) wandelt sich tatsächlich in Kohlensäure (H₂CO₃) und HCO₃⁻ + H⁺ um:



Das Gleichgewicht der Gesamtreaktion liegt stark auf der Seite des gelösten Kohlendioxides.

3 Material

Substanzen:

- Gerührtes Schweineblut (wurde im Schlachthof gerührt, damit es nicht gerinnt)
- NaCl (Kochsalz), Ethanol, Methylenchlorid (CH_2Cl_2), Phenolrot, NaHCO_3 , Na_2CO_3
- Medikamente: Diamox[®] (enthält Acetazolamid¹), Bactrim forte[®] (enthält Sulfamethoxazol²), Trusopt[®]-Augentropfen (enthält Dorzolamid)
- Kohlensäurehaltiges Mineralwasser (Aproz mit viel Kohlensäure)

Pro Klasse:

- Analysenwaage (mg-Bereich)
- Vortex
- Eppendorf-Zentrifuge

Pro Gruppe:

- 2 Stk. 100 ml Bechergläser, 2 Stk. 250 ml Bechergläser, 500 ml Becherglas, 10 ml Becherglas (pro 4er Gruppe)
- 7 Eppendorf-Röhrchen
- Styroporbox für Eisbad (oder grosses Becherglas)
- 1 ml Eppendorfpipette mit Spitzen
- 200 μl Eppendorfpipette mit Spitzen
- 20 μl Eppendorfpipette mit Spitzen (falls vorhanden)
- Stoppuhr

4 Vorgehen

4.1 Lösungen vorbereiten

Mischen Sie die Lösungen in Vierergruppen:

- Isotonische Lösung (0.9% Kochsalzlösung): 0.9 g NaCl mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.
- 40% Ethanol: 40 ml Ethanol mit dest. H_2O auf 100 ml auffüllen.
- Phenolrotlösung: 0.8 g NaHCO_3 , 1.6 g Na_2CO_3 und 2 mg Phenolrot mit dest. H_2O auf 200 ml auffüllen.
- 0.025% Acetazolamid-Lösung: Eine Viertel Tablette Diamox[®] in einem Mörser zerreiben, in 250 ml dest. H_2O lösen.³
- 0.04% Sulfamethoxazol-Lösung: Eine Viertel Tablette Bactrim forte[®] in einem Mörser zerreiben, in 500 ml dest. H_2O lösen.⁴

¹ Alternativ Acetazolamid als Reinsubstanz verwenden.

² Alternativ Sulfamethoxazol als Reinsubstanz verwenden.

³ Alternative: 25 mg Acetazolamid mit dest. H_2O auf 100 ml auffüllen.

⁴ Alternative: 40 mg Sulfamethoxazol mit dest. H_2O auf 100 ml auffüllen.

- 0.02 % Dorzolamid-Lösung: 100 µl Trusopt-Augentropfen mit dest. H₂O auf 10 ml auffüllen.

Die Aktivitätsmessungen werden bei 4°C durchgeführt. Deshalb müssen Sie die Lösungen in den Kühlschrank oder ins Eisbad stellen.

4.2 Enzympräparation

Arbeiten Sie von nun an in Zweiergruppen:

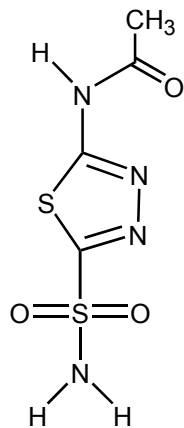
- 0.6 ml Schweineblut mit der 1ml-Eppendorfpipette in ein Eppendorfröhrchen geben.
- 3 min bei 7000 U/min zentrifugieren (gemeinsam mit Lehrer/in).
- Rötlicher Überstand (Plasma) mit einer Pipette absaugen und verwerfen.
- Rückstand (rote Blutkörperchen) in 0.8 ml isotonischer Lösung suspendieren.
- 3 min bei 7000 U/min zentrifugieren.
- Überstand absaugen und Rückstand in 0.5 ml 40% Ethanol suspendieren.
- Mit 200µl-Eppendorf-Pipette 0.2 ml Methylenchlorid zugeben, mit Deckel verschliessen und sofort mit Vortex kräftig rühren (ca. 10 s). Achtung: nach jeweils 2-3 s entlüften.
- 3 min bei 7000 U/min zentrifugieren.
- Überstand absaugen (enthält die Carboanhydrase), in ein neues Eppendorfröhrchen geben und auf Eis oder im Kühlschrank lagern.

Die Enzympräparation kann im Kühlschrank mindestens eine Woche aufbewahrt werden.

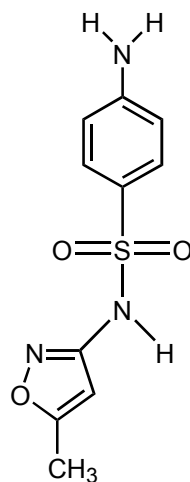
4.3 Messung der Aktivität

Kühlen Sie Lösungen, Enzympräparation, Mineralwasser und Eppendorfröhrchen (ER) im Eisbad. Mischen Sie jeweils die folgenden Ansätze in einem Eppendorfröhrchen zusammen. Verwenden Sie die passenden Eppendorfpipetten. Messen Sie die Zeit von der Mineralwasserzugabe bis zum Farbumschlag (dauert zwischen 0 und 15 s!). Tragen Sie die Zeit in die Tabelle ein.

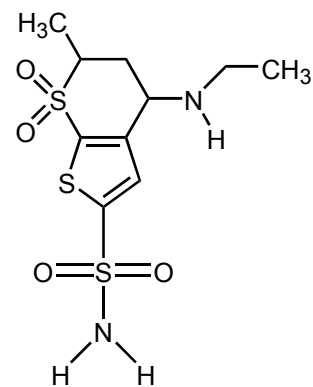
ER-Nr.	Phenolrotlsg.	Enzymlösung	möglicher Hemmer	Mineralwasser	Zeit bis Farbumschlag	hemmend ?
1	0.2 ml	-	-	1 ml		-
2	0.2 ml	20 µl	-	1 ml		-
3	0.2 ml	20 µl	20 µl Acetazolamid-Lsg.	1 ml		ja/nein
4	0.2 ml	20 µl	20 µl Sulfamethoxazol-Lsg.	1 ml		ja/nein
5	0.2 ml	20 µl	20 µl Dorzolamid-Lsg.	1 ml		ja/nein



Acetazolamid



Sulfamethoxazol



Dorzolamid

5 Fragen

Lösen Sie die Aufgaben zu zweit. Die Besprechung wird im Plenum erfolgen.

5.1 Hintergrundfragen zur Enzympräparation

- a. Weshalb wird das Blut zentrifugiert?
- b. Weshalb wird eine isotonische Lösung zugegeben und suspendiert?
- c. Was geschieht bei der Zugabe von 40% Ethanol, was bei der Zugabe von Methylenchlorid?

5.2 Auswertung der Aktivitätsmessung

- d. Wie lange dauert es bis zum Farbumschlag, wenn man die Phenolrotlösung mit Mineralwasser mischt? Weshalb kommt es ohne Enzym überhaupt zum Farbumschlag?
- e. Wie lange dauert es bis zum Farbumschlag, wenn man die Phenolrotlösung mit der Enzymlösung und dem Mineralwasser mischt? Wieso läuft diese Reaktion so schnell ab? Zeichnen Sie die Reaktion auf.
- f. Wie lange dauert es bis zum Farbumschlag, wenn man die Phenolrotlösung mit der Enzymlösung, der Acetazolamid-Lösung und dem Mineralwasser mischt? Weshalb scheint die Carboanhydrase nicht mehr aktiv zu sein?
- g. Von den beiden Stoffen Sulfamethoxazol und Dorzolamid ist einer ein Enzym-Hemmer, der andere nicht. Welcher ist hemmend, welcher nicht? Wie kommen Sie zu diesem Schluss?
- h. Betrachten Sie die Strukturformeln der drei Sulfonamide (Kap. 4.3). Welche funktionellen Gruppen haben sie gemeinsam? Welche Strukturelemente sind verschieden? Können Sie erklären, weshalb zwei Stoffe die Carboanhydrase hemmen, der andere aber nicht?

5.3 Hintergrundfragen zur Aktivitätsmessung

- i. Wieso ändert sich die Farbe der Phenolrotlösung? Welcher Stoff ist dafür verantwortlich?
- j. Warum wird das Experiment bei 4°C durchgeführt?

6 Lösungen

- a. Damit sich die roten Blutkörperchen absetzen und vom Plasma trennen.
- b. Damit das Blutplasma vollständig entfernt wird, müssen die roten Blutkörperchen aussen abgespült werden.
- c. Ethanol zerstört die Zellmembran der roten Blutkörperchen: Carboanhydrase, Hämoglobin und weitere Bestandteile treten aus. Methylenchlorid fällt das Hämoglobin aus, die Carboanhydrase bleibt in Lösung.
- d. Es dauert etwa 5 – 15 s, je nachdem wie gut gekühlt wurde. Die Reaktion läuft auch unkatalysiert ohne Enzym ab, aber viel langsamer.
- e. Es dauert 0 – 2 s. Die Reaktion wird durch das Enzym katalysiert und somit beschleunigt.
$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$$
- f. Es dauert 5 – 15 s. Acetazolamid hemmt die Carboanhydrase. Die Reaktion ist unkatalysiert.
- g. Mit Sulfamethoxazol läuft die Reaktion sehr schnell ab, es ist also kein Hemmer. Mit Dorzolamid läuft die Reaktion sehr langsam ab, es wirkt hemmend.
- h. Gemeinsam haben sie die Sulfonamid-Gruppe bestehend aus einer Sulfon- und einer Amino-Gruppe. Alle drei Stoffe sind unterschiedlich an der Sulfon-Gruppe substituiert. Die beiden Hemmer sind an der Aminogruppe unsubstituiert, das nicht-hemmende Sulfamethoxazol ist dort hingegen substituiert (mit Isoxazol-5er Ring). Dies könnte strukturell der Grund sein, dass Sulfamethoxazol nicht an die Carboanhydrase binden und sie somit nicht hemmen kann.
- i. H^+ entsteht und macht die Lösung sauer. Dies führt zum Farbumschlag des Indikators Phenolrot.
- j. Die Reaktion, auch die unkatalysierte, würde bei Raumtemperatur zu schnell ablaufen. Bei 4°C läuft die Reaktion langsamer ab.